Iranian Journal of Horticultural Science
Vol 52, No 1, Spring 2021 (61-68)
DOI: 10.22059/ijhs.2018.232384.1243

علوم باغبانی ایران
دورهٔ ۵۲، شمارهٔ ۱، بهار ۱۴۰۰ (ص ۶۸-۶۱)

القای کالوس و مطالعه تولید رزمارینیک‌اسید در کشت کالوس مریم‌گلی مزرعه‌روی (*Salvia nemorosa* L.)

فاطمه خوش‌سخن[۱]، مصباح بابالار[۲*]، سید علیرضا سلامی[۳]، محمدحسین میرجلیلی[٤] و رضا شیخ اکبری‌مهر[٥]
۱، ۲ و ۳. دانشجوی دکتری، استاد و دانشیار، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، کرج، ایران
٤. دانشیار، پژوهشکده گیاهان دارویی، دانشگاه شهیدبهشتی، تهران، ایران
٥. استادیار، دانشکده علوم پایه، دانشگاه قم، قم، ایران
(تاریخ دریافت: ۱۳۹٦/۲/۱۲ - تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۲/۲۸)

چکیده

رزمارینیک‌اسید ترکیب دارویی مهم و دارای فعالیت‌های بیولوژیکی متعددی همچون آنتی‌اکسیدانی، آنتی‌موتاژن، ضدباکتری، ضدالتهاب، ضد حساسیت و ضدآلزایمر می‌باشد. در این پژوهش کالوس‌زایی و میزان تجمع رزمارینیک‌اسید در گیاه مریم‌گلی (کالوس، گیاهچه سترون و برگ گیاه مادری) بررسی شد. برای این منظور ریزنمونه‌های برگی در محیط کشت MS با ترکیبات هورمونی شامل 2,4-D (mgL^{-1}) صفر، ۰/۵، ۱، ۲ و ۵) و دو نوع سیتوکینین BA و Kin با غلظت‌های (mgL^{-1} ۰/۵، ۱ و ۲) کشت گردید و درصد کالوس‌زایی، وزن تر، بافت و رنگ کالوس ارزیابی شدند. بیشترین درصد کالوس‌زایی (۱۰۰٪) در ۳ تیمار حاوی 2,4-D mgL^{-1} ۰/۵ و BA mgL^{-1} ۲، 2,4-D mgL^{-1} ۱ و BA mgL^{-1} ۱، 2,4-D mgL^{-1}۲ و Kin mgL^{-1} ۲ مشاهده شد. هم‌چنین بالاترین وزن‌تر کالوس (۱/۳ g) در محیط کشت MS دارای 2,4-D mgL^{-1}۱ و BA mgL^{-1} ۱ به‌دست آمد. میزان رزمارینیک‌اسید کالوس‌ها هم مقدار $mg\ gDW^{-1}$ ۱/۵ بود که به‌طور معنی‌داری دو برابر بیشتر از مقدار رزمارینیک‌اسید برگ‌های گیاه بود. بنابراین کشت کالوس مریم‌گلی مزرعه‌روی در محیط کشت MS دارای 2,4-D mgL^{-1}۱ و BA mgL^{-1} ۱ را می توان به‌عنوان روشی جایگزین و سودمند جهت تولید رزمارینیک‌اسید به‌کار برد.

واژه‌های کلیدی: تنظیم کننده‌های رشد، خانواده نعناع، رزمارینیک‌اسید، کشت کالوس، مریم‌گلی.

Callus induction and rosmarinic acid accumulation in callus culture of *Salvia nemorosa* L.

Fatemeh Khoshsokhan[1], Mesbah Babalar[2*], Seyed Alireza Salami[3], Mohamadhossein Mirjalili[4] and Reza Sheikhakbari-Mehr[5]
1, 2, 3. Ph. D. Candidate, Professor and Associate Professor, University College of Agriculture & Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran
4. Associate Professor, Research Institute of Medicinal Plants, Shahid Beheshti University, Tehran, Iran
5. Assistant Professor, Faculty of Science, University of Qom, Qom, Iran
(Received: May 02, 2017 - Accepted: May 18, 2018)

ABSTRACT

Rosmarinic acid (RA) is a well known valuable phenolic compound because of its wide spectrum of biological activities such as antimicrobial, anti-inflammatory, antimutagenic, antioxidant and cancer chemoprevention. In the present study, *in vitro* callus induction and production of RA in *Salvia nemorosa* (callus culture, *in vitro* seedling, mother plant) have been studied. For this purpose, callus induction was achieved from young leaf explants cultured on MS medium supplemented with different concentrations of 2,4-D (0, 0.5, 1, 2 and 5 mgL^{-1}) solely or in combination with BAP and Kin (0.5, 1 and 2 mgL^{-1}) and the number of different traits such as percentage of callus induction, fresh weight and type of callus (texture and color) were evaluated. The highest percentage of callus induction was achieved from 3 treatment supplemented by 5 mgL^{-1} 2,4-D+ 2 mgL^{-1} BAP, 1 mgL^{-1} 2,4-D + 1 mgL^{-1} BAP and 2 mgL^{-1} 2,4-D + 2 mgL^{-1} Kin. Also The best fresh weight (1.31g) were obtained in MS medium containing 1 mgL^{-1} BAP and 1 mgL^{-1} 2,4-D. According to the result the callus has the highest RA content with a value of 1.5 mg gdw^{-1} and RA accumulate in callus to amounts (2 fold) much higher than plants under field conditions. According our findings the callus culture of *Salvia nemorosa* L. on MS medium containing 1 mgL^{-1} BAP and 1 mgL^{-1} 2,4-D provided useful method for RA production.

