اثر آنتی‌اکسیدان‌ها و محیط کشت بر بیوسنتز ترکیبات فنلی محدودکننده رشد در کشت درون شیشه‌ای گیاه نعناع وحشی (*Mentha arvensis* L.)

سارا قزلباش[1]، اردشیر قادری[2]، حجت‌اله بداقی[1]، زیبا قسیمی حق[1]، مهرداد کاشفی[2]، امیررضا زارع کاریزی[2]*

۱- گروه باغبانی و گیاه‌شناسی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی شاهرود، شاهرود، ایران
۲- مرکز تحقیقات گیاهان دارویی، پژوهشکده گیاهان دارویی جهاد دانشگاهی، کرج، ایران
* آدرس مکاتبه: کرج، مرکز تحقیقات گیاهان دارویی، پژوهشکده گیاهان دارویی جهاد دانشگاهی
تلفن: ۱۹-۳۴۷۶۴۰۱۰ (۰۲۶)، نمابر: ۳۴۷۶۴۰۲۱ (۰۲۶)
پست الکترونیک: amirrzare@gmail.com

تاریخ دریافت: ۹۴/۹/۳ **تاریخ تصویب:** ۹۵/۳/۱۶

چکیده

مقدمه: فنل‌ها از مهم‌ترین ترکیبات ثانویه می‌باشند که در پاسخ به شرایط محیطی در گیاهان تولید می‌شوند. غلظت و عناصر محیط‌های کشت نقش مؤثری در تولید این ترکیبات دارند. اکسیداسیون ترکیبات فنلی در محیط کشت موجب کاهش موفقیت در فرآیند کشت بافت یا پیچیده شدن مراحل آن می‌شود.

هدف: مطالعه حاضر جهت بررسی اثر آنتی‌اکسیدان‌های مختلف و محیط‌های کشت در مهار بیوسنتز ترکیبات فنلی در کالوس‌های گیاه *Mentha arvensis* L صورت گرفت.

روش بررسی: برگ‌های سترون در محیط کشت پایه MS حاوی اکسین‌ها (2,4-D و NAA) و سایتوکنین‌ها (BAP و KIN) جهت تولید کالوس کشت شدند. پس از دست‌یابی به غلظت مناسب هورمونی جهت بررسی تولید فنل، کالوس‌ها در محیط MS و B5 همراه با غلظت‌های مختلف زغال فعال، اسید سیتریک، اسید آسکوربیک، زردچوبه و پلی وینیل پیرولیدون هر یک به طور مجزا کشت شدند. میزان فنل در کالوس و محیط کشت بوسیله دستگاه اسپکتوفتومتر اندازه‌گیری شد.

نتایج: بیشترین میزان وزن تر (۳/۵۶ گرم) و وزن خشک کالوس‌ها (۱/۸۸ و ۱/۷۴ گرم) در غلظت‌های به ترتیب ۰، ۰/۵ و ۱ میلی‌گرم در لیتر هورمون 2,4-D مشاهده شد. زغال فعال، اسید سیتریک، اسید آسکوربیک و پلی وینیل پیرولیدون تأثیر معنی‌داری بر تولید ترکیبات فنولیک نداشتند. در حالی که تأثیر زردچوبه در هر دو غلظت معنی‌دار بود. بیشترین میزان فنل در محیط کشت (۱۲۷ µg/ml) و کمترین میزان فنل در کالوس‌ها (۷۲/۹ gµ/ml) در محیط حاوی ۱۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر زردچوبه مشاهده شد.

نتیجه‌گیری: زردچوبه نقش بسیار معنی‌داری در رهاسازی و جذب ترکیبات فنلی در محیط کشت دارد. این ماده می‌تواند به عنوان روشی ارزان و کارآمد جهت تولید کالوس‌های عاری از فنل و همچنین تولید ترکیبات فنلی در مطالعات مرتبط با تولید متابولیت‌های ثانویه در شرایط درون شیشه‌ای استفاده شود.

گل‌واژگان: *Mentha arvensis* L، آنتی‌اکسیدانت، زردچوبه، کالوس، ترکیبات فنلی

مقدمه

کشت سلول‌های گیاهی روشی مناسب جهت تولید متابولیت‌های ثانویه با ارزش در اکثر گیاهان است. در شرایط مناسب، سلول‌های کالوس می‌توانند به رشد دائم و بدون تغییر خود به طور نامحدود ادامه داده و دامنه گسترده‌ای از متابولیت‌های ثانویه و ترکیبات ارزشمند را تولید نمایند [۱]. یکی از مهم‌ترین مشکلات کالزایی بویژه در گیاهان دارویی، قهوه‌ای شدن اکسایشی (oxidative browning) بافت‌های کالوس به دلیل تولید اکسیداسیون ترکیبات فنلی می‌باشد که باعث کاهش و یا توقف رشد سلول‌ها، کاهش قدرت باززایی و در نهایت مرگ سلول‌ها می‌شود [۲]. دلیل اصلی قهوه‌ای شدن بافت‌های گیاهی تجمع و اکسایش ترکیبات فنلی در بافت‌ها می‌باشد که اغلب به عنوان پاسخ دفاعی گیاه به استرس‌های زنده و غیرزنده رخ می‌دهد [۳]. آنزیم پلی فنل اکسیداز در پلاست‌های سلول‌های گیاهی قرار دارد. پیش ماده فنلی این آنزیم در واکوئل سلول گیاهی ذخیره شده و بوسیله حضور جداگانه این مواد در واکوئل از واکنش قهوه‌ای شدن جلوگیری می‌نماید، در صورت آسیب به سلول‌های گیاهی این آنزیم و پیش ماده آن با هم مخلوط شده و پدیده قهوه‌ای شدن در بافت رخ می‌دهد [۴].

