تولید کشت‌سلولی گیاه آب‌بشقابی (*Centella asiatica* L.) و مقایسه متابولیت‌های تولید شده در کالوس، کشت سوسپانسیون سلولی و گیاه کامل.

فرشته حیدرقلی‌نژاد[1]، یوسف حمیداوغلی[2]*، ولی‌الله قاسمی‌عمران[3]، پوریا بی‌پروا[4]

۱-دانشجوی دکتری اصلاح و بیوتکنولوژی گیاهان باغبانی دانشگاه گیلان، رشت، ایران

۲-دانشیار گروه باغبانی دانشگاه گیلان، رشت، ایران

۳-استادیار پژوهشکده ژنتیک و زیست‌فناوری طبرستان، ساری، ایران

٤-دانشیار گروه علوم‌پایه دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ساری، ایران

y.hamidoghli@yahoo.com

*صندوق پستی ٤١٩٩٦١٣٧٧٦، رشت، ایران

دریافت: ۱٤۰۱/۱۲/۲۵ پذیرش: ۱٤۰۳/۰۵/۱۵

چکیده

تولید مواد مؤثره گیاهان دارویی از طریق کشت‌های سلولی اهمیت زیادی برای مطالعه و دستیابی به این منابع ارزشمند دارد. آب‌بشقابی (*Centella asiatica* L.) از جمله گیاهان دارویی ارزشمندی است که به‌دلیل وجود خواص دارویی با ارزش و پراکنش محدود، بسیار ارزشمند است. کاربرد کشت سلول‌های غیرتمایزیافته از جمله کالوس و کشت سوسپانسیون سلولی یک راهکار زیست‌فناوری برای تولید ترکیبات ارزشمند ایجاد کرده‌است. در این مطالعه تولید سلول‌های حاصل از کشت سوسپانسیون از کالوس آب‌بشقابی و شناسایی ترکیبات فرار آنها توسط دستگاه GC/MS بررسی شد. مطالعه الگوی رشد سلولی براساس وزن تر، وزن خشک و شمارش سلولی در دوره زمانی ٤٢ روزه نشان داد افزایش سلول‌ها از روز پنجم پس از بازکشت شروع و مرحله تصاعدی آن تا روز شانزدهم ادامه داشت. در روز شانزدهم بیش‌ترین میزان وزن تر (۰/٦٨٤ گرم)، خشک (۰/۰۵۷ گرم) و تعداد سلول (۸۸۰۰۰ سلول در هر ۱ میلی‌لیتر) به‌دست آمد و پس از آن سلول‌ها تا روز بیست و دوم وارد مرحله سکون شدند. بعد از عبور از مرحله سکون کاهش تدریجی رشد سلولی مشاهده شد. همچنین، نتایج آنالیز عصاره‌ها نشان داد کالوس و کشت سوسپانسیون سلولی قادر به تولید ترکیبات متفاوتی از گیاه مادری هستند. در گیاه، کالوس و کشت سوسپانسیون سلولی به‌ترتیب ۱۷، ٦ و ۱۳ ترکیب شناسایی شد. از میان ترکیبات موجود در عصاره‌ها نئوفیتادین، استیگماسترول و بتاسیتوسترول ترکیباتی مشابه در عصاره‌های گیاه و کشت سوسپانسیون بودند. همچنین، اکتادیکانوئیک اسید و اورس-۱۲-ان-۲۸-اوئیک اسید به‌صورت مشترک در کالوس و کشت سوسپانسیون سلولی وجود داشت.

کلید واژگان: کروماتوگرافی گازی، کشت درون‌شیشه‌ای، گیاه دارویی، طیف‌سنج جرمی، متابولیت‌های گیاهی.

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2025-01-22]