Keywords: Callus culture, Lamiaceae, plant growth regulators, rosmarinic acid, *Salvia.*

* Corresponding author E-mail: mbabalar@ut.ac.ir

مقدمه

ویژگی دارویی بودن برخی گیاهان به‌واسطه وجود ترکیبات متنوعی است که متابولیت‌های ثانویه نامیده می‌شوند (Wyk & Wink, 2004). برخی از این ترکیبات دارویی مانند دیجی‌توکسین (Digitoxin)، شیکونین (Shikonin) و داروهای ضدسرطان مانند وین بلاستین (Vinblastine)، وین‌کریستین (Vincristine) و تاکسول (Taxol) از ارزش اقتصادی بالایی برخوردارند و قیمت آنها از چند دلار تا چند هزار دلار به ازای هر کیلوگرم تغییر می‌کند. از دیگر ترکیبات دارویی مهم که به آن توجه بسیاری شده و خواص دارویی آن از قبیل تأثیر مثبت آن بر آلزایمر مورد توجه قرار گرفته است، رزمارینیک‌اسید (Rosmarinic acid) می‌باشد. این ترکیب استرکافئیک‌اسید و ۳ و ۴ دی هیدروکسی فنیل استیک‌اسید (Ester of caffeic acid and 3,4-dihydroxyphenyl lactic acid) می‌باشد که اولین بار از برگ‌های گیاه رزماری (*Rosmarinus officinalis*) در سال ۱۹۵۸ توسط اسکارپاتی (Scarpati) جدا شد. این ترکیب در ۳۹ خانواده گیاهی مشاهده شده ولی عمدتاً در گیاهان خانواده نعناعیان و گل گاوزبان وجود دارد. رزمارینیک‌اسید فعالیت‌های بیولوژیکی متعددی همچون آنتی‌اکسیدانی، ضدجهش، ضدباکتری، ضدالتهاب و ضدحساسیت را دارد (Petersen *et al.*, 2009). خاصیت آنتی‌اکسیدانی رزمارینیک‌اسید حتی از ویتامین E بیشتر است و سبب کاهش آسیب‌های ناشی از رادیکال‌های آزاد می‌شود. این ماده از اکسیداسیون لیپوپروتئین‌هایی نظیر LDL (Low-density lipoprotein) جلوگیری می‌کند و خطرات ناشی از سرطان و تصلب شرایین را کاهش می‌دهد (Khojasteh *et al.*, 2014). بیوسنتز این ماده در گیاهان خانواده نعناعیان از جمله جنس مریم‌گلی (*Salvia*)، گونه‌های مریم‌گلی را به‌عنوان گزینه‌ای مناسب برای تولید و افزایش میزان رزمارینیک‌اسید معرفی می‌کند (Janicsak *et al.*, 1999). در ایران ۵۸ گونه از جنس مریم‌گلی وجود دارد که یکی از آنها گونه مریم‌گلی مزرعه‌روی (*Salvia nemorosa* L.) می باشد و در مناطق وسیعی از ایران مانند مناطق مرطوب درون مزارع و یا دامنه‌های کوهستانی در مناطق استپی، نواحی خزری و ایرانی و تورانی رویش دارد (Jamzad, 2012). این گیاه در کشور روسیه برای درمان بیماری‌های مختلفی مشابه گیاه مریم‌گلی (*S. officinalis*) کاربرد دارویی دارد. در کشور ترکیه برگ‌های گیاه مریم‌گلی برای بندآوردن خونریزی استفاده می‌شود (Takeda *et al.*, 1997). همچنین عصاره حاصل از این گیاه خاصیت ضددردی مشابه با داروهای مسکن نشان داده است (Hosseinzade & Amel, 2000). با توجه به نتایج به‌دست آمده از تحقیق Janicsak *et al.* (1999) در ارتباط با میزان رزمارینیک‌اسید گونه‌های مختلف مریم‌گلی که در آن گونه مزرعه‌روی را به‌عنوان گونه‌ای مطلوب برای تولید ترکیب دارویی رزمارینیک‌اسید معرفی کردند. بنابراین در این تحقیق گونه مریم‌گلی مزرعه‌روی جهت بهینه سازی کشت کالوس و تولید رزمارینیک‌اسید در نظر گرفته شد. امروزه تقاضای روبه‌رشد بازار برای محصولات طبیعی قابل تجدید، باعث شده است که کشت مواد گیاهی درون‌شیشه‌ای مورد توجه قرارگیرد و با در نظر گرفتن گیاهان به‌عنوان کارخانه بالقوه تولیدکننده محصولات بیوشیمیایی، زمینه تحقیقات جدیدی برای تولید متابولیت‌های ثانوی در شرایط درون‌شیشه‌ای ایجاد شود (Phillipson, 1990). علاوه بر این کشت بسیاری از گیاهان دارویی مشکل بوده و جمع‌آوری آنها از طبیعت را می‌طلبد که این اقدام، حیات گیاهان را به مخاطره می‌اندازد (Verporte *et al.*, 2002). در حال حاضر نگرانی‌های فزاینده‌ای در رابطه با کاهش تنوع ژنتیکی وجود دارد. زیرا که حدود ۷۵ درصد از ۵۰ هزار گونه گیاه دارویی که هم‌اکنون مورد استفاده قرار می‌گیرند از طبیعت جمع‌آوری می‌شوند (Canter *et al.*, 2005) و استفاده تجاری برخی از این گیاهان منجر به تضعیف جمعیت‌های آنها در زیستگاه‌های طبیعی خود گردیده است به‌طوری که اگر اقدامات اساسی در رابطه با حفظ، کشت و تکثیر انبوه آنها صورت نپذیرد امکان از بین رفتن این گونه‌ها وجود خواهد داشت (Bhat *et al.*, 2005; Fu *et el.*, 2006). تحقیقات مختلفی در ارتباط با تولید اسیدهای فنولیک و به‌ویژه رزمارینیک‌اسید در کالوس برخی