در بسیاری از روش‌های کشت بافت گیاهی، ریزنمونه‌ها بریده شده و در محیط‌هایی که به طور بالقوه دارای شرایط تنش هستند کشت می‌شوند که باعث تولید و رهایی ترکیبات فنلی در ریزنمونه‌ها و یا محیط کشت می‌شود. ترشح ترکیبات فنلی در محیط کشت باعث تجمع ترکیبات سمی برای بافت گیاهی و در نهایت موجب کاهش شانس موفقیت در کشت بافت یا پیچیده شدن مراحل آن می‌شود [۵]. به دلیل تولید ترکیبات فنلی در تعداد زیادی از گیاهان در شرایط درون‌شیشه‌ای تاکنون روش‌های متفاوتی به منظور کاهش این ترکیبات گزارش شده است. به طور کلی این روش‌ها در دو گروه کلی تقسیم می‌شوند: ۱) آنتی‌اکسیدان‌هایی چون آسکوربیک اسید، ملاتونین و اسید سیتریک که تنش اکسایشی را کاهش داده و از اکسایش ترکیبات فنلی جلوگیری می‌کند. ۲) مواد جاذبی مانند ذغال فعال و پلی وینیل پیرولیدون (PVP) که با ترکیبات فنولی پیوند ایجاد کرده و باعث کاهش سمیت این ترکیبات در شرایط درون شیشه‌ای می‌شوند [۲]. این ترکیبات اغلب با روش‌هایی چون نگهداری گیاهان در تاریکی، کشت ریزنمونه در محیط کشت مایع، واکشت‌های متوالی و انتخاب ریزنمونه مناسب برای جلوگیری از قهوه‌ای شدن ریزنمونه‌های گیاهی مورد استفاده قرار می‌گیرند. استفاده از ترکیبات آنتی‌اکسیدانی مانند اسیدآسکوربیک (ASC)، اسیدسیتریک (CIT)، پلی‌ونیل‌پیرولیدین (PVP) در مطالعات مختلف گزارش شده است [۶]. این ترکیبات به عنوان بازدارنده فرآیند اکسیداتیو و از بین برنده رادیکال‌های آزاد عمل می‌کنند و با تبدیل این مواد به ترکیباتی با فعالیت کمتر، مانع اکسید شدن ترکیبات فنلی می‌شوند. تأثیر مثبت برخی آنتی‌اکسیدان‌ها مانند PVP، CIT، ASC در کاهش ترکیبات فنلی ریزنمونه‌های قهوه‌ای مانند *Abies balsamea*، *Picea gluca*، *Pinus sylvesteris*، *Lichi chinensis* و *Arctium lappa* مشاهده شده است [۷، ۲]. نقش و مکانیسم عمل فعالیت آنتی‌اکسیدانی در بسیاری از ترکیبات طبیعی در علوم پزشکی و تغذیه گزارش شده است [۸]. با این حال مطالعات اندکی درباره نقش این ترکیبات طبیعی به منظور کاهش ترکیبات فنولی در شرایط درون شیشه‌ای انجام شده است. یکی از این ترکیات زردچوبه می‌باشد [۴]. کورکومین موجود در زردچوبه (*Cucurma longa*) از طریق به دام‌اندازی و پایدار کردن انواع رادیکال‌های آزاد نظیر پراکسیل چربی، می‌تواند از گسترش اکسیداسیون جلوگیری نماید [۹]. همچنین نوع محیط کشت و ترکیب عناصر غذایی می‌تواند بر تولید متابولیت‌های ثانویه مؤثر باشد. عناصری از جمله پتاسیم، کلسیم و منیزیم و نیز اغلب عناصر ماکرو و ویتامین‌ها در ساخت ترکیبات ثانویه و فعالیت آنزیم‌ها دخالت دارند و از این طریق می‌توانند بر تولید، و ترشح ترکیباتی مانند فنل‌ها تأثیرگذار باشند [۱۰].

نعناع وحشی یا ذرتی با نام علمی *Mentha arvensis* L یکی از گیاهان دارویی با اهمیت از خانواده Lamiaceae می‌باشد [۱۱]. اندام‌های هوایی این گیاه حاوی تعداد زیادی از ترکیبات آرماتیک، شامل منتول، منتون، ایزومنتول، کارون،

لینالول، لینالیل استیک می‌باشد. از این ترکیبات در صنایع داروسازی، غذایی، لوازم آرایشی، بهداشتی و طعم‌دهنده‌ها استفاده می‌شود [۱۳، ۱۲]. کشت سلولی می‌تواند روشی مناسب برای تولید متابولیت‌های ثانویه با ارزش گیاه نعناع باشد [۱۴]. در شرایط مناسب، سلول‌های کالوس در محیط سوسپانسیون می‌توانند به رشد دائم و بدون تغییر خود به طور نامحدود ادامه دهند. عصاره نعناع ترکیبات فنلی بالایی دارد که باعث کاهش شانس موفقیت در کشت سلولی و مرگ سلول‌ها در شرایط درون شیشه‌ای می‌شود [۱۳]. از روش‌های مهندسی کشت بافت می‌توان جهت اندازه‌گیری ترکیبات پلی فنلی برای کاهش اثرات مخرب این ترکیبات استفاده نمود و از اتلاف مواد آزمایشگاهی، زمان و مواد گیاهی تا حد قابل قبولی جلوگیری کرد [۶]. هدف از این پژوهش بررسی تغییرات بیوسنتز ترکیبات فنلی تحت تأثیر ترکیبات آنتی‌اکسیدانی و محیط کشت در کالوس‌های گیاه *Mentha arvensis* L در شرایط درون شیشه‌ای می‌باشد.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری و ضدعفونی گیاه

