تولید و نگهداری کشت سلولی گیاه بادرنجبویه (*Melissa officinalis* L.) و مقایسه متابولیت‌های تولید شده در کالوس با گیاه کامل

محمدرضا شمس اردکانی[۱]*، یعقوب امن‌زاده[۲]، فهیمه جهانشیر[۳]، امیرحسین جمشیدی[۴]

۱- استادیار فارماکوگنوزی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی تهران
۲- استادیار فارماکوگنوزی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی تهران
۳- دانشجوی سال آخر داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی تهران
۴- دستیار تخصصی فارماکوگنوزی و عضو هیأت علمی پژوهشکده گیاهان دارویی جهاددانشگاهی
*آدرس مکاتبه: تهران، دانشگاه علوم پزشکی تهران، دانشکده داروسازی، گروه فارماکوگنوزی
تلفن: ۶۹۵۹۰۹۰ (۰۲۱)، نمابر: ۶۴۸۱۱۷۸ (۰۲۱)
پست الکترونیک: shams@ias.ac.ir

چکیده

مقدمه: گیاه بادرنجبویه (*Melissa officinalis* L.) گیاهی علفی، معطر و پایا از خانواده نعنا است که در مناطق مختلف ایران مورد استفاده خوراکی و دارویی قرار می‌گیرد و امروزه در بسیاری از نقاط جهان کشت و سازگار شده است. با توجه به اهمیت و کاربرد وسیع اسانس گیاه در ساخت داروها، مواد غذایی و آرایشی، بهداشتی تصمیم بر آن شد که کشت سلولی گیاه مورد بررسی قرار گیرد.

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

روش تحقیق: بذرهای گیاه بادرنجبویه، با قرار گرفتن در محلول‌های استریل‌کننده، استریل شدند و بعد از رشد در محیط آگار ۰/۸ درصد و تولید دانه رست، قسمت‌های فوقانی دانه رست 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 دی‌کلرو متانی کالوس تهیه شده و به دستگاه GC 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 سیترونلال، نرال، ژرانیال و بتاکاریوفیلن 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 آنی است که کالوس به دست آمده از گیاه بادرنجبویه در محیط MS و با هورمون‌های گیاهی فوق نمی‌تواند تولید روغن فرار نماید اما کالوس مزبور توانسته است تانن تولید نماید.

گل‌واژگان: بادرنجبویه، کشت‌بافت، اسانس

مقدمه

گیاه بادرنجبویه با نام علمی *Melissa officinalis* L. گیاهی معطر، پایا و علفی از خانواده نعنا (Labiatae) است که در مناطق مختلف ایران به نام‌های وارنگ بو، بارنگ بو، فرنجشمک هم شناخته می‌شود. بادرنجبویه در واقع بومی کشورهای مدیترانه و آسیای غربی است ولی امروزه به طور گسترده در بسیاری از نقاط جهان، کشت و سازگار شده است. در ایران در ناحیه شمال و شمال شرقی (جنگل گلستان، مازندران، تنکابن و دره هزار)، در ناحیه غرب (باختران، ریجاب و بیشه) و در تهران و اطراف (ارتفاعات توچال، پس‌قلعه و بین کرج و قزوین) به وفور دیده می‌شود [۱].

سرشاخه‌های هوایی گیاه دارای ۰/۵-۰/۱ درصد اسانس روغنی هستند (براساس وزن گیاه خشک) [۲]. اسانس گیاه تا حدودی مشابه اسانس علف لیمو (Lemon grass) است ولی ترکیب R -(+) - متیل سیترونلات، اسانس بادرنجبویه را از اسانس علف لیمو متمایز می‌سازد [۳].

اجزای مهم موجود در اسانس بادرنجبویه عبارتند از : سیترونلال، نرال، ژرانیال، بتاکاریوفیلن، بتاکاریوفیلن اکساید، ژرماکرن‌دی، لینالول، نرول، ژرانیول و ... [۲،۴،۵].