گونه‌های جنس مریم‌گلی گزارش شده است. به‌عنوان مثال در گیاه *S. fruticosa* میزان رزمارینیک اسید در کشت کالوس حدود ۱۰ برابر بیشتر از برگ‌های گیاه تولید شده است (Karam *et al*., 2003). هم‌چنین Kintzios *et al.* (1999) میزان رزمارینیک‌اسید در کالوس را دو برابر بیشتر در مقایسه با برگ‌های گیاه گلخانه‌ای *S. fruticosa* بیان کردند. در کالوس گیاه *S. officinalis* بیست نوع از ترکیبات فنولی شناسایی شده است که میزان رزمارینیک‌اسید تولیدشده در آنها نسبت به دیگر ترکیبات فنلی بیشتر می‌باشد (Santos-Gomes *et al*., 2003). در کالوس گیاه نوروزک (*Salvia leriiofolia*) بهترین کالوس‌زایی و بیشترین میزان رزمارینیک‌اسید در تیمار (BAP) ۵ mgL^{-1} و (NAA) ۵ mgL^{-1} حاصل شد که میزان رزمارینیک اسید در کالوس حدود ۳ برابر بیشتر از برگ‌ها بود (Modarres *et al*., 2013). میزان رزمارینیک‌اسید در کالوس گیاه مرزه خوزستانی (*Satureja khuzistanica*) ۲/۷ برابر بیشتر از گیاه مادری تولید شده است (Sahraroo *et al*., 2015). بنابراین مطالعات انجام شده در زمینه تولید ترکیبات دارویی باارزش مانند رزمارینیک‌اسید بیانگر این مطلب است که استفاده از تکنیک‌های کشت بافت مانند کشت کالوس روشی کاربردی و سودمند جهت افزایش متابولیت های دارویی چون رزمارینیک‌اسید می‌باشد (Hosseini *et al*., 2018; Zamani *et al*., 2019). علی‌رغم مطالعات مختلف در زمینه تولید ترکیب دارویی رزمارینیک‌اسید در شرایط کشت درون‌شیشه‌ای (Norouzi *et al*., 2016)، تاکنون تحقیقی جهت تولید رزمارینیک‌اسید در شرایط درون‌شیشه در گونه مریم‌گلی مزرعه‌روی انجام نگرفته است. از این‌رو، تحقیق حاضر با هدف تعیین بهترین ترکیب هورمونی جهت تولید کالوس و ارزیابی میزان رزمارینیک‌اسید در این گیاه صورت گرفت.

مواد و روش‌ها

تهیه مواد گیاهی

بذرهای گیاه مریم‌گلی مزرعه‌روی از گیاهان کشت‌شده در کلکسیون گیاهان دارویی مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی قم (منشأ بذر قم- روستای وصف (جمع‌آوری در سال ۱۳۸۹)، طول جغرافیایی ′۵۴°۳۴، عرض جغرافیایی′۱۸°۵۱) تهیه شدند.

تهیه گیاهچه سترون و شرایط نگه‌داری

ابتدا بذرها با ۵۰ میلی‌لیتر آب و یک قطره مایع ظرفشویی خیس شدند و پس از شستشو به‌مدت یک دقیقه با آب مقطر سترون، به‌مدت ۳۰ ثانیه در الکل ۷۰ درصد ضدعفونی شدند. سپس به‌مدت ۵ دقیقه در هیپوکلریت سدیم ۱۰درصد (حجمی/ حجمی) خیسانده شدند و نهایتاً ۳ مرتبه به‌مدت ۱۵ دقیقه با آب مقطر سترون شستشو گردید. بذرهای مذکور به‌منظور خشک شدن روی کاغذ صافی سترون قرار گرفتند. هم‌چنین درون هر شیشه ۳۰ میلی لیتر محیط کشت MS حاوی ۳۰ gL^{-1} ساکاروز و ۰/۷درصد آگار ریخته شد و پس از گذشت یک هفته درون هر شیشه ۳ بذر کشت گردید. شیشه‌های کشت در اتاقک رشد با دمای ۲۵°C و فتوپریود به میزان ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی قرار داده شدند. منبع نور مورد استفاده لامپ‌های فلورسنت با نور سفید با شدت نور ۲۰۰۰ لوکس بود و به‌مدت ۸ هفته به گیاهچه‌ها در این شرایط اجازه رشد داده شد.