گیاهچه‌های نعناع *Mentha arvensis* L. از گلخانه پژوهشکده گیاهان دارویی جهاد دانشگاهی کرج با کد هرباریومی (MPISB-1336) جمع‌آوری و به آزمایشگاه منتقل شد. پس از جدا کردن برگ‌ها، ساقه‌های سالم و عاری از آفت و بیماری در محیط آزمایشگاه ابتدا به مدت یک ساعت در زیر آب جاری همراه با دو الی سه قطره توین ۲۰ شستشو و سپس در شرایط استریل ابتدا با اتانول ۷۰ درصد به مدت یک دقیقه و پس از آن بوسیله هیپوکلرید سدیم (NaOCl) یک درصد به مدت ۱۰ دقیقه استریل شد. در مرحله بعد برگ‌ها و ساقه‌ها سه بار و هر بار به مدت پنج دقیقه با آب مقطر استریل، شستشو شدند. به منظور ریزازدیادی، ریزنمونه‌های استریل شده که حاوی حداقل یک یا دو گره بودند در محیط کشت‌های MS ۱/۲ بدون تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی کشت و به اتاق رشد به مدت ۳۰ روز انتقال داده شد.

کالزایی

پس از دست‌یابی به ریزنمونه‌های مناسب از طریق ریزازدیادی، گیاهچه‌های سترون از شیشه خارج و سپس برگ‌ها در قطعات ۲-۱ سانتی‌متر مربع بریده شده و در محیط کشت پایه MS حاوی تنظیم‌کننده‌های رشد شامل اکسین‌های (2,4-D و NAA) و سایتوکنین‌های (BAP و KIN) با غلظت‌های ۰/۵ و ۱ و ۲ میلی‌گرم در لیتر به تنهایی و یا در ترکیب با یکدیگر کشت شدند. یک‌ماه پس از کشت وزن تر و خشک کالوس اندازه‌گیری شد. به منظور اندازه‌گیری وزن خشک، کالوس‌های وزن شده در فویل آلومینیومی پیچیده شده و به مدت ۴۸ ساعت در شرایط آزمایشگاه با دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد به طور کامل خشک و وزن شدند.

بررسی اثرات آنتی‌اکسیدان‌ها بر کنترل تولید ترکیبات فنلی

به منظور بررسی اثرات آنتی‌اکسیدان‌ها کالوس‌ها در محیط‌های کشت MS و B5 همراه با ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر هورمون 2,4-D در ترکیب با ۱ یا ۲ گرم در لیتر زغال فعال، ۱۰۰ یا ۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر سیتریک اسید، ۵۰۰ یا ۱۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر اسید آسکوربیک، ۵۰۰ یا ۱۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر پودر زردچوبه و مقدار ۲۵۰ یا ۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر PVP هر یک به طور مجزا واکشت شدند. محیط‌های پایه MS و B5 که فاقد آنتی‌اکسیدان‌ها بود، به عنوان شاهد در نظر گرفته شد. زغال فعال، اسیدسیتریک، PVP و زردچوبه هر یک در غلظت‌های ذکر شده قبل از اتوکلاو به محیط کشت اضافه شد، در حالی که، اسید آسکوربیک به دلیل عدم پایداری آن به دمای بالا، بعد از اتوکلاو محیط کشت در لامینار ایرفلو و زمانی که دمای محیط به کمتر از ۵۰ درجه سانتی‌گراد رسید توسط استریلیزاسیون فیلتری به محیط کشت افزوده شد.

روش اندازه‌گیری میزان فنل تولید شده در محیط کشت و کالوس‌ها

روش فولین سیوکالتیو از متداول‌ترین روش‌های اندازه‌گیری ترکیبات فنلی می‌باشد [۱۵]. اساس کار در این

روش احیاء معرف فولین توسط ترکیبات فنلی در محیط قلیایی و ایجاد کمپلکس آبی رنگ است که حداکثر جذب را در طول موج ۷۶۰ نانومتر نشان می‌دهد. حجم مشخصی از محیط کشت‌ها (۱۰ میلی‌لیتر) و کالوس‌ها (۱۰ گرم)، جهت تخمین میزان فنل مورد استفاده قرار گرفت. ریزنمونه‌ها و کالوس‌ها به لوله‌های فالکون انتقال داده شد، سپس به هر لوله مقدار ۵ میلی‌لیتر اتانول ۸۰ درصد اضافه و با استفاده از یک میله شیشه‌ای کاملاً مخلوط شد. لوله‌ها به مدت ۳۰ دقیقه در شیکر دوار، با سرعت ۱۲۰ دور در دقیقه قرار گرفت، سپس محتویات به مدت ۳۰ دقیقه با سرعت ۴۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد. پس از سانتریفیوژ، لایه رویی از کاغذ صافی واتمن شماره ۴۲ عبور و در ادامه محتوی فنل با استفاده از معرف فولین سیوکالتیو اندازه‌گیری شد. به ۱ میلی‌لیتر از هر عصاره ۵۰۰ میکرولیتر واکنش‌گر فولین سیو کالتیو اضافه و پس از ۳ دقیقه مقدار ۱ میلی‌لیتر از محلول ۲۰ درصد کربنات سدیم به آن افزوده و سپس مخلوط با آب مقطر به حجم ۱۰ میلی‌لیتر رسانده شد. جذب مخلوط ۱ ساعت بعد در طول موج ۷۶۰ نانومتر توسط دستگاه اسپکتوفتومتر در مقابل بلانک قرائت شد.

