مجله بیوتکنولوژی کشاورزی (دوره 4، شماره 2، پاییز و زمستان 1391)

بررسی میزان فنول کل در گیاه چای کوهی (*Stachys lavandulifolia* Vahi) از طریق کشت کالوس و امکان افزایش آن با استفاده از محرک ها

بیلال مهربانی[1]، سنبل ناظری[2*]، خسرو پیری[3]

1- فارغ التحصیل کارشناسی ارشد گروه بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه بوعلی سینا، همدان

2- استادیار گروه بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه بوعلی سینا، همدان

3- دانشیار گروه بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه بوعلی سینا، همدان

تاریخ دریافت: 1390/9/20، تاریخ پذیرش: 1391/3/16

چکیده

گزارشات متعدد نشان داده است که گیاهان در شرایط درون شیشه ای قادر به تولید متابولیت‌های ثانویه ارزشمند از نظر داروئی مانند ترکیبات فنولی هستند. پلی فنول‌ها و یا ترکیبات فنولی دارای فعالیت آنتی اکسیدانی هستند. در طی سال‌های اخیر مطالعات داروشناسی نشان داده است که عصاره و ترکیبات حاصل از گیاهان متعلق به جنس *Stachys* خواص ضد باکتری، ضداکسیدان، ضد نفریت، ضد هپاتیت، ضد فشار خون پائین داشته و دارای اثرات آرام بخش هستند. *Stachys lavandulifulia* Vahi. با نام محلی چای کوهی، در مناطق مختلف ایران پراکندگی دارد. در این مطالعه، اثر غلظت‌های مختلف 2،4 -D بر میزان القاء کالوس در ریز نمونه‌های برگ و همچنین اثر دو محرک متیل جاسمونات و اسید سالیسیلیک در زمانهای مختلف (2، 10 و 20 روز پس از کشت) بر میزان تولید فنول در کالوس‌ها مورد بررسی قرار گرفتند. بهترین غلظت جهت القاء و رشد کالوس در 1 و2 میلی گرم در لیتر2،4-D مشاهده شد. نتایج حاصل از بکارگیری محرک‌ها نشان داد که تفاوت معنی داری در میزان فنول کل تولیدی بین تیمار محرک و شاهد وجود دارد. اثر زمان بر تولید فنول کل در این آزمایش معنی دار بود، در حالی‌که تفاوت معنی داری بین اثرات متقابل آنها با هم مشاهده نگردید. بیشترین میزان فنول در تیمار دارای 10 میکرومولار متیل جاسمونات و بعد از گذشت 10 روز از کشت حاصل گردید.