شرایط کشت درون شیشه‌ای کالوس

به‌منظور کالوس‌زایی ریزنمونه‌های برگی به اندازه ۰/۵سانتیمتر از گیاهچه‌های سترون تهیه شدند و در محیط کشت MS (Murashige & Skoog) و ترکیبات هورمونی Kin (Kinetin) و BA (Banzyladenine) در غلظت‌های ۰/۵ mgL^{-1}، ۱ و ۲ به تنهایی یا در ترکیب با هورمون 2,4-D در ۵ غلظت ۰ mgL^{-1}، ۰/۵، ۱، ۲ و ۵ (در مجموع ۳۰ تیمار) کشت شدند. به‌منظور کاهش قهوه‌ای‌شدن ریزنمونه‌ها از آسکوربیک‌اسید (mgL^{-1} ۱۰) استفاده شد که به‌دلیل حساسیت این ماده به حرارت پس از کاهش دمای محیط کشت به ۴۰ ̊C محلول حاصل با فیلترهای سرسرنگی سترون به محیط کشت اضافه شد. شیشه‌های کشت، با شرایط مشابه قبلی نگهداری شدند و پس از ۳ هفته درصد کالوس‌زایی، رنگ کالوس‌ها، بافت کالوس‌ها و وزن تر

آنها اندازه‌گیری شد و با داده‌های حاصل از آن، بهترین تیمار انتخاب و در بهترین ترکیب تنظیم‌کننده رشد واکشت کالوس‌ها صورت گرفت. پس از ۳ بار واکشت (هر ۳ هفته یکبار) در بهترین تیمار هورمونی، نمونه‌های کالوس برداشته شد و میزان رزمارینیک اسید آنها ارزیابی شد. برای ارزیابی شاخص رشد کالوس‌های مریم‌گلی، ۲g کالوس در محیط کشت جامد MS حاوی ۱ mgL^{-1} BA و ۱ mgL^{-1} 2,4-D کشت شدند. ۵ تکرار (۵ شیشه) برای آن اختصاص داده شد. سه هفته بعد، کالوس‌های مذکور برداشته شدند و وزن تر آنها اندازه‌گیری شد. شاخص رشد از فرمول زیر بر مبنای وزن تر محاسبه شد.

$$\text{شاخص رشد} = \frac{(\text{وزن نخستین} - \text{وزن دوم})}{\text{وزن نخستین}}$$

تجزیه داده‌ها

این تحقیق در ۴ تکرار و به‌صورت آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی انجام شد. داده‌ها نیز با نرم‌افزار SAS. Ver. 9.4 تجزیه و میانگین‌ها با استفاده از آزمون دانکن در سطح ۵ درصد مقایسه شدند.

استخراج و تجزیه رزمارینیک‌اسید

به‌منظور ارزیابی میزان رزمارینیک‌اسید، نمونه‌های برگ گیاه، گیاهچه سترون و کالوس با فریزدرایر خشک شدند و در هاون چینی کاملاً پودر شدند. سپس ۵۰ میلی‌گرم از هر نمونه پودرشده توزین شد و داخل لوله آزمایش ریخته شد و به هر لوله ۱۰ میلی لیتر متانول اضافه شد. لوله‌ها در حمام التراسونیک به‌مدت ۲۰ دقیقه نگهداری شدند. سپس نمونه‌ها با استفاده از کاغذ صافی واتمن فیلتر شده و مایع صاف شده به‌منظور جداسازی حلال با روتاری تبخیر شد و عصاره خشک حاصل دوباره با متانول خالص (شرکت مرک آلمان) حل شد و ۱ میلی‌لیتر آن داخل ویال ریخته شد و توسط دستگاه HPLC (waters 2695, USA) و با دتکتور دوجذبی (Waters 2487, USA) مجهز به ستون فاز معکوس کربن ۱۸ به ابعاد (۴/۶×۲۵۰mm) و اندازه ذرات (۵µm) مورد تجزیه قرار گرفت. حلال استفاده شده استونیتریل و مخلوطی از آب و فرمیک اسید ۰/۱درصد (حجمی/ حجمی) بود که نسبت ۱۰۰-۱۰ درصد استونیتریل (به‌تدریج میزان حلال استونیتریل طی زمان بیشتر شد) برای ۲۰ دقیقه اول، ۱۰درصد استونیتریل برای ۵ دقیقه بعدی استفاده شد. سرعت عبور جریان حلال ۱ میلی لیتر در هر دقیقه و دمای ۲۵ °C تنظیم شد و طول موج انتخابی برای دستگاه ۳۳۰ nm بود. سپس داده‌ها با نرم‌افزار میلنیوم ۳۲ تجزیه شدند. برای به‌دست آوردن منحنی استاندارد، غلظت‌های مختلف رزمارینیک‌اسید (شرکت مرک آلمان) به دستگاه تزریق و سطح زیر منحنی آنها ثبت شد و درنهایت منحنی استاندارد رسم شد. میزان رزمارینیک‌اسید نمونه‌ها با استفاده از فرمول حاصل از منحنی استاندارد و شیب خط آن محاسبه شد.