۱-مقدمه

آب‌بشقابی با نام علمی *Centella asiatica* L. Urban متعلق به خانواده چتریان (Apieacea) است. این گیاه با توجه به پراکنش محدود و خواص دارویی با ارزش دارای اهمیت بسیاری است. آب‌بشقابی گیاهی علفی، پایا، رونده، در محل بندها ریشه‌زا، کرکینه‌پوش، نیمه‌آبزی، روینده در حاشیه آب است [۱و۲]. ترکیبات گیاه شامل فلاونوئیدها (کوئرستین، کامپفرول)، گلیکوزیدهای مختلف، ترپنوئیدها (آسیاتیکوزید، سنتلوزید، مادکاسوزید، براهموزید، براهمینوزید)، مادکازیک اسید، آسیاتیک اسید، آسیاتیسونیک اسید، سنتلیک اسید، سنتیک اسید، ایزوتانکونزید، اسیدهای چرب، آمینواسیدها، فیتواسترول و تانن می‌باشد [۳و٤]. از این گیاه برای درمان بیماری‌های پوستی، سیفلیس، روماتیسم، جذام، بیماری‌های مغزی، صرع و هیستری استفاده می‌شود [٥و٦]. در طب آیورودا از این گیاه به‌عنوان جوان‌کننده و تسکین‌دهنده سلول‌های عصبی و مغزی، افزایش‌دهنده هوش، افزایش طول عمر و بهبود حافظه استفاده می‌کنند [٦]. متابولیت‌های تولید شده توسط گیاهان دارویی، مانند آلکالوئیدها، ترکیبات فنولی، فلاونوئیدها، کربوهیدرات‌ها، تانن‌ها و استروئیدها خاصیت دارویی اثربخشی بر بدن انسان دارند [۷]. این ترکیبات شیمیایی، برای تعامل با محیط اطراف و برای بقا و پایداری تولید شده و در تولید انواع داروها، مکمل‌های غذایی، رنگدانه‌ها و آفت‌کش‌ها استفاده فراوان دارند [۸و۹].

استفاده از گیاهان دارویی با هدف بهره‌برداری از خواص درمانی آنها با مشکلاتی مانند، غلظت پایین ترکیبات دارویی در گیاه، محدودیت منابع طبیعی، سرعت پایین تولید متابولیت‌های ثانویه، تخریب روزافزون مراتع و نابودی گونه‌های متنوع گیاهی همراه است [۱۰و۱۱]. روش‌های کشت سلول و بافت، مهندسی ژنتیک، استفاده از نشانگرهای مولکولی، بررسی مسیرهای مؤثر در تولید متابولیت‌ها و افزایش بیان ژن می‌تواند کارآیی گیاهان را به عنوان منابعی تجدیدپذیر برای تولید دارو افزایش دهد [۱۱و۱۲]. سیستم‌های کشت بافت برای تولید متابولیت‌های گیاهی، شامل کشت کالوس و سوسپانسیون سلولی، کشت‌های سلولی ساکن و کشت‌های تمایزیافته (کشت اندام) است. تشکیل کالوس اولین رویداد در روند کشت بافت گیاهی است. کالوس توده‌ای از سلول‌های پارانشیمی تمایز نیافته است. اثبات شده است که کالوس ممکن است منبعی برای تولید متابولیت‌های گیاهی باشد [۱۳]. کشت سوسپانسیون سلولی، شامل توده‌های سلولی پراکنده و درحال رشد در محیط کشت مایع و جنبان است. این کشت‌ها معمولاً با انتقال قطعاتی از کالوس ترد و تمایزنیافته به یک محیط‌کشت مایع که به‌طور یکنواخت و مداوم تکان داده می‌شود، شروع می‌شوند. از کشت سوسپانسیون سلول‌های گیاهی می‌توان برای مطالعه بیوسنتز متابولیت‌های ثانویه استفاده کرد. در شرایط مناسب، سلول‌های کالوس در محیط سوسپانسیون می‌توانند به رشد دائم و بدون تغییر خود به‌طور نامحدود و با سرعت بیش‌تری نسبت به سلول‌های کالوس ادامه دهند [۱٤و۱٥]. بنابراین، در شرایطی که تقسیم سلولی سریع و نسل‌های سلولی پرجمعیت نیاز باشد، کاربرد دارند [۱٦]. با توجه به این‌که کشت‌های سوسپانسیون سلولی به‌صورت کنترل شده است و کمتر دستخوش تغییرات محیطی ناخواسته می‌شود، می‌توان با بهینه‌سازی شرایط موجود، به روشی پایدار در تولید مواد دارویی ارزشمند دست یافت. تولید متابولیت‌های ثانویه از طریق کشت سوسپانسیون سلولی به‌دلیل ارزش اقتصادی بالای این ترکیب‌ها به‌صورت گسترده استفاده می‌شود [۱۲]. در سال‌های اخیر تولید این فراورده‌ها از طریق کشت بافت، اندام و سلول‌های گیاهی به‌صورت یک رویکرد مهم در مطالعات کشت‌های کنترل شده درآمده است/ مطالعات محدودی از تولید ترکیبات دارویی آب‌بشقابی از طریق

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2025-01-22]