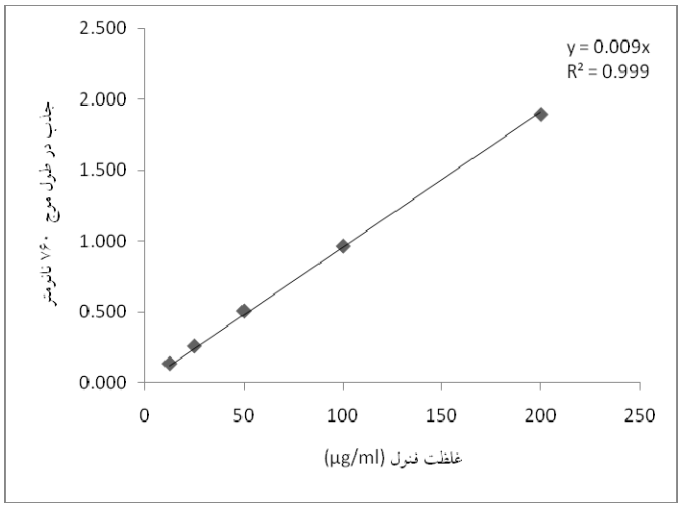
میزان ترکیبات فنلی *Menthea arvensis* بر مبنای مقادیر جذب ناشی از واکنش عصاره با معرف فولین سیوکالتیو و بر اساس مقایسه آن با محلول‌های استاندارد اسید گالیک و بر طبق معادله خط به دست آمده از منحنی استاندارد اسید گالیک Y=0.0096X محاسبه شد (نمودار شماره ۱). اسیدگالیک به عنوان استاندارد برای رسم منحنی کالیبراسیون به کار رفت. میزان تام فنولیک بر اساس میزان معادل میلی‌گرم اسید گالیک در گرم عصاره گزارش شد. آزمایش سه بار تکرار و میانگین آنها گزارش شد.

شرایط کشت

به تمامی محیط‌های کشت ۳۰ گرم در لیتر ساکارز و ۷ گرم در لیتر آگار افزوده شد و در pH=۵/۸ تنظیم شد. کشت‌ها در اتاق رشد با دمای ۲ ± ۲۳ درجه سانتی‌گراد و با فتوپریود ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی به مدت ۳۵ روز نگهداری شد.

تجزیه و تحلیل آماری

داده‌های به دست آمده به صورت آزمایش فاکتوریل و در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی در سه تکرار که در هر تکرار پنج ریزنمونه قرار داشت آنالیز شد. تجزیه آماری طرح با استفاده از نرم‌افزار MSTATC صورت گرفت. مقایسه میانگین با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن و با سطح احتمال پنج درصد انجام شد.



نمودار شماره ۱- منحنی استاندارد اسید گالیک

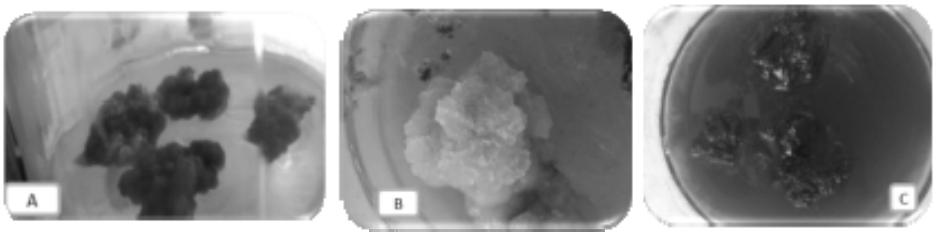
نتایج

فاز کالزایی

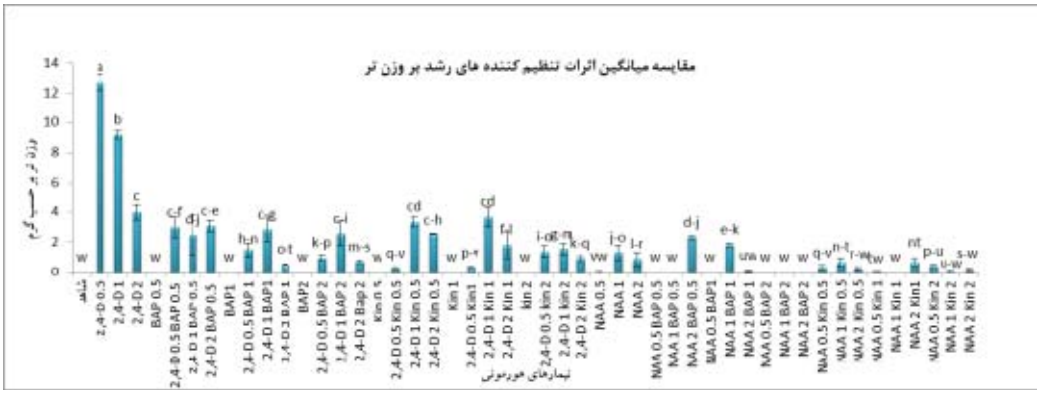
بررسی ریزنمونه‌های برگی کشت شده در محیط کالزایی نشان داد که اولین نشانه‌های کالزایی دو هفته پس از کشت در ریزنمونه‌های برگی مشاهده شد. کالوس‌های تشکیل شده، ترد یا آبکی و به رنگ قهوه‌ای روشن یا تیره بودند (شکل شماره ۱). بر اساس نتایج به دست آمده از این آزمایش بیشترین درصد کال‌زایی (۱۰۰ درصد) در محیط 2,4-D به تنهایی و یا در ترکیب با سایتوکنین‌ها صورت گرفت و اختلاف معنی‌داری بین تیمارهای 2,4-D با KIN و 2,4-D با BAP وجود نداشت. در حالی که درصد کالزایی در محیط کشت حاوی NAA به تنهایی و یا ترکیب با سایتوکنین‌ها متفاوت بود. هیچ گونه کالزایی در تیمار شاهد و تیمار حاوی سایتوکنین‌ها به تنهایی مشاهده نشد. بر این اساس، بیشترین وزن تر (۳/۵۶ گرم) در غلظت ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر تیمار هورمونی 2,4-D به تنهایی و بیشترین وزن خشک در محیط‌های حاوی ۰/۵ و ۱ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D (۱/۸۸ و ۱/۷۴ گرم به ترتیب) مشاهده شد (نمودارهای شماره ۲ و ۳). در محیط کشت حاوی NAA به تنهایی و یا در ترکیب با سایتوکنین‌ها در بسیاری از ریزنمونه‌ها ریشه‌زایی مشاهده شد. همچنین، درترکیبات هورمونی NAA+BAP و NAA+KIN بازایی از کالوس‌ها مشاهده شد.