نتایج و بحث

با کاربرد محیط کشت MS همراه با هورمون‌های مورد استفاده، ترکیب تنظیم‌کننده‌های رشد تأثیر معنی‌داری ($P\leq ۰/۰۵$) بر واکنش ریزنمونه‌های برگی داشت. انگیزش کالوس در برخی از تیمارهای هورمونی مشاهده شد و علاوه بر آن در میان تیمارهای مختلف، بافت و رنگ کالوس‌ها نیز متفاوت بودند. کالوس‌زایی از سطوح بریده ریزنمونه‌های برگی در زمان ۱۴-۹ روز پس از انتقال ریزنمونه‌ها به محیط کشت MS حاوی تنظیم‌کننده‌های رشد آغاز شد. بیشترین درصد کالوس‌زایی (جدول ۱) در ۳ تیمار حاوی ۰/۵ mgL^{-1} 2,4-D و ۲ mgL^{-1} BA، ۱ mgL^{-1} 2,4-D و ۱ mgL^{-1} BA، ۲ mgL^{-1} 2,4-D و ۲ mgL^{-1} Kin به‌دست آمد. به بیان دیگر، بیشترین کالوس‌زایی در محیط کشت‌های دارای نسبت مساوی از دو هورمون اکسین و سیتوکینین حاصل شد که این نتیجه می‌تواند ناشی از اثر سنتز هورمون‌های درون‌زای ریزنمونه به‌دلیل اثر ترکیب‌های هورمونی خارجی باشد (Li, 1997).

تحقیقات متعددی در زمینه مطالعه کالوس‌زایی و رشد کالوس در گیاهان خانواده نعناع انجام شده است و در بسیاری از آنها بالاترین کالوس‌زایی در محیط کشت‌های دارای غلظت‌های مساوی از اکسین و سیتوکینین بود.

برای مثال در گیاه مریم‌گلی *Salvia officinalis* بالاترین کالوس‌زایی (۱۰۰٪) در تیمار دارای نسبت مساوی از دو هورمون 2,4-D و Kin مشاهده شد. Sahraroo *et al.* (2014) بیان کردند که بیشترین کالوس‌زایی (۹۶٪) در گیاه مرزه خوزستانی (*S. khuzistanica*) در محیط غذایی MS حاوی IBA ۲mgL^{-1} و BAP ۲ mgL^{-1} می‌باشد. مطابق نتایج Al-hussaini *et al.* (2015) در کالوس‌های حاصل از جوانه‌های سیب زمینی نیز بیشترین کالوس‌زایی در محیط غذایی MS حاوی نسبت مساوی از دو هورمون BA (۲ mgL^{-1}) و 2,4-D (۲ mgL^{-1}) حاصل شد. براساس یافته‌های Modarres *et al.* (2013)، بیشترین کالوس‌زایی (۱۰۰٪) در گیاه نوروزک (*S. leriifolia*) در دو محیط غذایی MS دارای NAA (5 mgL^{-1}) و BAP (5 mgL^{-1}) و محیط غذایی حاوی NAA 6 mgL^{-1} و BAP 6 mgL^{-1} مشاهده شد. انگیزش کالوس مرحله مقدماتی و مهمی در فرایندهای بعدی کشت بافت مانند کشت سوسپانسیون سلولی، باززایی گیاه و جنین‌زایی سوماتیکی غیرمستقیم می‌باشد. در این مطالعه کشت کالوس‌های گیاه مریم‌گلی با موفقیت انجام شد و استقرار کالوس به‌مدت ۸ ماه بدون تغییر چندانی در میزان رشد ادامه یافت.

هم‌چنین در محیط حاوی اکسین بالا (2,4-D ۵ mgL^{-1}) و یا در محیط بدون اکسین کالوس‌زایی چندانی مشاهده نشد که این موضوع اهمیت وجود تنظیم‌کننده‌های رشد را برای تقسیم سلولی و تشکیل کالوس نشان می‌دهد (Pierk, 1987). میزان ناچیزی کالوس‌زایی (۵٪) در دو محیط کشت MS بدون هورمون 2,4-D و۰/۵BA mgL^{-1} و BA ۱mgL^{-1}حاصل شد.

بیشترین وزن تر کالوس (۱/۳ g) در محیط کشت MS دارای 2,4-D ۱ mgL^{-1} و BA ۱ mgL^{-1} به‌دست آمد (جدول ۲). یکی از فاکتورهای مرتبط با رشد کالوس شاخص رشد می‌باشد که طی آن میزان افزایش وزن تر کالوس نسبت به وزن اولیه آن سنجیده می‌شود.

جدول ۱. مقایسه میانگین اثر متقابل توفوردی، بنزیل آدنین و کینتین بر درصد کالوس‌زایی در گیاه مریم‌گلی مزرعه‌روی

Table 1. Mean comparison interaction effect of 2,4-D, BA and kinetin on callus induction (%) from leaf explants of *S. nemorosa* L.