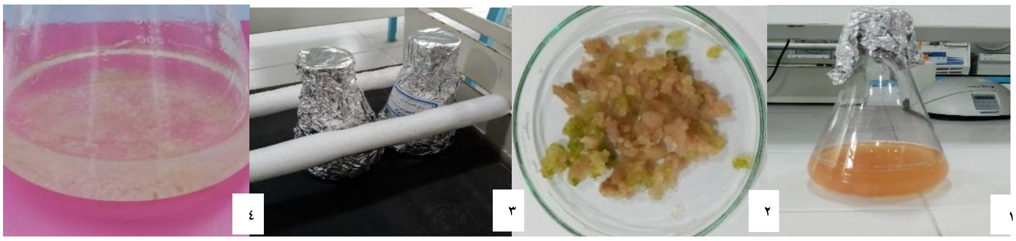
کشت سوسپانسیون سلولی انجام شده‌است [۱۷]. در مطالعات گذشته روی آب‌بشقابی، تولید سنتولوزید در کشت سوسپانسیون سلولی در حضور الیسیتورها و پیش‌ماده آلفا آمیرین ارزیابی شد و نتایج نشان داد سلول‌های حاصل از سوسپانسیون در حضور تیمارها موفق عمل کرده و باعث افزایش بازده تولید سنتولوزید شد [۱۸]. کشت سوسپانسیون آب‌بشقابی برای تولید آسیاتیک اسید و آسیاتیکوزید در حضور الیسیتورها انجام شد و سلول‌های حاصل انباشت بالایی از مواد مؤثره فوق تولید کردند [۱۹]. انجام کشت سوسپانسیون برای تولید مواد مؤثره آب‌بشقابی در بیوراکتورها نیز بررسی شد. نتایج نشان داد سلول‌های حاصل از کشت، قادر به تولید مقدار قابل‌توجهی از انباشت مواد مؤثره گیاه می‌باشند [۲۰]. باتوجه به محدودیت اطلاعات در مورد کشت بافت و شناسایی ترکیبات موجود در کالوس و کشت سوسپانسیون سلولی آب‌بشقابی، این پژوهش برای بررسی تولید متابولیت‌های گیاهی از سلول‌های غیرتمایزیافته در کالوس و سلول‌های حاصل از کشت سوسپانسیون سلولی انجام شد. در پژوهش حاضر برای اولین بار در ایران مطالعه کشت سوسپانسیون سلولی آب‌بشقابی برای تولید ترکیبات دارویی با ارزش و شناسایی متابولیت‌های گیاهی از طریق GC/MS مطالعه و بررسی شد.

۲-مواد و روش‌ها

۲-۱ کشت سوسپانسیون

گیاه آب‌بشقابی از گلخانه آموزشی دانشگاه گیلان تهیه شد و برگ‌های نورس آن جمع‌آوری شد. از برگ‌ها به‌عنوان ریزنمونه برای تولید کالوس در شرایط کشت درون‌شیشه‌ای استفاده شد. ریزنمونه‌ها، پس از شست‌وشو با آب و مواد شوینده، زیر دستگاه هود لامینار با الکل ۷۰ درصد به‌مدت ۳۰ ثانیه و محلول هیپوکلریت سدیم ۱/۵ درصد به‌مدت ۱۵ دقیقه استریل شدند. سپس، ریزنمونه‌ها سه‌بار به‌مدت ۵ دقیقه با آب مقطراستریل آب‌کشی شدند. برگ‌های استریل در قالب ٦ تکرار، بر روی محیط‌کشت MS دارای ۳ درصد ساکارز و ۸ گرم در لیتر آگار با pH معادل ۵/۸، در تیمارهای مختلف از تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی BAP و NAA در دوره نوری ١٦ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی با شدت نور ۳۰۰۰ لوکس در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد کشت شدند. در کشت سوسپانسیون از کالوس‌های ترد رشدیافتهٔ آزمایش قبل، در محیط کشت MS همراه‌با ۱/۵ میلی‌گرم بر لیتر BAP و ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر NAA استفاده شد (۲۱). کالوس‌های ترد در اندازه‌های تقریبی ۱/۵ سانتی‌متر با استفاده از اسکالپل در شرایط کاملاً استریل به ۱۰ الی ۱۵ قطعه کوچک‌تر تقسیم و ۱ گرم از کالوس به ۵۰ میلی‌لیتر محیط کشت مایع در ظروف ارلن مایر با حجم ۲۵۰ میلی‌لیتر انتقال داده شد. محیط‌های سوسپانسیونی در شیکرانکوباتور با شرایط دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و سرعت ۱۱۰ دور در دقیقه در شرایط ١٦ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی به مدت یک ماه نگه‌داری شدند. پس از گذشت یک ماه و مشاهده تولید سلول‌های جدید و سازگاری اولیه کالوس‌ها در شرایط کشت سوسپانسیون سلولی، کالوس‌های تولید شده هر دو هفته یکبار به محیط جدید بازکشت شدند. برای جداسازی سلول‌ها از توده کالوسی تشکیل شده، مقدار ۱ گرم کالوس در محیط تازه با آنزیم پکتیناز در غلظت ۰/۱ درصد به مدت ١٦ ساعت در شرایط تاریکی با سرعت ٦٠ دور در دقیقه روی شیکر تیمار شدند. پس از جداسازی، سلول‌ها با سانتریفیوژ ته‌نشین شدند و سه بار با آب مقطر استریل شستشو شدند. سپس، سلول‌ها در شرایط کشت سوسپانسیون در محیط MS همراه با ۱/۵ میلی‌گرم بر لیتر BAP و ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر NAA قرار گرفتند. نمونه‌ها هر ۲ هفته بازکشت شدند و این عمل تا تولید حجم مناسب از سلول‌ها (۸ هفته) تکرار شد. در هر بازکشت مقدار ۲۰ میلی‌لیتر محیط کشت تازه به سوسپانسیون افزوده شد (شکل ۱).