واژه‌های کلیدی: *چای کوهی، کالوس، فنول کل، متیل جاسمونات و اسید سالیسیلیک.*

* نویسنده مسئول: سنبل ناظری تلفن: 09183191565 E-mail: Snblnazeri@ yahoo.com

مقدمه

خانواده نعنائیان با 220 جنس و 400 گونه در دنیا، تقریبا پراکنش جهانی داشته و یکی از بزرگترین و مهمترین خانواده های گیاهی محسوب می‌شود. در ایران 46 جنس و410 گونه و زیر گونه از این خانواده گزارش شده است. 270 گونه از جنس *Stachys* متعلق به خانواده نعنائیان گزارش شده است که در ایران 34 گونه از آن وجود دارد. از این 34 گونه 13 گونه بومی هستند (Mozaffarian, 1996). گونه‌های این جنس در طب سنتی قدیم در درمان تومورهای جنسی، تصلب شرائین، التهاب و سرطان معده مورد استفاده قرار گرفته است. این جنس اثر آرام بخشی داشته و دارای خواص ضد باکتری، ضد التهاب، ضد استرس و اضطراب است (Javidnia *et al*., 2004). فلاونوئیدها، کوئینن‌ها، اسیدهای فنولیک و دی-ترپن‌ها متابولیت‌های ثانویه موجود در گونه‌های مختلف این جنس هستند (Rabbani *et al*., 2005). چای کوهی گیاه دارویی مهم و بومی ایران است. این گیاه در ارتفاع کم ومتوسط رویش دارد و در بیشتر مناطق ایران، مانند همدان، دیده می شود (Babakhanlo, 1998). این گیاه در ایران با نام‌های چای کوهی، گل کفته، کرک خرگوش و توکلیجه و در زبان انگلیسی به نام Betony معروف است (Kalvandi, 2003). از دم کرده بخش‌های هوائی این گیاه در ناراحتی های معدی و همچنین به عنوان آرام بخش، رفع بی‌خوابی و اضطراب استفاده می گردد (Javidnia et al, 2004). اثرات درمانی، آرام بخشی، ضد استرس و ضد التهاب این گیاه به ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی آن، که بخشی از متابولیت‌های ثانویه با فعالیت آنتی اکسیدانی هستند، نسبت داده می‌شود (Rabbani *et al*., 2005). تولید متابولیت‌های ثانویه ارزشمند با استفاده از تکنیک-های بیوتکنولوژی در کشت سلول یک روش جایگزین مناسب برای بهره برداری از ترکیبات گیاهی است (Namadeo *et al*., 2007)**.** عوامل مختلفی بر تولید و انباشته شدن متابولیت‌های ثانویه از طریق کشت بافت موثر هستند که برخی از آنها عبارتند از: محرک‌ها، لاین‌های سلولی پر محصول، میزان مواد غذائی و تنظیم کننده‌های رشد گیاهی. بکارگیری محرک‌ها که معمولا یکی از موفق‌ترین استراتژی‌ها در افزایش متابولیت‌های ثانویه هستند، به صورت استرس‌های شیمیائی و فیزیکی در تولید متابولیت‌های ثانویه‌ای که در حالت معمولی در غلظت پایینی تولید می شوند و یا تولید نمی شوند، مورد استفاده قرار می‌گیرند. محرک‌ها[1] به عنوان محرک‌های دفاعی و القاء کننده استرس در گیاه تعریف می شوند. الیسیتورها به صورت مستقیم و غیر مستقیم با فعال کردن ژن‌های مرتبط با بیوسنتز ترکیبات ثانویه سبب افزایش تولید این ترکیبات می‌گردند (Neumann *et al*., 2009). میزان اثر محرک‌ها بر تولید متابولیت‌های ثانویه در کشت بافت معمولا به غلظت اضافه شده و زمان وابسته

[1] -Elicitors

است (Wen Wan and Yong Wu, 2010). استرس‌های القاء شده توسط اسید جاسمونیک و استرهای آن به ویژه متیل جاسمونات در تولید متابولیت‌های ثانویه از جمله ترکیبات داروئی مانند آلکالوئیدها، آلفا توکوفرول، سیانیدین گلوکوزیدها و رسوراتول به طور گسترده مورد استفاده قرار گرفته‌اند. علاوه بر متیل جاسمونات، اسید سالیسیلیک نیز یکی از مولکول‌های محرک مهم است. اسید سالیسیلیک سیستم دفاعی گیاه را از طریق فعال‌سازی گروه مشخصی از ژن‌های مرتبط با دفاع و توسعه مقاومت سیستمیک تحریک می-کند. این اسید در تولید اسید رزمارینیک در کشت ریشه موئین گیاه *Ocimum basilicum* L. و کورکومین در کشت سلولی *Catharanthus roseus* مورد استفاده قرار گرفته است (Matkowski, 2008).

با توجه به ارزش داروئی و اقتصادی ترکیبات فنولی که طیف وسیعی از فعالیت‌های بیولوژیکی مانند فعالیت ضد باکتری، ضد ویروسی و ضد سرطانی را شامل می شوند، تحقیق در زمینه شرایط مناسب تولید آن ضروری به نظر می‌رسد (Taveira *et al*., 2010). به علت اینکه کشت سلول های گیاهی یک روش مناسب و مهم برای تولید متابولیت های ثانویه با ارزش در اکثر گیاهان است (Ravishandra *et al*., 1999)، در این تحقیق اثر محرک‌ها در زمان‌های مختلف بر میزان فنول کل موجود در گیاه چای کوهی بررسی گردید.