اندازه‌گیری میزان فنل تولید شده در محیط کشت و کالوس‌ها

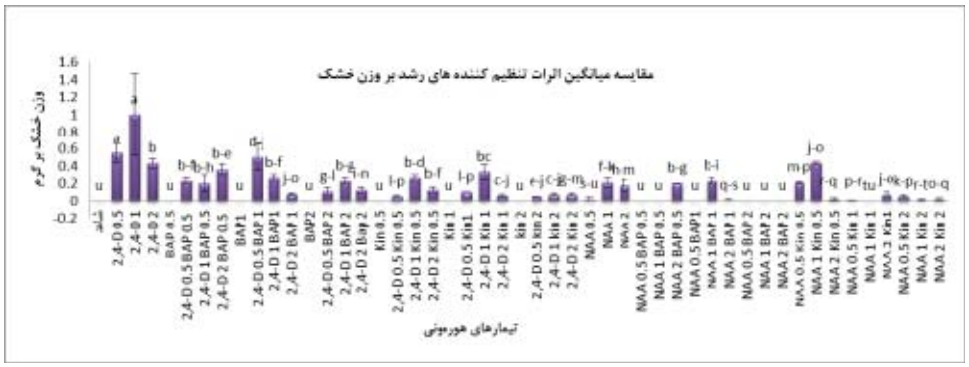
کالوس‌ها پس از گذشت ۱۴ روز از کشت در محیط‌های حاوی مواد آنتی‌اکسیدانی شروع به رشد کردند و پس از ۳۵ روز اندازه‌گیری فنل در محیط کشت‌ها و کالوس انجام گرفت. کمترین میزان رشد کالوس محیط حاوی زغال فعال مشاهده شد که رنگ کالوس‌های رشد یافته نیز تیره بود. در حالی که در سایر محیط کشت‌ها رشد کالوس‌ها قابل توجه و رنگ کالوس‌ها روشن‌تر بود (شکل شماره ۱).



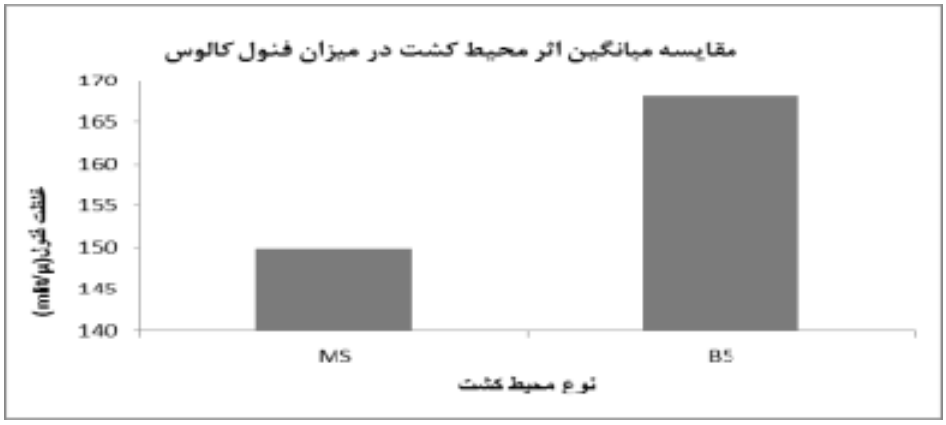
شکل شماره ۱– A– کالوس‌های بهینه تشکیل شده از برگ در محیط MS حاوی (2,4-D ۰/۵ mg/l) ۳۰ روز پس از کشت B– کالوس رشد یافته در محیط کشت حاوی زرد چوبه و C–کالوس‌های رشد یافته در محیط حاوی زغال فعال



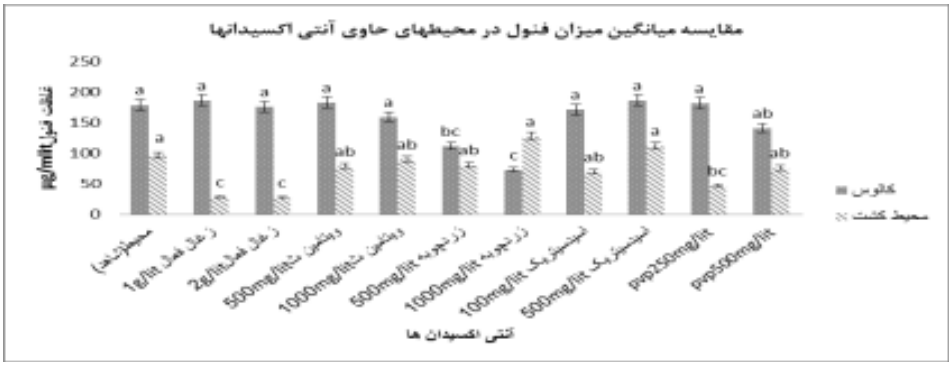
نمودار شماره ۲– مقایسه میانگین اثر هورمون‌های مختلف بر وزن تر کالوس‌ها در گیاه *Mentha arvensis*