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2025-01-22]



شکل ۱ و ۲) کشت سوسپانسیون سلولی و کالوس‌های حاصل از کشت سوسپانسیون؛ ۳ و٤) قرارگیری توده‌های سلولی در محیط دارای پکتیناز و جداسازی سلول‌ها

۲-۲ اندازه‌گیری وزن سوسپانسیون سلولی

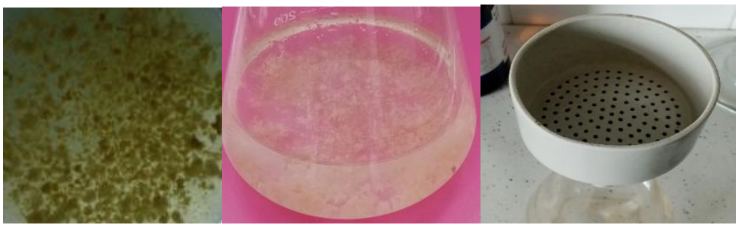
برای اندازه‌گیری وزن سلولی، ابتدا ۵۰ میلی‌لیتر محیط کشت در ارلن‌های ۲۵۰ میلی‌لیتری تهیه و استریل شد. سپس، در زیر هود لامینار مقدار ۲۰ میلی‌لیتر محیط حاوی سلول‌ها از فیلتر استریل عبور داده شد و به محیط تازه اضافه و ارلن‌ها به شیکر انکوباتور انتقال داده شدند. اندازه‌گیری وزن هر یک از نمونه‌ها به فاصله ۲ روز یک‌بار و به مدت ٦ هفته با استفاده از قیف بوخنر و کاغذ صافی انجام شد (شکل ۲). خشک کردن نمونه‌های سلولی نیز در آون با دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد و در مدت ٤۸ ساعت انجام شد.

۲-۳ اندازه‌گیری تعداد سلول‌ها

برای شمارش سلول‌ها ابتدا مقداری از محلول سوسپانسیون با سرعت ۱۵۰۰ دور در دقیقه در مدت ۵ دقیقه سانتریفوژ شد. پس از سانتریفیوژ سلول‌ها، محیط رویی دور ریخته شدند و سلول‌ها در یک میلی‌لیتر محیط کشت به‌طور کامل سوسپانسیون شدند. برای تعیین تعداد سلول‌ها در واحد حجم از لام و لامل هموسایتومتری استفاده شد. برای جلوگیری از بروز خطا ابتدا محلول سوسپانسیون با آب مقطر دیونیزه به میزان ۱/۲ و با افزودن ۱ میلی‌لیتر آب مقطر به هر ۱ میلی‌لیتر سوسپانسیون رقیق شد. رنگ‌آمیزی سلول‌ها با محلول تریپان بلو انجام شد. ابتدا ۰/۵ میلی‌لیتر از محلول سوسپانسیون و ۰/۵ میلی‌لیتر تریپان بلو در نسبت‌های برابر ترکیب شد و مقدار ۱۰ میکرولیتر از محلول زیر لامل هموسایتومتری منتقل شد. پس از گذشت ۵ دقیقه با ۵ قطره آب مقطر شسته شد و سلول‌های بی‌رنگ (زنده) در زیرمیکروسکوپ نوری با بزرگنمایی ۱۰× و ٤× شمارش شدند.