مواد وروش‌ها

مواد گیاهی

در پائیز سال 1388، ریزوم و بخش‌های هوائی گیاه چای کوهی، از باغ گیاهان داروئی دانشگاه بوعلی سینا همدان جمع‌آوری گردید. ریزوم‌ها، جهت رشد، به گلدان منتقل و در گلخانه نگه‌داری شدند. آبیاری گلدان‌ها دو روز یک بار انجام شد. نمونه‌ها از برگ های جوان گیاه چای کوهی یک ماهه تهیه گردیدند. قبل از ضد عفونی، نمونه‌ها با آب شهری به مدت یک دقیقه شستشو شدند، تا مقداری از آلودگی‌های سطحی آن کمتر گردد. سپس، نمونه‌ها در اتانول 70 درصد به مدت یک دقیقه قرار گرفته و با آب مقطر استریل شستشو شدند. در مرحله بعد، نمونه‌ها در دو تیمار محلول هیپو کلریت سدیم 1درصد و2 درصد (کلر فعال حداقل 5 درصد(v/v)) به مدت ده دقیقه قرار داده شدند. به علت کرک‌دار بودن نمونه‌ها، دو الی سه قطره توین 20، جهت افزایش سطح تماس وضدعفونی بهتر، به محلول هیپوکلریت سدیم اضافه گردیده و نمونه‌ها در تمام مراحل ضد عفونی تکان داده شدند. در نهایت نمونه‌ها با آب مقطر استریل سه بار و در کل به مدت ده دقیقه شستشو شدند. تمام مراحل ضدعفونی نمونه‌ها در زیر هود لامینار انجام گردید.

تهیه ریز نمونه و محیط کشت جهت القاء کالوس

به منظور القاء کالوس، از محیط کشت MS (Murashige & Skoog, 1962) حاوی میواینوسیتول (100 میلی گرم در لیتر) و اسید آسکوربیک (1 میلی مولار) و غلظت‌های مختلف 2،4-D (0، 1، 2 و 4 میلی گرم بر لیتر) استفاده شد. برگ‌های ضد عفونی شده در اندازه یک سانتی‌متر مربع بریده شده ودر هر پتری دیش 5 ریز نمونه (در 3 تکرار) قرارداده شدند. پتری ها به دمای 24 درجه سانتیگراد در تاریکی منتقل گردیدند. نمونه-های کشت شده هر دو روز یک بار مورد بررسی قرار گرفته و بعد از گذشت بیست روز، نمونه‌ها در محیط قبلی واکشت شدند. به منظور تکثیر کالوس، کالوس‌های ایجاد شده به محیط کشت MS حاوی 2 میلی گرم درلیتر هورمون 2،4-D منتقل شدند. کالوس‌ها بعد از 4 الی 5 بار واکشت (با فاصله زمانی بیست روز) جهت بررسی میزان فنول کل مورد استفاده قرار گرفتند.

اضافه کردن محرک‌ها در کشت کالوس

به منظور بررسی اثر محرک‌ها بر میزان ترکیبات فنولی، غلظت‌های مختلف (0، ۵۰، ۱۰۰ و 100 میکرومولار) اسید سالیسیلیک و متیل جاسمونات مورد ارزیابی قرار گرفتند. این محرک‌ها پس از فیلتر- استریل شدن (فیلتر 0/2 میکرومتر) به محیط کشت اضافه گردیدند. تیمارهای فوق در سه تکرار و در شرایط تاریکی ودمای 24 درجه سانتیگراد در اتاق رشد اعمال گردیدند.

تهیه عصاره متانولی از نمونه‌های کالوس

عصاره‌گیری در زمان‌های 2، 10 و 20 روز پس از کشت با استفاده از روش ماریگو (Marigo, 1973) انجام شد. قطعات کالوس در متانول (1:2 (W/V)) با استفاده از هاون کاملا له شدند. عصاره‌ها بر روی یخ به مدت زمان یک ساعت نگه‌داری و سپس در دور 3000 به مدت 40 دقیقه در دمای 4 درجه سانتیگراد سانتریفوژ گردیدند. فاز بالایی محلول در یخچال در دمای 22- درجه سانتیگراد، تازمان استفاده نگهداری گردید.

تعیین میزان فنول کل عصاره‌های حاصل از کالوس

فنول کل توسط شناساگر فولین سیوکالتو مشخص گردید (Slinkard and Singleton, 1977). بدین صورت که، یک میلی لیتر متانول به یک میلی لیتر از عصاره‌ها اضافه گردید. سپس مخلوط فوق با 5 میلی لیتر آب مقطر و یک میلی لیتر شناساگر فولین مخلوط گردید. بعد از 3 دقیقه،3 میلی لیتر Na_2CO_3 2 درصد به آن اضافه گردید و این مخلوط به مدت 2 ساعت بر روی شیکر قرار گرفت. سپس میزان جذب در طول موج 760 نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر(مدل cary-100 cons) اندازه‌گیری شد. منحنی استاندارد