نمودار شماره ۳- مقایسه میانگین اثر هورمون‌های مختلف بر وزن خشک کالوس‌ها در گیاه *Mentha arvensis*



نمودار شماره ۴- مقایسه میانگین نوع محیط کشت در میزان فنل در کالوس



نمودار شماره ۵- نمودار مقایسه میانگین اثر آنتی‌اکسیدان‌های مختلف در کنترل فنل در کالوس *Menthea arvensis*

مقایسه میانگین بر اساس آزمون دانکن نشان داد که بیشترین میزان فنول (۱۲۷ g/µml) در محیط کشت حاوی ۱۰۰۰ mg/l زردچوبه مشاهده شد. با این حال تفاوت معنی‌داری با محیط‌های حاوی ۱۰۰ و ۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر اسید سیتریک، ۱۰۰۰ و ۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر اسید آسکوربیک و محیط شاهد وجود نداشت. در زمینه میزان تولید ترکیبات

فنلی در کالوس‌ها تفاوت معنی‌داری در محیط کشت شاهد، زغال فعال، اسید آسکوربیک، اسید سیتریک و PVP مشاهده نشد. با این حال افزایش غلظت زغال فعال، اسید آسکوربیک و اسید سیتریک باعث کاهش در میزان ترکیبات فنلی در کالوس شد. اگرچه این کاهش معنی‌دار نبود و تفاوت معنی‌داری با تیمار شاهد مشاهده نشد (نمودار شماره ۵). با این حال افزایش غلظت PVP باعث کاهش ترکیبات فنلی در کالوس شد. بیشترین میزان کاهش ترکیبات فنلی (۷۲/۹ g/µml) در کالوس در تیمار حاوی ۱۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر زردچوبه و بیشترین میزان فنل در کالوس‌های حاوی زغال فعال در غلظت (۲ g/lit) به میزان (۱۷۵ g/µml) مشاهده شد (نمودار شماره ۵). مقایسه میانگین نشان داد که میزان فنل در کالوس‌های کشت شده در محیط کشت B5 بیشتر (۱۶۵ g/µml) از محیط کشت MS (۱۵۰ g/µml) بود (نمودار شماره ۴).

بحث

کشت سلول‌های گیاهی یک منبع مناسب برای تولید متابولیت‌های ثانویه با ارزش در اکثر گیاهان است [۱۷، ۱۶]. سلول‌های گیاهی از نظر بیوسنتزی خاصیت توتوپتانسی دارند. بدین معنی که هر سلول تحت کشت، تمام اطلاعات ژنتیکی گیاه والد را دارد و از این جهت دارای چنین توانایی است که دامنه‌ای از مواد شیمیایی را که در گیاه والد یافت می‌شود، تولید نماید. ترکیبات اکسین (2,4-D, NAA) و سایتوکنین (BAP, KIN) در زمینه تحریک و القای سلولی در کشت بافت مورد استفاده قرار می‌گیرند. استفاده از NAA و Kin در محیط‌های کشت MS باعث ایجاد نوساقه از کالوس‌ها در دو گیاه *M. arvensis* و *M. piperita* شده بود [۱۸]. همچنین استفاده از مقادیر ۵ و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر به ترتیب از هورمون‌های NAA و BAP به مدت ۲۵ روز در محیط MS باعث توسعه شاخه از کالوس‌ها در گیاه *M. arvensis* شد که با آزمایش انجام گرفته مطابقت داشت [۱۹]. استفاده از غلظت‌های مختلف NAA به عنوان تنها منبع هورمونی به کار رفته جهت کالزایی نشان داد که میزان تولید کالوس در این تیمارها به طور معنی‌داری کمتر از میزان کالوس در محیط کشت‌های حاوی 2,4-D بود که این امر نشان‌دهنده حضور 2,4-D جهت کالزایی گیاه نعناع فلفلی است.

فنل‌ها ترکیبات ثانویه ارزشمندی هستند که تولید آنها طی سال‌های اخیر مورد توجه پژوهشگران بیوتکنولوژی قرار گرفته است. همچنین آزمایشات متعدد در دهه گذشته نشان می‌دهد که وجود این ترکیبات مانع فرایند کالزایی و در نهایت مرگ ریزنمونه‌ها در شرایط درون شیشه‌ای است. نتایج این بررسی نشان داد که از ترکیبات آنتی اکسیدانی استفاده شده در این پژوهش تنها زردچوبه به عنوان یک آنتی‌اکسیدان قوی، نقش بسیار معنی‌داری در رهاسازی و جذب ترکیبات فنلی در گیاه *M. arvensis* دارد. در محیط حاوی ۱۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر زردچوبه کمترین میزان ترکیبات فنلی در کالوس‌ها و بیشترین میزان فنول در محیط کشت مشاهده شد که تفاوت معنی‌داری با سایر ترکیبات آنتی‌اکسیدانی داشت. این نتایج نشان می‌دهد که زردچوبه دارای فعالیت آنتی‌اکسیدانی بوده و باعث کاهش مواد فنولی در کالوس‌ها می‌شود. همچنین با توجه به اینکه میزان ترکیبات فنلی در محیط کشت افزایش یافته است. به نظر می‌رسد ترکیبات موجود در زردچوبه توانایی جذب ترکیبات فنولی را نیز دارند. مشابه با این نتایج وحدت‌پور و همکاران (۱۳۸۸) در ارزیابی بررسی اثر آنتی اکسیدانی زردچوبه در محیط کشت کالوس گیاه نارون چینی نشان دادند که زردچوبه تأثیر معنی‌داری بر کاهش ترکیبات فنلی دارد [۴].