۲-٤ تهیه عصاره

مقدار ۰/۵ گرم از برگ گیاه گلدانی، کالوس وسلول‌های کشت سوسپانسیون برداشته شد و نمونه‌ها درون هاون چینی با استفاده از ازت مایع پودر شد.



شکل۲ اندازه‌گیری وزن سلول‌ها با استفاده از قیف بوخنر و کاغذ صافی

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2025-01-22]

نمونه‌های پودر شده از هر تیمار در فالکون‌های مجزا ریخته شدند و ۵ میلی‌لیتر از محلول آب/ متانول به نسبت ۹/۱ به آنها اضافه شد. سپس، نمونه‌ها به مدت ۳۰ دقیقه در دستگاه حمام اولتراسونیک قرار گرفتند. پس از آن، نمونه‌ها به مدت ۱۰ دقیقه در دور ۱۵۰۰ سانتریفیوژ شده و در یخچال در دمای منفی ۲۰ درجه سانتی‌گراد برای مطالعات بعدی نگه‌داری شدند (۱۹). سپس، نمونه‌ها برای شناسایی ترکیبات توسط GC/MS به آزمایشگاه مربوطه منتقل شدند. عصاره‌هایی که برای تزریق در دستگاه GC/MS استفاده می‌شدند نیاز به خشک شدن داشتند. به‌دلیل هیدروالکلی بودن عصاره‌ها ابتدا توسط روتاری در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد متانول از آن خارج شد و سپس، توسط فریزر درایر در دمای منفی ۵۰ درجه سانتی‌گراد خشک شدند و در نهایت پس از آماده‌سازی کامل عصاره‌ها به دستگاه تزریق شد.

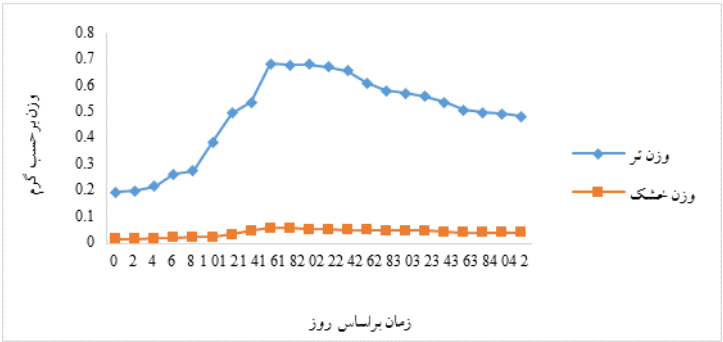
۲-۵ استفاده از دستگاه GC/Mass

دستگاه کروماتوگرافی گازی استفاده شده از نوع Agilent 7890 با ستون به طول ۳۰ متر، قطر داخلی ۰/۲۵ میلی‌متر و ضخامت لایه ۰/۲۵ میکرومتر از نوع HP-5MS بود. برای شناسایی ترکیبات تشکیل‌دهنده، ۱ میکرولیتر از نمونه رقیق شده با متانول به دستگاه GC/Mass تزریق شد. برنامه دمایی ستون به‌صورت زیر تنظیم شد. دمای ابتدایی آون ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد بود. گرادیان حرارتی ۱۰ درجه سانتی‌گراد در هر دقیقه، افزایش دما تا ۲۰۰ درجه سانتی‌گراد و توقف در این دما به‌مدت ۵ دقیقه با سرعت ۳ درجه در هر دقیقه، افزایش دما تا ۲۸۰ درجه سانتی‌گراد و توقف در این دما ۸ دقیقه بود. دمای اتاقک تزریق ۲۷۰ درجه سانتی‌گراد به‌صورت splitless بود و از گاز هلیوم حامل با سرعت جریان (فلو) ۱ میلی‌لیتر در دقیقه استفاده شد. طیف‌نگار جرمی مورد استفاده مدل Agilent 5975 با ولتاژ یونیزاسیون ۷۰ الکترون ولت تنظیم شد. محدوده اسکن مس‌ها از ۵۰ تا ٤۰۰ تنظیم شد و از نرم‌افزار chemstation استفاده شد. شناسایی طیف‌ها به کمک شاخص بازداری آنها و استفاده از اطلاعات موجود در کتابخانه کامپیوتری دستگاه (Nist 14.L و W9N11-L) انجام شد.