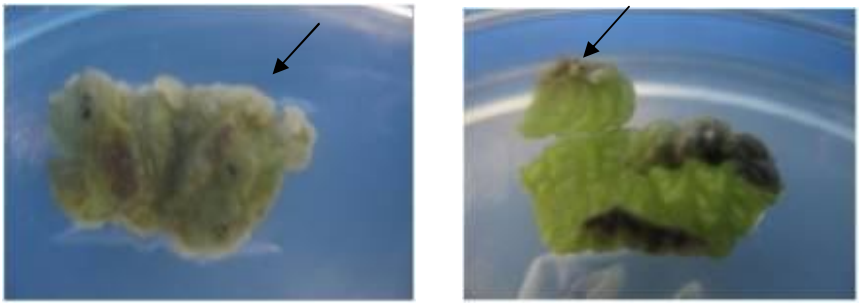
توسط غلظت‌های 0، 50، 100، 150، 200، 250 میلی گرم بر لیتر با استفاده از محلول اسید گالیک تهیه گردید (R^2 =۰/۹۷۷ ، X + ۰/۰۰۷ =y). مقدار فنول کل معادل با میلی گرم اسید گالیک بر گرم وزن تر بیان شد. تجزیه آماری با استفاده از نرم افزار SAS انجام گرفت. از آزمون t در سطح یک درصد جهت ارزیابی مقایسه میانگین تیمارها در صفت وزن تر و وزن خشک کالوس تیمارها، از آزمون چند دامنه دانکن برای مقایسه میانگین‌ها واز طرح کرت‌های خرد شده در زمان به منظور بررسی اثر زمان و محرک‌ها بر تولید فنول در کشت نیمه جامد استفاده شد.

نتایج

بررسی القاء کالوس در محیط کشت

ضد عفونی نمونه‌ها در محلول 2 درصد هیپو کلریت سدیم سبب مرگ بافت‌ها گردید. در این تیمار رنگ بافت‌ها از سبز به سبز روشن و بی‌رنگ تغییر کردند. رنگ ظاهری بافت نمونه‌هائی که در هیپوکلریت سدیم یک درصد ضد عفونی شده بودند تغییری پیدا نکرد، در نتیجه در ادامه آزمایشات از غلظت یک درصد هیپوکلریت سدیم برای ضد عفونی بافت‌ها استفاده گردید.

بعد از پنج روز از انتقال نمونه‌ها به محیط کشت، از حاشیه قسمت‌های برش خورده علائم قهوه ای شدن مشاهده گردید (شکل 1). میزان قهوه‌ای شدن در تیمار 4 میلی گرم در لیترD-۲،٤ بیش از سایر غلظت‌ها بود. هیچ القاءکالوسی در تیمار شاهد و تیمار 4 میلی گرم در لیترD-۲،٤ مشاهده نگردید. بعد از 13 روز، کالوس‌زائی در تیمارهای 1 و 2 میلی گرم در لیترD-۲،٤ از ناحیه زخمی برگ و بافت‌های آوندی گیاه مشاهده شد. القاء کالوس در ریز نمونه‌ها در تیمار 1 میلی گرم در لیترD-۲،٤ به میزان 90 درصد و در تیمار 2 میلی گرم در لیترD-۲،٤ به میزان 94 درصد ارزیابی گردید. از آزمون t در سطح یک درصد جهت مقایسه میانگین تیمارها در صفت وزن تر و وزن خشک کالوس استفاده شد. در وزن تر و خشک کالوس بین تیمار1و 2 میلی گرم در لیتر D-۲،٤ تفاوت معنی داری از نظر آماری مشاهده نگردید (جدول 1). در ادامه آزمایشات، واکشت وتکثیر کالوس در محیط حاوی غلظت 2 میلی گرم در لیتر صورت گرفت. کالوس‌ها در واکشت‌های اول شکننده وترد بودند. بعد از چند بار واکشت، کالوس‌های تولید شده نسبت به واکشت اولیه نرم‌تر بودند (شکل 2).



شکل 1- القاء کالوس از ریز نمونه‌های برگ گیاه چای کوهی بعد از 13 روز.

Figure 1- Callus induction from *Stachys lavandulifolia* leaf explants after 13 days.

شکل 2- تشکیل کالوس از ریز نمونه های برگی گیاه چای کوهی در محیط حاوي 2 میلی گرم در لیتر. 2،4-D.

Figure 2- Callus formation from *Stachys lavandulifolia* leaf explants on medium contain 2 mg/L 2,4-D .

جدول 1- پارامترهای اندازه گیری شده در محیط القاء کالوس.

Table 1- The measured parameters in the induction callus medium using 2,4-D.