تکنیک‌های کشت سلولی که از اوایل قرن بیستم با نظریه‌پردازی هابرلنت مورد توجه قرار گرفتند [۶]. امروزه راه‌کاری جدید در صنعت داروسازی به حساب می‌آید که با آن می‌توان در یک مقطع زمانی نسبتاً کوتاه، سلول‌های گیاهی را در محیط کشت مصنوعی و به دور از محدودیت‌های اقلیمی، سیاسی و جغرافیایی کشت کرده و مواد موثر دارویی را از آنها استخراج کرد.

تاکنون مطالعه‌ای جهت مقایسه مواد تولید شده در کشت بافت گیاه با روغن فرار حاصل از گیاه کامل حاصل از همان بذر استفاده شده در کشت بافت انجام نشده است. همچنین با توجه به اهمیت و کاربرد وسیع اسانس این گیاه در ساخت داروها، مواد غذایی و آرایشی بهداشتی تصمیم بر آن شد که اسانس گیاه مورد بررسی قرار گیرد و هم‌چنین در مورد ایجاد کالوس این گیاه و نگهداری آن و تولید اسانس و سایر متابولیت‌ها از این طریق، تحقیق مقدماتی صورت گرفته و نتایج ارزیابی شود.

مواد و روش‌ها

۱- تهیه نمونه گیاهی مورد تحقیق

سرشاخه‌های هوایی گیاه بادرنجبویه و بذور آن در تاریخ ۱۳۸۲/۳/۱۷ از محل گیاهان دارویی موسسه جنگل‌ها و مراتع جمع‌آوری شده و بعد از پاک شدن، در دمای اتاق خشک گردید.

نمونه هرباریومی از گیاه هم تهیه شده و توسط گیاهشناس موسسه مورد شناسایی و تایید قرار گرفت.

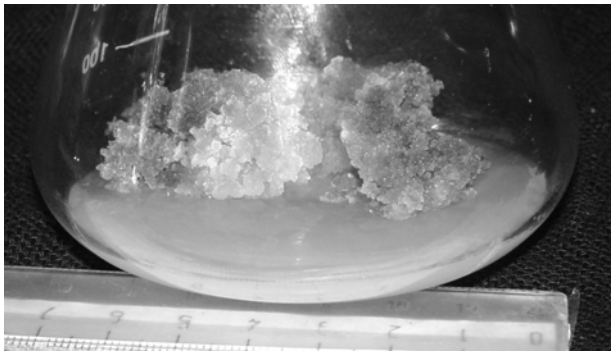
۲- اسانس‌گیری از نمونه گیاهی

اسانس‌گیری از سرشاخه‌های هوایی گیاه بادرنجبویه، طبق روش تقطیر با آب و به وسیله دستگاه کلونجر انجام شد. بعد از گذشت ۴ ساعت، اسانس حاصل جمع‌آوری و تعیین مقدار گردید.

با اضافه کردن سولفات سدیم انیدرید، آبگیری از اسانس انجام شده و نمونه جهت تزریق به دستگاه GC/MS و بررسی اجزای موجود در ظرف کوچک شیشه‌ای دربسته در یخچال نگهداری شد.

۳- کشت بافت گیاهی:

جهت استریل کردن بذرهای گیاه بادرنجبویه، از ترکیبی از چند ماده استریل‌کننده استفاده شد. بدین ترتیب که تعدادی از بذرها در ظرف حاوی پراکسید هیدروژن ۰/۳ درصد و یک قطره توین ۸۰ به مدت ۱۰ دقیقه قرار گرفتند. بعد از صاف شدن و چند بار آبکشی با آب مقطر استریل، صافی حاوی بذور در ابتدا در محلول هیپوکلریت سدیم ۵ درصد به مدت ۲ دقیقه و بعد در محلول آبی اتانول ۷۰ درجه به مدت ۸ دقیقه قرار داده شدند و بعد از شستشو با آب مقطر استریل به پلیت‌های حاوی محیط آگار ۰/۸ درصد اتوکلاو شده منتقل و جهت رشد و ایجاد دانه رست در گرمخانه ۲۷-۲۵ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. بعد از گذشت ۷ روز از رشد بذرها در محیط آگار، قسمت‌های فوقانی دانه‌رست به محیط کشت MS پایه اتوکلاو شده که با وجود میواینوزیتول (۱۰۰ mg/l) ، کینتین (۰/۲ mg/l)، IAA (۱ mg/l)، 2, 4-D (۱ mg/l) و شیرنارگیل (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. سلول‌های تولید شده روی این محیط کشت در فواصل ۲۵-۲۰ روزه به محیط کشت مشابه جدید انتقال داده شدند تا کالوس مطلوب حاصل آید (شکل شماره ۱).



شکل شماره ۱- تصویر کالوس حاصل از گیاه *Melissa officinalis*

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

مشخصات دستگاه Gas Chromatography

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-1 بود. برنامه‌دمایی: دمای ابتدایی آون ۵۰ درجه سانتی‌گراد، دمای انتهایی ۲۶۵ درجه سانتی‌گراد و گرادیان حرارتی آون ۲/۵ درجه سانتی‌گراد در هر دقیقه، دمای اتاقک تزریق ۲۵۰ درجه سانتی‌گراد، گازحامل: نیتروژن و سرعت جریان گاز: ۱/۵ میلی‌لیتر در دقیقه.

مشخصات و برنامه دمایی دستگاه GC/MS

دستگاه کروماتوگرافی گازی از نوع 6890 N , Hewlet Packard با ستون به طول ۳۰ متر، قطر داخلی ۰/۲۵ میلی‌متر و ضخامت لایه ۰/۲۵ میکرومتر از نوع Hp-1 بود. برنامه‌دمایی: دمای ابتدایی آون ۵۰ درجه سانتی‌گراد، دمای انتهایی ۲۶۵ درجه سانتی‌گراد و گرادیان حرارتی آون ۲/۵ درجه سانتی‌گراد در هر دقیقه، دمای اتاقک تزریق ۲۵۰ درجه سانتی‌گراد، گازحامل: هلیوم و سرعت جریان گاز: ۱/۵ میلی‌لیتر در دقیقه.

طیف نگار جرمی مدل Termoquest 2000، ولتاژ یونیزاسیون: ۷۰ الکترون ولت، روش یونیزاسیون: EI، دمای منبع یونیزاسیون: ۲۵۰ درجه سانتی‌گراد.

بحث و نتیجه‌گیری

با توجه به مطالعه طیف های جرمی حاصل از GC/MS و اعداد کواتس محاسبه شده و مقایسه این مشخصات با ترکیبات استاندارد و مراجعه به منابع مختلف، ۱۵ ترکیب در اسانس بادرنجبویه شناسایی شد که مجموعاً ۹۱/۹۳ درصد اسانس را تشکیل می‌دهند. بیشترین ترکیبات استخراج و شناسایی شده اسانس را ژرانیال (۲۵/۱۴ درصد) و بتاکاریوفیلن (۱۹/۰۰درصد) تشکیل می‌دهند. اسانس فوق دارای ۶ ترکیب مونوترپنی (با مجموع۴۹/۷۳ درصد) و ۹ ترکیب سزکویی‌ترپنی (با مجموع۴۲/۲۰ درصد)، 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.

در مطالعات قبلی انجام شده در زمینه بررسی اسانس گیاه بادرنجبویه نتایج مشابهی گزارش شده است به‌گونه‌ای که ترکیبات غالب موجود در اسانس گیاه سیترونلال، نرال، ژرانیال بیان شده که البته بسته به شرایط اقلیمی رویشگاه گیاه وزمان برداشت آن درصد این مواد کمی تفاوت می‌کند [۷،۸].