۳-نتایج

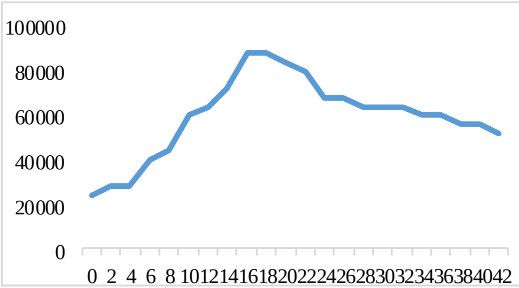
۳-۱ اندازه‌گیری وزن سلول در فاز رشد سوسپانسیون

تکنیک مطالعه روند رشدی کشت سوسپانسیون مبتنی بر اندازه‌گیری تغییرات وزن واحد مشخصی از حجم محیط کشت در یک دوره زمانی شش هفته‌ای بود. براساس نتایج این گزارش حداکثر رشد کشت سوسپانسیون (بیش‌ترین میزان تولید بیوماس) در روز شانزدهم با وزن تقریبی (وزن تر ۰/٦٨٤ و وزن خشک ۰/۰۵۷ گرم) مشاهده شد.

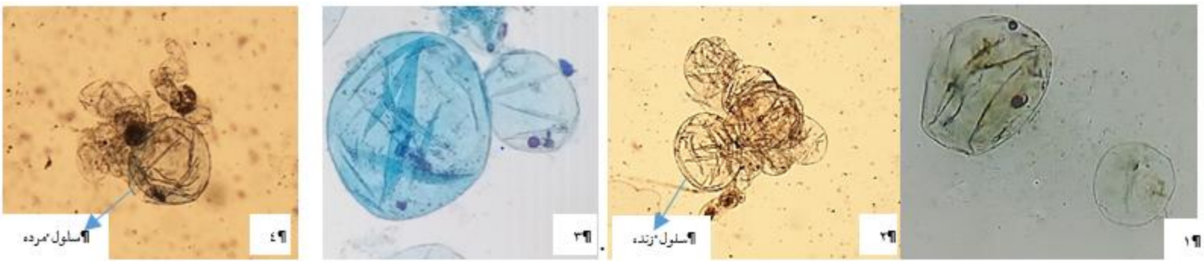


شکل ۳ منحنی شاخص رشد در محیط سوسپانسیون

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2025-01-22]



شکل ٤ نمودار تعداد سلول کشت سوسپانسیون سلولی در مدت ٦ هفته



شکل٥ سلول‌های حاصل از کشت سوسپانسیون سلولی. ۱ و ۲) سلول شفاف و بی‌رنگ سلولی زنده؛ ۳ و ٤)سلول آبی رنگ سلولی مرده.

منحنی رشد از روز شروع اندازه‌گیری وزن سلول‌ها تا روز چهارم مرحله خفتگی، روز پنجم تا شانزدهم مرحله تصاعدی و از روز هفدهم تا روز بیست و دوم مرحله سکون و از روز بیست و چهارم به بعد کاهش تدریجی در وزن سلول‌ها را نشان داد (شکل ۳).

۳-۲ تعداد سلول‌ها

تعداد سلول‌ها در هر ۱ میلی‌لیتر سوسپانسیون سلولی، در روز اول شمارش معادل ۲٤۰۰۰ سلول و بیش‌ترین میزان آن در روز شانزدهم معادل ۸۸۰۰۰ سلول بود (شکل ٤).

آنالیز GC/Mass

طبق نتایج به‌دست آمده از آنالیز GC/Mass ترکیبات موجود در عصاره‌های هیدروالکلی در جدول‌های زیر نشان داده شد (جدول ۱، جدول ۲ و جدول ۳). نوع و درصد ترکیبات تشکیل‌دهنده عصاره گیاه گلدانی بررسی شد. نتیجه این بررسی شناسایی تعداد ۱۷ ترکیب با غلظت بالاتر از ۰/۱ درصد بود. درصد نسبی هر کدام از ترکیبات تشکیل‌دهنده باتوجه به سطح زیرمنحنی در طیف کروماتوگرام به‌دست آمد. از میان این ترکیبات، ترکیبات اصلی (٦٪) شامل نئوفیتادین (۱۳/٤٤ درصد)، استیگماسترول (۱۲/۱۲ درصد)، ۹و۱۲-اکتادیکادینوئیک اسید (۱۲/۸۵ درصد)، ۹و۱۲و۱۵- اکتادیکاترینوئیک اسید (۱۰/۱۲ درصد) و هگزادیکانوئیک اسید متیل استر (۹/۰۵ درصد) عمده‌ترین ترکیب‌های تشکیل‌دهنده عصاره برگ گیاه گلدانی بود. نتیجه بررسی آنالیز GC/Mass در عصاره کالوس حاصل از محیط کشت جامد، شناسایی ٦ ترکیب با غلظت بالاتر از ۰/۰۱ درصد بود. از میان این ترکیبات اورس-۱۲-ان-۲۸- اوئیک اسید، ۳-هیدروکسی (٦/۸۷ درصد)، اورس-۱۲-ان-۲۸-ال (٥/۲۸ درصد) و اکتادیکانوئیک اسید (٤/٤٦ درصد) عمده‌ترین ترکیب‌های تشکیل‌دهنده این عصاره بود.