وزن خشک Dry weight (Mg)	وزن تر Fresh weight (Mg)	درصد القاء کالوس Callus induction (%)	تیمار (میلی گرم بر لیتر D-٢،٤) Treatment (Mg/L 2,4-D)
0	0	0	0 (control)
40.76 ns	648 ns	90	1
35.54 ns	425 ns	94	2
0	0	0	4

ns: Non-significant At the %1 level.

بررسی میزان فنول کل در کالوس

نتایج میزان فنول کل کالوس با استفاده از طرح کرت‌های خرد شده در زمان مورد ارزیابی قرار گرفتند (جدول 2). اثرهای متقابل تکرار× زمان و الیسیتور× زمان از نظر آماری معنی دار نبودند. ولی اثر عامل الیسیتور و عامل زمان در سطح 1 درصد معنی دار بودند.

در مقایسه میانگین‌های اثر عامل الیسیتور بر تولید فنول، بیشترین میزان فنول مربوط به تیمار 10 میکرو مول متیل جاسمونات، برابر 0/81 میلی گرم اسید گالیک بر گرم وزن تر بود (شکل 3). افزایش غلظت متیل جاسمونات از 10 به 100 میکرو مول سبب کاهش میزان فنول از 0/81 به 0/53 میلی گرم اسید گالیک بر وزن تر شد. هر چند افزایش غلظت اسید سالیسیلیک از 10 به 50 میکرو مول سبب افزایش میزان فنول گردید، اما غلظت های بیشتر آن سبب کاهش فنول شد. بیشترین مقدار فنول در تیمار اسید سالیسیلیک برابر 0/56 میلی گرم اسید گالیک بر گرم وزن تر، در غلظت 50 میکرو مول به دست آمد، هر چند از نظر آماری تفاوت معنی داری بین تیمارهای مختلف آن مشاهده نگردید. در بررسی اثر عامل زمان مشخص گردید که بیشترین میزان فنول کل (0/72 میلی گرم بر گرم وزن تر) در روز دهم پس از کشت به دست آمد، که تفاوت معنی داری با دو زمان دیگر داشت. میزان فنول تا روز دهم در محیط افزایش پیدا کرد و از روز دهم به بعد میزان آن کاهش یافت (شکل4).

بحث

ارزیابی القاء کالوس در محیط کشت

با توجه به نتایج بدست آمده از القاءکالوس در گیاه چای کوهی، حضور اکسین در القاء ورشد کالوس ضروری به نظر می رسد. در این تحقیق غلظت 1 و 2 میلی گرم درلیتر 2،4-D مناسب‌ترین غلظت‌ها بودند. Yang *et al.* (2008) القاء کالوس از نمونه‌های برگ *Leonurus heterophylus* Sw. در غلظت‌های مختلف 2،4–D (0/5-2 میلی گرم در لیتر) را مورد بررسی قرار دادند که بیشترین میزان القاءکالوس در 2 میلی گرم در لیتر به دست آمد. نتایج فوق با نتایج بدست آمده مطابقت دارد. همچنین Nicolaeva *et al.* (2009) اثر 2،4-D برمیزان القاءکالوس در نمونه‌های برگ گیاه چای را مورد بررسی قرار دادند. آنها مشاهده کردند که افزایش غلظت این هورمون باعث کاهش رشد و القاء کالوس می‌گردد. Sayd *et al.* (2010) القاءکالوس در نمونه‌های برگ گیاه *Gardinia jasminiodes* را در غلظت‌های مختلف 2،4-D (1، 2 و3 میلی گرم در لیتر) بررسی کردند. آنها بیشترین میزان القاء کالوس را در غلظت 2 میلی گرم بر لیتر به دست آوردند که تفاوت معنی داری با غلظت 1 میلی گرم در لیتر نداشته و با نتایج بدست آمده مطابقت دارد. القاءکالوس در گیاه *Ocimum sanctum* توسط Lim *et al.* (2009) در غلظت‌های مختلف 2،4-D (1، 3 و 5 میلی گرم بر لیتر) مورد بررسی قرار گرفت. نتایج حاصل