Auxin (mgL^{-1}) 2,4-D	Cytokinins (mgL^{-1}) BA	Kin	Callus induction (%)	Type of callus	
0	0.5	-	5 hi	Dark green	Friable
0.5	0.5	-	0 j	-	
1	0.5	-	8 f	Dark green	Compact
2	0.5	-	7 h	Dark green	Friable
5	0.5	-	0 j	-	
0	1	-	5 hi	Light green	Friable
0.5	1	-	7 h	Light green	Friable
1	1	-	100 a	White	Compact
2	1	-	10 f	Light green	Friable
5	1	-	0 j	-	
0	2	-	0 j	-	-
0.5	2	-	100 a	White	Compact
1	2	-	17 d	Light green	Compact
2	2	-	21 e	Light green	Compact
5	2	-	0 j	-	-
0	-	0.5	0 j	-	-
0.5	-	0.5	85 b	Dark green	Friable
1	-	0.5	31c	Dark green	Friable
2	-	0.5	1 j	Dark green	Friable
5	-	0.5	1j	Dark green	-
0	-	1	0 j	-	-
0.5	-	1	9 f	Light green	Friable
1	-	1	10 f	Light green	Friable
2	-	1	4 i	Dark green	Friable
5	-	1	0 j	-	-
0	-	2	0 j	-	-
0.5		2	8 f		Friable
1		2	10 f	Dark green	Friable
2		2	100 a	Dark green	Fariable
5		2	0 j	-	-

در هر ستون میانگین هایی با حداقل یک حرف مشترک، تفاوت معنی داری در سطح احتمال پنج درصد ندارند.

In each column means followed by at least a common letter, are not significantly difference at 5% probability level.

جدول ۲. مقایسه میانگین اثر متقابل توفوردی، بنزیل آدنین و کینتین بر وزن تر کالوس (گرم) گیاه مریم‌گلی مزرعه روی.
Table 2. Mean comparison interaction effect of 2,4-D , BA and kinetin on callus fresh weight (g) from leaf explants of *S. nemorosa* L.

		2,4-D (mgL^{-1})				
	Concentration	0	0.5	1	2	5
BA (mgL^{-1})	0.5	0.006 ji	0	0.0185 hij	0.079 f	0
	1	0.19 d	0.0246 ih	1.31 a	0.05 g	0.023 hij
	2	0	0.81 b	.12 e	.13 e	0
Kin (mgL^{-1})	0.5	0	0.183 d	0.117 e	0.089 f	0.039 gh
	1	0	0.016 hij	0.002 ji	0.032 gh	0
	2	0	0.023 hij	0.039 gh	0.311 c	0

* در هر ستون میانگین هایی با حداقل یک حرف مشترک، تفاوت معنی داری در سطح احتمال پنج درصد ندارند.
In each column means followed by at least a common letter, are not significantly difference at 5% probability level.

نتایج شاخص رشد (۳/۱) را نشان داد، به‌عبارتی زی توده کالوس مریم‌گلی مزرعه‌روی نسبت به وزن اولیه آن (۲g) ۴ برابر شده بود. هم‌چنین کالوس‌های کشت داده شده در محیط حاوی Kin نرم‌تر ولی با رنگ سبز تیره و کالوس‌های حاصل از محیط کشت حاوی BA بافت فشرده‌تر و رنگ روشن‌تری دارا بودند. به‌طور مشابهی بیشترین وزن تر کالوس در گیاه *Orthosiphon stamineus* در غلظت‌های مساوی از اکسین و سیتوکینین) به‌دست آمد (Lee *et al.*, 2004). همچنین Abedaljasim *et al.* (2016) بیان کردند که دو ترکیب هورمونی BA و 2,4-D باعث اثر قابل ملاحظه‌ای جهت افزایش وزن تر و خشک کالوس گیاه *Verbascum sinuatum* شد. بیشترین وزن تر، وزن خشک و میزان رزمارینیک‌اسید در کالوس‌های گونه‌ای مریم‌گلی (*S. leriifolia*) در غلظت‌های مساوی از اکسین و سیتوکینین حاصل شده است (Modarres *et al.*, 2013). باتوجه به این که وزن تر کالوس از شاخص‌های مهم و مثبت برای ادامه مرحله بعد (کشت سوسپانسیون سلولی) می‌باشد و این تیمار دارای کالوس‌های با رنگ سفید و درصد کالوس زایی ۱۰۰٪ نیز بود، تیمار 2,4-D ($1\ mgL^{-1}$) و BA ($1\ mgL^{-1}$) به‌عنوان بهترین تیمار برای انجام کشت سوسپانسیون سلولی می باشد. شایان ذکر است که کالوس‌های رشدیافته در محیط مذکور در ابتدا بافت فشرده‌ای داشتند که در طی واکشت‌های مکرر کالوس‌های گیاه مریم‌گلی در این محیط کالوس‌های نرم (Friable callus) به‌دست آمد، به‌طوری‌که برای ایجاد کشت سوسپانسیون سلولی این گیاه بسیار مناسب بود.