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2025-01-22]

جدول ۱ ترکیبات شناسایی شده در عصاره برگ گیاه آب‌بشقابی

ترکیب	درصد	سطح	زمان بازداری (دقیقه)
Neophytadiene	۱۳/٤٤	۱۰۰٤۰۰۰٦	۱۰/۷۱۸
Cyclohexane, 1,2,3-trimethyl	۰/۸۲	٦۱۱٤٦۱	۱۰/۷۹٦
2-Hexadecen-1-ol	۱/۸٤	۱۳۷۲۸۳۸	۱۱/۰۱۹
Methyl 8,11,14-heptadecatrienoate	۱/۳۷	۱۰۲٤۹۲۹	۱۱/۵۱۲
9-Hexadecenoic acid, methyl ester	۱/۰۷	۷۹٦۲۳۱	۱۱/۷۹۷
Hexadecanoic acid, methyl ester (=Palmitic acid, methyl ester)	۹/۰۵	٦۷۵۷٤۷٤	۱۱/۸۵۹
n-Hexadecanoic acid	۳/۱۰	۲۳۱۳۷۰٦	۱۲/٤۰۹
9,12-Octadecadienoic acid	۱۲/۰۳	۸۹۸۳۷٤۰	۱۵/۰۸۷
9,12,15-Octadecatrienoic acid	۹/۲۹	٦۹۳۹۸۵۰	۱۵/۲٤۸
Phytol	۳/٦۷	۲۷۳۸۲۳۳	۱۵/۵۳۰
Methyl stearate	۱/۳٤	۱۰۰۳۰۸٦	۱۵/۸۵۰
9,12-Octadecadienoic acid	۰/۸۲	٦۱۰۰۷۳	۱٦/۰٤۱
9,12,15-Octadecatrienoic acid (=Linolenic acid)	۰/۸۳	٦۲۱۵۸۰	۱٦/۲۰۲
7-Hexadecyn-1-ol	۰/۱۸	۱۳۱۰٦٦	۲۰/۹۵۵
Hexadecanoic acid	۱/۲۱	۹۰٦۷۳۰	۲۵/٦۲۰
Cyclohexasiloxane, dodecamethyl	۲/۱۵	۱٦۰٤۳۵۰	۲٦/۵۹۰
alpha.-Tocopherol	۲/۰۲	۱۵۰۸۹٦۸	۳۹/۸۰۵
Stigmasterol	۱۲/۱۲	۹۰۵۵۱٦۵	٤۲/۱۱٤
beta.-Sitosterol	٤/۵۰	۳۳٦۲۰۷۰	٤۳/۳۷۰

جدول۲ ترکیبات شناسایی شده در عصاره کالوس آب‌بشقابی

ترکیب	درصد	سطح	زمان (دقیقه)
Hexadecamethylcyclooctasiloxane	۰/۰۱۵	۱٤٦۰٤۳	۱۲/٦٦۹
Heptadecanoic acid, ethylester	۰/۷۰	٦٦۰٦۸۵	۱٦/۸۹۸
Octadecanoic acid	٤/٤٦	٤۲۳۵٤٦۸	۱۸/۰۲٤
Urs-12-en-28-oic acid, 3-hydroxy	٦/۸۷	٦۵۲۰٦٤۹	۲۲/٦٦۷
Urs-12-en-28-oic acid, 3-hydroxy	۰/۷۱	٦۷۳۹۸٦	۲۳/۹۲۳
Urs-12-en-28-oic acid, 3-hydroxy	۰/٦٦	٦۳۰۵۹۲	۲۳/۹۷۵
Urs-12-en-28-al	۵/۲۸	۵۰۱٦۳٤۷	۲٤/۳۸۰
3,3-Diethoxy-1,1,1,5,5,5-hexamet	۰/۰۸	۷۲۱۰۲	۲٦/۳۵۱

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2025-01-22]