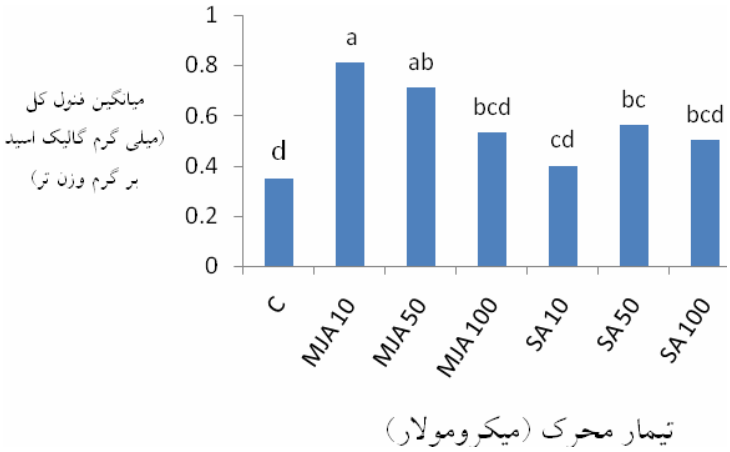
از این تحقیق نشان داد که افزایش غلظت 2،4-D سبب افزایش در میزان القاءکالوس می گردد، اما تفاوت معنی داری بین غلظت‌های مختلف وجود ندارد. اما درتحقیق حاضر افزایش غلظت 2،4-D در 4 میلی گرم درلیتر باعث قهوه‌ای شدن و مرگ ریز نمونه‌ها شد. افزایش غلظت اکسین در بافت‌ها، فعالیت آنزیم 1- آمینوسیکلوپروپان 1- کربوکسیلیک اسید سنتاز (ACC) را افزایش می‌دهد که با افزایش تولید اتیلن همراه بوده و افزایش تولید اتیلن، خود باعث پیری در بافت‌ها می‌شود (Lim *et al*., 2009).

جدول 2- تجزیه واریانس فنول کل در کالوس حاصل از کشت نیمه جامد با استفاده از طرح کرت‌های خرد شده، در زمان که اثر دو نوع محرک (متیل جاسمونات و اسید سالیسیلیک) در 4 غلظت و 3 تکرار و 3 زمان مختلف مورد بررسی قرار گرفته است.

Table 2- The analysis of variance of total phenol in semisolid medium in a factorial experiment based on split-plot in time design were evaluated the effect of two elicitors (metyl jasmonate and salisylic acid) in four concentrations and three repeating and three different time.

F F Value	میانگین مربعات Mean Square	درجه آزادی degree of freedom	منبع تغییرات Source of variation
12.98**	0.236	6	عامل الیسیتور Elicitor
. . . . .	0.018	14	خطای a Error
24.66**	0.496	2	عامل زمان Time
1.0813 ns	0.022	12	الیسیتور* زمان Time*Elicitor
. . . . .	0.02	28	خطای b Error

** :در سطح 1٪ تفاوت معنی دار است (p< 0/01)، ns :تفاوت معنی دار نیست.

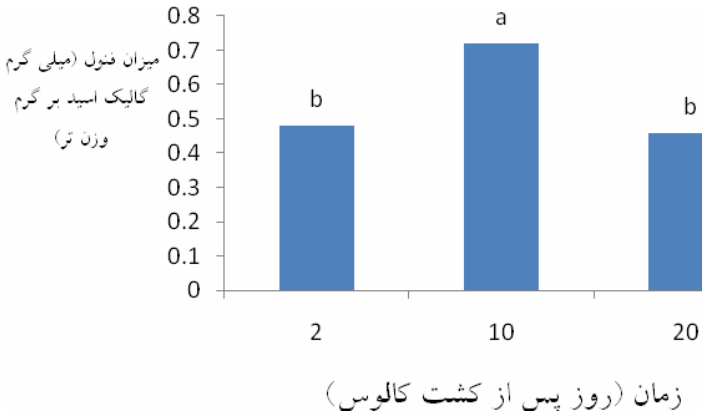


شکل 3- مقایسه میانگین اثر الیسیتور های متیل جاسمونات و اسید سالیسیلیک در تولید فنول در کشت کالوس گیاه چای کوهی.

SA: اسید سالیسیلیک، MJA: متیل جاسمونات ، c : کنترل . حروف متفاوت نشان دهنده تفاوت معنی دار بین بین میانگین ها در سطح 1% است.

Figure 3- The mean comparison of Methyl Jasmonate and Salicylic Acid elicitors on total phenol in *Stachys lavandulifolia* callus calture.

SA: Salicylic Acid, MJA: Salicylic Acid. Means with different superscripts are significantly different (P<0.01).



شکل 4- مقایسه میانگین اثر زمان بر میزان فنول کل (میلی گرم گالیک اسید بر گرم وزن تر) در کشت کالوس گیاه چای کوهی.

حروف متفاوت نشان دهنده تفاوت معنی دار بین بین میانگین ها در سطح 1% است.