میزان رزمارینیک‌اسید کالوس‌های مریم‌گلی ($۱/۵\ mg\ gDW^{-1}$) و برگ گیاه مادری ($۰/۷۱mg\ gDW^{-1}$) می‌باشد و کمترین میزان رزمارینیک‌اسید ($۰/۲۸mg\ gDW^{-1}$) در گیاهچه سترون مریم‌گلی مزرعه‌روی مشاهده شد (جدول۳). به‌عبارتی دیگر میزان تولید رزمارینیک‌اسید در کالوس نسبت به مقادیر آن در گیاه کامل روند متفاوتی را دنبال می کند. به‌عنوان مثال، میزان رزمارینیک‌اسید در کالوس‌های ریحان ۱ الی ۱/۵ برابر و در کالوس سالویا (*S. officinalis*) دو برابر مقادیر آن در گیاه کامل بود (Kintzios *et al.*, 1999, 2003). همچنین میزان رزمارینیک‌اسید در کالوس‌های مریم‌گلی مزرعه روی ($۱/۵\ mg\ gDW^{-1}$) از میزان رزمارینیک‌اسید کالوس برخی گونه‌های دیگر مریم‌گلی مانند *S. reuterana* و *S. palaestina* مقادیر بالاتری دارد (Fattahi *et al.*, 2012). براساس یافته‌های این تحقیق کشت کالوس مریم‌گلی مزرعه‌روی نسبت به کشت زراعی این گیاه به عنوان روشی کارا و سودمند جهت تولید ترکیب دارویی رزمارینیک‌اسید بود. از این‌رو، با فراهم کردن شرایط کنترل شده و بهینه در کشت کالوس مریم‌گلی مزرعه‌روی امکان افزایش میزان رزمارینیک‌اسید نیز وجود دارد. دلایل متعددی را می‌توان برای افزایش میزان رزمارینیک اسید کالوس در مقایسه با گیاه کامل محتمل دانست که بسیاری از دانشمندان معتقدند بهبود شرایط محیطی و همچنین تغذیه‌ای (از قبیل وجود ساکاروز، منابع نیتروژنه، pH و وجود تنظیم کننده‌های رشد و ...) برای سلول‌های گیاهی در شرایط کشت کالوس و کشت سلول چنین افزایشی را درپی خواهد داشت (Yesil-Celiktas *et al.*, 2010).

جدول ۳. میزان رزمارینیک‌اسید در کالوس، گیاهچه ستروون و برگ گیاه مادری مریم‌گلی مزرعه روی

Table 3. Rosmarinic acid contents of callus culture, *in vitro* seedlings and *in vivo* leaves of *S. nemorosa* L.

Compound	RA content (mg gDW^{-1})
Mother plant (leave)	0.71 b
In vitro seedling	0.28 c
Callus culture	1.5 a

* در هر ستون میانگین‌هایی با حداقل یک حرف مشترک، تفاوت معنی داری در سطح احتمال پنج درصد ندارند.

In each column means followed by at least a common letter, are not significantly difference at 5% probability level.

نتیجه‌گیری کلی

بهترین تیمار هورمونی برای کالوس‌زایی و رشد کالوس محیط MS دارای2,4-D ($1\ mgL^{-1}$) و BA ($1\ mgL^{-1}$) بود. همچنین کالوس‌های گیاه مریم‌گلی مزرعه‌روی قادر به تولید رزمارینیک‌اسید دو برابر بیشتر از برگ گیاه مادری می‌باشند.