استفاده از زردچوبه (*Cucurma longa*) در محیطی که فعالیت اکسیداسیونی زیاد صورت می‌گیرد، باعث کاهش فرایند تولید مواد فنلی می‌شود. زردچوبه به عنوان طعم‌دهنده، اغلب به صورت پودر مورد استفاده قرار می‌گیرد. کورکومین (Curcumine) موجود در زردچوبه خاصیت آنتی‌اکسیدانی دارد [۲۰]. تحقیقات نشان داده است که ترکیبات کورکومین، رادیکال‌های آزاد و انواع اکسیژن فعال (ROS) و محصولات آنها که در القاء و ایجاد اکسیداسیون موثرند را به دام می‌اندازد [۴]. افزایش رشد کالوس گیاه نارون چینی در تیمار با زردچوبه در غلظت ۰/۵ درصد مشاهده شده است. در حالی که شدت رشد کالوس‌ها در محیط حاوی زغال فعال کاهش پیدا کرده است. زغال فعال علاوه بر جذب مواد فنلی باعث

جذب بعضی ترکیبات مانند تنظیم کننده‌های رشد نیز می‌شود. همچنین ویتامین‌های تیامین و اسیدنیکوتینیک را از محیط حذف می‌کند [۲۱]. همچنین این بررسی نشان داد که محیط B5 باعث افزایش معنی‌داری در میزان فنل می‌شود. میزان و نوع ترکیبات فنلی در گیاهان تحت تأثیر عوامل بسیار متفاوت همانند شرایط ژنتیکی و محیطی (نور، دما، دسترسی به مواد غذایی) است. تفاوت بسیار بارزی بین محیط کشت B5 و MS از لحاظ نوع و غلظت عناصر و مقدار ویتامین‌ها وجود دارد که می‌تواند در تولید مواد فنولیکی مؤثر باشد. غلظت‌ها مختلف سولفات آمونیوم نقش مؤثری در افزایش زیست توده و غلظت ترکیبات فنلی دارد. به این ترتیب که در مسیر سنتز ترکیبات فنلی، اولین واکنش در مسیر فنیل پروپانوئید بوسیله فنیل آلانیل آمونیالیاز (PAL) کاتالیز می‌شود که L – فنیل آلانیل را به ترنس سینالیک اسید تبدیل می‌کند. مشخص شده است که سنتز Denova-pal بوسیله محرک‌های زیستی و غیرزیستی القا می‌شود. در نتیجه بیان و انباشت ژن‌های PAL موجب سنتز ترکیبات فنلی در قسمت‌های مختلف سلول می‌شود. آمونیوم سولفات نقش بسیار موثری در تنظیم بیان ژن PAL در بیوسنتز سلول‌های گیاهی دارد. همچنین تفاوت بارزی از لحاظ مقدار بالای ویتامین‌ها در محیط B5 نسبت به MS وجود دارد که می‌تواند در تولید ترکیبات فنلی موثر باشد. تیامین نقش کلیدی به عنوان کوفاکتور در مسیرهای متابولیکی اصلی گیاه دارد. بنابراین ممکن است به طور مستقیم و با غیر مستقیم به تولید ترکیبات ثانویه کمک کند [۲۱].

نتیجه‌گیری

مطالعات آینده در مورد نقش زردچوبه و همچنین ترکیبات محیط B5 همانند تیامین و آمونیوم سولفات در مسیر بیوسنتزی فنل‌ها می توانند راه‌گشای محققین جهت شناسایی کامل‌تری از نحوه تأثیر این مواد باشد. از این پژوهش می‌توان جهت روش ارزان و کارامد جهت تولید کالوس‌های عاری از فنل به منظور تولید حجم بالایی از کالوس و همچنین در تولید فنل از کالوس‌ها در مطالعات مرتبط با تولید متابولیت‌های ثانویه در شرایط درون شیشه‌ای استفاده کرد.

منابع

1. Wilson SA and Roberts SC. Recent advances towards development and commercialization of plant cell culture processes for the synthesis of biomolecules. *Plant Biotechnol. J.* 2012; 10 (3): 249 - 68.

2. Jones A and Saxena P. Inhibition of Phenylpropanoid Biosynthesis in *Artemisia annua* L.: A Novel Approach to Reduce Oxidative Browning in Plant Tissue Culture. *PLOS One* 2013; 8 (10): 1 - 13.

3. Titov S, Bhowmik S, Mandal A, Alam MS and Uddin SN. Control of Phenolic Compound Secretion and Effect of Growth Regulators for Organ Formation from *Musa* spp. cv. Kanthali Floral Bud Explants. *Afr. J. Biotechnol*. 2006; 2: 89 - 98.

4. Vahdatpour1 F, Mashayekhi K and zirkuhi M. Investigation of ontioxidant effect turmeric in comparing with active coal and ascorbic acid in cultural medium of Ulmas pavrifolia Jasq. Callus. *J. Plant Production* 2009; 16: 2.

5. Abdelwahd R, Hakam N, Labhilili M and Udupa SM. Use of an adsorbent and antioxidants to reduce the effects of leached phenolics in *in vitro* plantlet regeneration of faba bean. *Afr. J. Biotechnol.* 2008; 7 (8): 997 - 1002.

6. Krishna H, Sairam RK, Singh SK, Patel VB, Sharma RR, Grover M, Nain L and Sachdev A. Mngo explant browning: effect of ontogenic age, mycorrhization and pre-treatments. *Sci. Hortic-Amsterdam.* 2008; 118 (2): 132 - 8.

7. Palma M, Pinero Z and Barroso CG. Stabilityof

phenolic compounds during extraction withsuperheated solvents. *J. Chromatogr A*. 2001; 921 (2): 169 - 17.