Figure 4- The mean comparison t of time on total phenol (Mgr Gallic Acid equivalent/g fresh weight) in *Stachys lavandulifolia* callus calture.

Means with different superscripts are significantly different (P<0.01).

ارزیابی میزان فنول کل در کشت کالوس

بررسی میزان تولید ترکیبات فنولی در کشت کالوس گیاه چای کوهی نشان می دهد که زمان، غلظت و نوع محرک بر افزایش ترکیبات فنولی در کشت کالوس تاثیر دارد. در پژوهشی، Matkowski (2008) گزارش کرده است که در شرایط درون شیشه‌ای تولید ترکیبات می‌تواند توسط محرک‌هایی مانند متیل جاسمونات و اسید سالیسیلیک در سلول تحریک شده و افزایش یابد. در بررسی اثر غلظت-های مختلف محرک‌ها (بر روی میزان تولید آجمالیسین[۲] درکشت سلولی *Catharantous roseus* افزایش غلظت اثر معکوسی بر تولید آجمالیسین داشت (Namadeo, 2007). در تحقیق فوق همچنین اثر زمان (1 تا 5 روز) بر میزان تولید این ترکیب مورد بررسی قرار گرفت که بیشترین میزان تولید مربوط به 2 روز پس از هم‌کشتی سلول‌ها با محرک بود. همچنین بررسی اثر غلظت-های مختلف اسید جاسمونیک بر میزان تولید ترکیبات فنولی در گیاه *Hypericum perforatum L.* نشان داده است که افزایش غلظت محرک سبب کاهش میزان تولید این ترکیبات در غلظت‌های بالاتر از 100 میکرو مول می گردد (Sonja *et al.*, 2007). گروه فوق نتیجه گرفتند که در غلظت-های بالاتر، به خصوص در مواقعی که سلول مدت زمان بیشتری در معرض محرک‌ها باشد، میزان قهوه ای شدن و در نتیجه قابلیت زیست پذیری سلول‌ها کم می‌شود و در نهایت باعث تولید کمتر ترکیبات فنولی می‌گردد. در تحقیق حاضر نیز بنظر می‌رسد که غلظت‌های بالای محرک‌ها اثراتی مشابه با نتایج فوق بر سلول ها داشته باشد، به این علت که قهوه ای شدن سلول‌ها در غلظت‌های بالای محرک‌ها قابل مشاهده بود. گزارش شده است که غلظت‌های بالای محرک‌ها واکنش فوق حساسیت را القاء می-کند که منجر به مرگ سلول‌ها می‌گردد در حالیکه غلظت‌های پائین سبب القاء واکنش‌های دفاعی می-گردد (Namadeo, 2007). بر این اساس، افزایش تولید و تجمع ترکیبات فنولی مشاهده شده در کشت سلولی گیاه چای کوهی را می‌توان به پاسخ-های دفاعی که توسط این محرک‌ها القاء می‌گردد نسبت داد. تحقیق حاضر نشان می‌دهد که در شرایط کنترل شده از کشت که به عنوان یک منبع تولید و افزایش ترکیبات ثانویه استفاده می‌گردد می‌توان با استفاده از محرک‌ها تا اندازه‌ای میزان ترکیبات فنولی و حتی ترکیبات فنولی خاص را تغییر داد.

[2] Ajmalicine

منابع

Babakhanlo P, Sefid Kon F (1998). Researches medicinal and aromatic plant. Researches Institute of Forests and Rangelands. Pp: 120 (In Farsi).

Javidnia K, Mojab F, Mojahedi SA (2004). Chemical constituents of the essential oil of *Stachys lavandulifolia* Vahl from Iran. Iranian Journal of Pharmaceutical Research. 3:61-63 (In Farsi).

Kalvandi, R (2003). Final report of investigate project of Encyclopedia information of medicinal plants in Hamedan province. unpublished. 2: 666-668 (In Farsi).

Lim Z.X, Ling A. P.K, and Husseni, S (2009). Callus induction of *Ocimum sancatum* and estimation of its total flavonoids content. Asian Journal of Agriculture Science. 1: 55-61.

Marigo, G (1973). Sur une méthode de fractionnement et d'estimation des composesphenoliques chez les vegetaux. Analusis. 2: 106–110.

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

Mozaffarian, V (1996). A dictionary of Iranian Plant names. Tehran: Farhang Moaser. Pp: 522 (In Farsi).

Murashige T, Skoog F (1962). A revised medium forrapid growth and bioassays with Tobacco tissue cultures. Plant Physiology. 15:473-497.