در زمینه کشت سلولی گیاه بادرنجبویه 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 تجمع ترکیبات غیرترپنوییدی مثل فورفورال، هگزانوییک و اکتانوییک اسید در سلول‌های کالوس وجود دارد [۹،۱۰].

جدول شماره ۱- ترکیبات شیمیایی شناسایی شده در اسانس گیاه *Melissa officinalis* L.

ردیف	ترکیبات	ضریب بازداری	درصد
۱	آلفاپینن	۹۴۱	۰/۰۱
۲	سابینن	۹۷۸	۰/۰۱
۳	لینالول	۱۱۰۱	۱/۲۹
۴	سیترونلال	۱۱۵۴	۵/۰۴
۵	نرال	۱۲۴۹	۱۸/۲۴
۶	ژرانیال	۱۲۸۱	۲۵/۱۴
۷	آلفاکوپائن	۱۳۷۹	۰/۶۶
۸	بتاکاریوفیلن	۱۴۲۴	۱۹/۰۰
۹	آلفاهومولن	۱۴۵۷	۰/۶۸
۱۰	ژرماکرن‌دی	۱۴۸۳	۵/۵۴
۱۱	آلفاالمن	۱۵۲۲	۰/۶۸
۱۲	بتاکادینن	۱۵۵۵	۰/۲۹
۱۳	کاریوفیلن اکساید	۱۵۹۰	۱۴/۰۰
۱۴	لدن	۱۶۱۱	۰/۶۳
۱۵	تی‌کادینول	۱۶۳۸	۰/۷۲

جدول شماره ۲- درصد و میزان دسته ترکیبات شناسایی شده در اسانس گیاه بادرنجبویه

ترکیبات	درصد ترکیبات
مونوترپن هیدروکربنی	۰/۰۲
مونوترپن اکسیژنه	۴۹/۷۱
مجموع مونوترپن‌ها	۴۹/۷۳
سزکویی‌ترپن هیدروکربنی	۲۷/۴۸
سزکویی‌ترپن اکسیژنه	۱۴/۷۲
مجموع سزکویی‌ترپن‌ها	۴۲/۲۰
مجموع ترکیبات هیدروکربنی	۲۷/۵۰
مجموع ترکیبات اکسیژنه	۶۴/۴۳
میزان ترکیبات شناسایی شده	۹۱/۹۳

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. جلد نهم، شماره ۱۰۶۴.

2. 2. Evans WC. Trease and Evans' pharmacognosy. 15th ed. W.B. Saunders. UK. 2002, pp: 221,253.

3. Derosian AO, Eutler AB. The review of natural product. First ed. Facts & comparisons. USA. 2002, p:392.

4. Blumenthal M, Goldberg A, Brinckmann J. Herbal Medicine. First ed. American Botanical council. USA. 2000, pp: 230-31.

5. Bisset NG, Wichtl M. Herbal drugs and phytopharmaceuticals. 2nd ed. CRC press. USA. 2001, pp: 329-332.

٦. تاجی اکرم، ویلیام ای‌داد، ویلیامز ارریچارد. عملیات کشت بافت‌های گیاهی. چاپ اول. انتشارات دانشگاه امام رضا (ع). ۱۳۸۲، صفحه ۱۱.

7. Sarer E, Kokdil G. Constituents of the essential oil from M. officinalis. Planta Med. 1991; 57: 89-90.

8. Adzet T, ponz R, Wolf E, Schulte E. Content and Composition of M. officinalis oil in relation to leaf position and harvest time. Planta Med. 58, 562-564.

9. Gbolade AA, Lockwood GB. The constituents of Melissa officinalis cell cultures. Planta Med. 1989; 55:228.

10. Abou Mandour, Ahmed A.; Vandenberg, Thomas; Czygan, franz-c. Regeneration of plants and production of volatiles from callus culture of Melissa officinalis. Angew Bot. 1994; 68 (5/6): 163-7.