8. Alarcón CL, Denicola A, Evaluating the antioxidant capacity of natural products: A review on chemical and cellular-based assays. *Analytica Chimica Acta* 2013; 763: 1 - 10.

9. Abbasi Kajani A, Mofid M R and Otrosh M. Investigation of the effects of basal medium type on the production of anti-cancer drug Taxol from cell culture of Taxus baccata L. *J. Plant Biol*. 2012; 4: 12.

10. Zakaria Z, Aziz R, Yoga LathaLachimanan, and Sreenivasan S, Rathinam X. Antioxidant activity of Coleus blumei, Orthosiphonstamineus, Ocimumbasilicum and Menthaarvensis fromLamiaceae family. *Int. J. Nat. Sci*. 2008; 2 (1): 93 - 5.

11. Mozaffarian V. A Dictionary of Iranian Plant Names: Latin, English, Persian. Farhang Mo'aser, 3rd ed, Tehran 2003, P: 35.

12. Jazani NH, Ghasemnejad-Berenji H and Sadagpoor S. Antibacterialeffects of Iranian Menthapulegium essential oil on isolates of Klebsiella sp. *Pak. J. Biol. Sci*. 2009; 12 (2): 183 - 5.

13. Shariatifar N, Kamkar A, Shams M, Misaghi A, Jamshidi AH and Jahed kashani GH. Quqntitve and Qualitiveative study of phenolic compounds dnd anty oxidant activity of plant Pulicaria ganphalodes. Ofogh-e- danesh. *J. Gonabad* 2012; 18: 1.

14. Alfermann A and Petersen M. Natural products formation by plant cell biotechnology. *Plant Cell Tissue and Org Culture* 1995; 43: 199 - 205.

15. Alfermann AW and Petersen M. Natural products formation by plant cell biotechnology. *Plant Cell Tissue and Org Culture* 1995; 43: 199-205.

16. Dornenburg H and Knorr D. Production of the phenolic flavour compounds with cultured cells and tissue of *Vanilla planifolia* species. *Food Biotechnol*. 1996; 10: 75 - 92.

17. Savita V Phatak and Mohan R Heble. Rosmarinic Acid Synthesis in Shoot Cultures of *Mentha arvensis. Indian J. Biotechnol*. 2002; 9: 381 - 5.

18. Elmasta M, Drirtas I, Isildak O and Aboul-Enein HY. Antioxidant activity of S-Carone isolated from Spearmint (*Mentha Spicata* L.). *Liquid Chromato Related Technol*. 2006; 29 (10): 1465 - 75.

19. Arauj C and Leon L. Biological activities of *Curcuma longa* L. *Rio de Janeiro* 2001; 96 (5): 723 - 8.

20. Goyer A. Thiamine in plants: aspectsof its metabolism and functions. *Phytochem*. 2010; 71: 1615 - 16.

21. Vahdatpour1 F, Mashayekhi K and zirkuhi M. Investigation of ontioxidant effect turmeric in comparing with active coal and ascorbic acid in cultural medium of Ulmas pavrifolia Jasq. Callus. *J. Plant Production* 2009; 16: 2.

The Effect of Antioxidant Compounds and Media on Biosynthesis of Limiter Phenolic Compounds During *In vitro* Culture of *Mentha arvensis* L.

Ghezelbash S (M.Sc.)[1], Qaderi A (Ph.D.)[2], Bodaghi H (Ph.D.)[1], Ghasimi hagh Z (Ph.D.)[1], Kashefi M (M.Sc.)[2], ZareKarizi AR (M.Sc.)[2*]

1- Department of Horticulture Science and Plant Protection, College of Agriculture, Shahrood University of Technology, Shahrood, Semnan, Iran
2- Medicinal Plant Research Center, Institute of Medicinal Plants, ACECR, Karaj, Iran
* Corresponding author: Medicinal Plant Research Center, Institute of Medicinal Plants, ACECR, Karaj, Iran
P.O.Box: 33651/66591
Tel: +98-26-34764010-9, Fax: +98-26-34764021
E-mail: amirrzare@gmail.com

Abstract

Background: Phenolic compounds are one of the most important classes of plant secondary metabolites that produced in response to environmental conditions. The concentrations and compounds of media have played a significant role in production of these compounds. Production of phenolic compounds in the medium reduces the chances of success in tissue culture process or complicates the process.

Objective: This study aimed to investigate the effect of various antioxidants and media on change in biosynthesis of phenolic compounds in callus culture of *Mentha arvensis* L

Methods: leaves were cultured on MS medium supplemented with 2,4-D, NAA, BAP and KIN for callus induction. After selection of the best medium for callus induction, calli were subculture on MS and B5 media in combination with different concentration of Activated charcoal, Citric acid, Ascorbic acid, Turmeric and polyvinylpyrrolidone (PVP) for study of phenolic compounds. The amounts of phenolic compounds in callus and media were analyzed by spectrophotometer.

Results: The maximum callus fresh weight (3.56 gr) and dry weight (1.88 gr) were obtained in 0.5 mg/l 2,4-D. Activitated charcoal, citric acid, Ascorbic acid, PVP, have not significant effects on production of phenolic compounds whereas, both concentrations of Turmeric have significant effect. The highest level of phenol (127 ml/µg) in media and the lowest level (72.9 ml/µg) of phenol in callus was observed in media with 1000 mg/l of Turmeric.

Conclusion: Turmeric will be assisting a significant effect on release and absorption of phenolic compounds in tissue culture medium. This study could be contributed as an inexpensive and practical for callus induction and also could applied for production of phenolic compounds *in vitro* plant secondary metabolites production.

Keywords: *Mentha arvensis*, Antioxidants, Callus, Phenolic compounds, Turmeric