Namadeo AG (2007). Plant cell Elicitation for production of secondary metabolites— A review. Pharmacogenocy Review. 1:154-160.

Neumann K.H, Kumar A, Imani J (2009). Plant cell and tissue culture. A tool in biotechnology. Springer- Verlag Berlin Heidelberg. Pp:333.

Nicolaeva T.N, Zagoskina, N.V and Zaprometov, M.N (2009). Production of phenolic compounds in callus cultures of Tea plant under the effect of 2,4-D and BA. Russin Journal of Plant Physiology. 56: 45-49.

Rabbani M, Sajjadi SE, Jalali A (2005). Hydroalcohol extract and fractions of *Stachy lavandulifolia* Vahl: Effects on spontaneous motor activity and elevated plus-maze behaviour. Phytotherapy Reaserch. 19: 854–858.

Ravishandera GA, Bhyalakshmi N, Ramachandra Rao S (1999). Production of food additive. Biotechnology:Secondary metabolites. New Dehli:Oxford IBH. 89-110.

Sayd SS, Taie AHA, Taha S (2010). Micropropagation, antioxidant activity, total phenolic and flavonoid content of *Gardenia Jasminoide* ellis as affected by growth regulators. International Journal of Academic Research. 2: 184-191.

Slinkard K, Singleton V.L (1977). Total phenol analyses: automation and comparison with manual methods. American Journal Enology and Viticulture. 28: 49–55.

Sonja G, Maury, S Delaunay, A Spasenoski, M Joseph, C Hagege, D (2007). Jasmonic acid elicitation of *Hypericum perforatum* L. cell suspensions and effects on the production of phenylpropanoids and naphtodianthrones. Plant Cell Tissue Organ Culture. 89:1–13.

Taveira M, Ferreres F, Pereira MD, Sousa C, Andrade B.P, Martins A, Pereira AJ, Valentao, P (2009). *In vitro* culture of *Brassica oeracea* L.Var . Costata Dc: potential plant bioreactor for antioxidant phenolic compounds. Journal of Agricultural and food chemistry. 57:1247-1252.

Wen Wang J, Yong Wu J (2010). Tanshinone biosynthesis in *Salvia miltiorrhiza* and production in plant tissue cultures. Application Microbiology Biotechnology. 88:437-449.

Yang J, Gong ZC, Tan X (2008). Induction of callus and extraction of alkaloid from Yimu Cao (*Leonurus hetrophylus* Sw.) culture. African Journal of biotechnology. 7:1157-1162.

Evaluation of total produced phenol in Chaei Koohi (*Stachys lavandulifolia* Vahi) callus culture and possibility of its enhancement using Elicitors

Mehrabani B.[1], Nazeri S.[*2], Piri K.[3]

1- M.Sc. Graduated student of agricaltural biotechnology Dept., Faculty of agriculture, Bu-Ali Sina university, Hamedan, Iran.
2- Assistant Professor of agricultural biotechnology Dept., Faculty of agriculture, Bu-Ali Sina university, Hamedan, Iran.
3- Associate Professor of agricultural biotechnology Dept., Faculty of agriculture, Bu-Ali Sina university, Hamedan, Iran.

Abstract

Many reports have demonstrated that many medicinal valuable secondary metabolites such as Phenolic compounds can be produced and accumulated by in plants *in vitro* culture. Polyphenols or phenolic compounds have potentially antioxidant activity. In past few years, pharmacological studies have confirmed that components and extracts of plants belong to the genus Stachys exert significant antibacterial, antitoxidant, antinephritic, antihepatitis, hypotencive and anxiety effects. *Stachys lavandulifulia* Vahi, popularly named "Chai Koohi" is widely distributed in different regions of Iran. In this study, effect of different concentrations of 2,4-D, on callus induction and effect of two elicitors (metyl jasmonate and salisylic acid) in different time points(2, 10 and 20 days after culture) on the level of total phenol were evaluated in callus. The results showed that, the best concentration of callus induction and growth was at the 1 and 2 mg/l 2,4-D. Also the effects of elicitors were significant in total phenol production. Cultivation time indicate significant difference on total phenol production, whereas interaction between time and elisitore was not significant. The highest total phenol concentration was found in the treatment with 10 µm of metyl jasmonate, after 10 days of culture.

Key Words: *Stachys lavandulifolia* Vahi., *callus culture, total phenol, Elicitors*

.

[*] Corresponding Author: Nazeri S. Tel: 09183191565 Email: Snblnazeri@ yahoo.com