REFERENCES

1. Abedaljasim, M.J.A., Ashwaq, S.A., Abdal-Jabbar, A.A. & Duha, M.M. (2016). Improvement of phenols production by amino acids in callus cultures of *Verbascum thapsus* L. *American Journal of Plant Sciences*, 7, 84-91.
2. AL-Hussaini, Z.A., Yousif, S.H. & AL-Ajeely, S.A. (2015). Effect of different medium on callus induction and regeneration in potato cultivars. *International Journal* of *Current Microbiology and Applied Sciences*, 4(5), 856-865.
3. Bhat S.V., Nagasamagi, B.A. & Sivakumar, M. (2005). *Chemistry of Natural Products*. Narosa Publishing House, New Delhi.
4. Canter, H.C., Thomas, H. & Ernst, E. (2005). Bringing medicinal plants into cultivation: opportunities and challenges for biotechnology. *Trends in Biotechnology*, 23, 180-184.
5. Fattahi, B., Nazeri, V., Kalantari, S. & Bonfill, M. (2014). Identification of compounds in the essential oil and quantification of flavonoids and rosmarinic acid in *Salvia reuterana* Boiss. and *Salvia palaestina* Benth. *Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants*, 30, 463-475. (in Farsi).
6. Fu, CX., Xu, Y.J., Zhao, D.X. & Ma, F.S. (2006). A comparison between hairy root culture and wild plants of *Sauussurea involucrat*e in phenylpropanoids production. *Plant Cell Report*, 24, 750-754.
7. Hosseini, B., Ayyobi, N. & Fattahi, M. (2018). Study of factors affecting hairy roots induction and rosmarinic acid production in *Dracocephalum kotschyi* Boiss. *Iranian Journal of Horticaltural Sciences*, 49:255-269. (in Farsi)
8. Hosseinzadeh, H. & Amel, S. (2000). Anti-nociceptive effects of the aerial parts of Salvia nemorosa L. extracts in mice. *Archives of Iranian Medicine*, 3, 81-84.
9. Janicsak, G., Matheh, I., Vilmos, M.V. & Gerald, B. (1999). Comparative studies of the rosmarinic and caffeic acid contents of Lamiaceae species. *Biochemical Systematics and Ecology*, 27, 733-738.
10. Jamzad, Z. (2012). Lamaiceae. In: Assadi, M., Maassoumi, A. & Mozaffarian, V. (eds). *Flora of Iran*. Vol. 76. Research Institute of Forests & Rangelands, Tehran. (in Farsi)
11. Karam, N.S., Jawad, F.M., Arikat, N.A. & Shibli R.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.
12. Khojasteh, A., Mirjalili, M.H., Hidalgo, D., Purificacio, n. & Palazon, J. (2014). New trends in biotechnological production of rosmarinic acid. *Biotechnology Letters*, 36, 2393-2406.
13. Kintzios, S., Nikolaou, A. & Skoula, M. (1999). Somatic embryogenesis and *in vitro* rosmarinic acid accumulation in *Salvia officinalis* and *S. fruticosa* leaf callus cultures. *Plant Cell Reports*, 18, 462-466.
14. Kintzios, S., Makri, O., Panagiotopoulos, E. & Scapeti, M. (2003). *In-vitro* rosmarinic acid accumulation in sweet basil (*Ocimum basilicum* L.). *Biotechnology Letters*, 25, 405-408.
15. Lee, W.L. & Chan, L.K. (2004). Establishment of *Orthosiphon stamineu*s cell suspension culture for cell growth. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 78, 101-106.
16. Li, L.N. (1997). Water soluble active components of *Salvia miltiorrhiza* and related plants. *Journal of Chinese Pharmaceutical Sciences*, 6, 57-64.
17. Modarres, M., Lahooti, M., Asili, J., Kafi, M. & Ramazani, A. (2013). Simultaneous determination of rosmarinic acid, salvianolic acid b and caffeic acid in *Salvia leriifolia* benth. root, leaf and callus extracts using a high-performance liquid chromatography with diode-array detection technique. *Journal of Plant Process and Function*, 37, 1721-1730. (in Farsi)
18. Paek, K.Y, Chakrabarty, D. & Hahn E.J. (2004). Application of bioreactor systems for large scale production of horticultural and medicinal plants. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 81, 287-300.
19. Petersen, M., Abdullah, Y., Benner, J., Eberle, D., Gehlen, K., Hücherig, S., Janiak, V., Kim, K.H., Sander, M., Weitzel, C. & Wolters, S. (2009). Evolution of rosmarinic acid biosynthesis. *Phytochemistry,* 70, 1663-1679.

20. Philipson, J.D. (1990). Plants as source of valuable products. In: B.V. Chalwood and M.J. Rhodes (Eds.), *Secondary products from plant tissue culture*, Oxford, Clarendon Press. pp. 1-21.
21. Pierik, R.I.M. (1987). *Preparation and composition of nutrient media*. In: Pierik, R.I.M. (Ed.), *In vitro* Culture of Higher Plants. Martinus Nijhoff Publishers, Dordrecht, the Netherlands, pp. 45-82.
22. Sahraroo, A., Babalar, M., Mirjalili, M., Moghaddam, M. & Nejad Ebrahimi, S. (2014). *In-vitro* callus induction and rosmarinic acid quantification in callus culture of *Satureja khuzistanica* Jamzad (Lamiaceae). *Iranian Journal* of *Pharmaceutical Research*, 13 (4), 1447-1456.
23. Santos-Gomes, P. C., Seabra, R. M., Andrade, P. B. & Fernandes- Ferreira, M. (2003) Determination of phenolic antioxidant compounds produced by calli and cell suspensions of sage (*Salvia officinalis* L.). *Journal of Plant Physiology*, 160, 1025-1032.
24. Scarpati, M.L. & Oriente, G. (1958). Isolamento e costituzione dell'acid rosmarinico (dal rosmarinus off.). *Ric. Sci*., 28, 2329-2333.
25. Tripathi L & Tripathi JN. (2003). Role of biotechnology in medicinal plants. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 2, 243-253.
26. Takeda, Y., Zhang, H., Matsumoto, T., Otsuka, H., Oosio, Y., Honda, G., Tabata, M., Fujita, T., Sun, H., Sezik, E. & Yesilada, E. (1997). Megastigmane glycosides from *Salvia nemorosa*. *Phytochemistry*, 44, 117-120.
27. Verpoorte, R., Caontin, A. & Memelink, J. (2002). Biotechnology for the production of plant secondary metabolites. *Phytochemistry Reviews*, 1, 13-25.
28. Wyk, B.E.V. & Wink, M. (2005). *Medicinal plants of the world*. Pretoria, Briza. South Africa
29. Yesil-Celiktas, O., Gurel, A. & Vardar-Sukan, F. (2010). Large scale cultivation of plant cell and tissue culture in bioreactors. *Transworld Research Network*, 37, 1-54.
30. Zamani, M, Moradi, H.Chalavi, V. & Kazemitabar S.K. (2019). Effect of Salicylic Asid and Methyle Jasmonat Elicitors on Hypericin production in (*Hypericum perforatum* L.) cv. Topas Callus culture. *Iranian Journal of Horticultural Science*, 49, 915-923. (in Farsi)