جدول۳ ترکیبات شناسایی شده در عصاره سلول‌های حاصل از کشت سوسپانسیون آب‌بشقابی

ترکیب	درصد	سطح	زمان (دقیقه)
Neophytadiene	۰/۲۳	۳۳٦۰٥۳	١٤/۹٤۷
Hexadecanoic acid, ethyl ester	۰/۸	۱۱۹۱۹۷۷	١٦/۸٦۱
Octadicanoic acid	۲/۰٦	۳۰۷۱۳٤۰	۱۸/۰۱۸
Octadecanoic acid, 17-methyl	۰/۲٦	۳۹۳۹۳۲	۱۹/۱٤٤
Stigmasterol	۱/۲٦	۱۸۷۳٦۲٤	۲۱/۱٥۲
Stigmasterol	۰/۲۲	۳۳۰۰۰۱	۲۱/۲۲۰
Urs-12-en-28-oic acid, 3-hydroxy	٥/۰٤	۷٥۰٥۷۸٦	۲۲/٦٦۲
Thunberginol F trimethyl ether	۰/۳۱	٤٥۹۲٥۷	۲۳/۱۰۳
beta-sitosterol	۷/٥۹	۱۱۳۰۱۲۳۹	۲۳/٥٥
Urs-12-en-28-oic acid, 3-hydroxy	٤/۰۳	٦۰۰٥۲۹۷	۲۳/۹۳۹
3-(4-Methoxy-3-tert-butyl-5-meth)	۱۲/۷٦	۱۸۹۹۹٦۸۲	۲٤/۳٦٤
2-H-cyclopropabenzofuran	۱/٥٦	۲۳۲۷٦٤۷	۲٤/٥۹۲
Aromadendrene	٤/۲۰	٦۲٤۷۹٦۷	۲٤/۸۳٦
Alpha-amyrin	٤/۲۱	٦۲۷۰۰٦۲	۲٥/٤٦۹
Alpha-amyrin	٥/۷٦	۸٥۸٥٤٤٦	۲٥/٤۹٥
Hop-22(29)-en-3beta-ol	۳/۰۸	٤٥۹۱۲۷٦	۲۷/۸٥۱

نتیجه بررسی آنالیز حاصل از عصاره کشت سوسپانسیون سلولی شناسایی ۱۳ ترکیب با غلظت بالاتر از ۰/۱ درصد بود. از میان این ترکیبات ۳-٤-متوکسی-۳-ترت-بوتیل-٥-مت (۱۲/۷٦ درصد)، بتاسیتوسترول (۷/٥۹ درصد)، اورس-۱۲-ان-۲۸- اوئیک اسید، ۳-هیدروکسی (٥/۰٤ درصد) و آلفاآمیرین (٥/۷٦ درصد) عمده‌ترین ترکیبات تشکیل‌دهنده عصاره حاصل بود.

طبق نتایج به‌دست آمده از آنالیز GC/MS و مقایسه میان ترکیبات موجود در عصاره‌های برگ گیاه گلدانی، کالوس‌های حاصل از کشت جامد و سوسپانسیون سلولی تفاوت قابل‌توجهی در نوع ترکیبات موجود در نمونه‌های تزریق‌شده وجود دارد. از میان ترکیبات موجود در عصاره‌ها نئوفیتادین، استیگماسترول و بتاسیتوسترول ترکیباتی مشابه در عصاره‌های گیاه و کشت سوسپانسیون بودند، همچنین اکتادیکانوئیک اسید و اورس-۱۲-ان-۲۸-اوئیک اسید،۳-هیدروکسی ترکیباتی مشابه در کالوس و کشت سوسپانسیون سلولی بود. مطابق نتایج حاصل از پروفایل GC/MS عصاره‌های برگ، کالوس و کشت سوسپانسیون، متابولیت‌های موجود در عصاره‌ها تفاوت قابل‌توجهی داشته و نشان‌دهنده تفاوت قابلیت سلول‌های تمایزیافته و غیرتمایزیافته در تولید ترکیبات مختلف می‌باشد. در بررسی نسبت‌های ترکیبات مشابه با مقایسه سطح زیر کروماتوگرام حاصل از هر ترکیب در عصاره‌ها، مشخص شد میزان نئوفیتادین در گیاه ۲۹/۸۷ برابر و استیگماسترول ٤/۱ برابر بیش‌تر از سلول‌های کشت سوسپانسیون می‌باشد اما ترکیب بتاسیتوسترول در کشت سوسپانسیون ۳/۳٦ برابر بیش‌تر از برگ گیاه بود. همچنین مقایسه میزان ترکیبات مشابه در کالوس و کشت سوسپانسیون نشان داد اورس-۱۲-ان-۲۸-اوئیک اسید، ۳-هیدروکسی ۱/۷۲ برابر بیش‌تر از کالوس و ترکیب اوکتادیکانوئیک اسید در کالوس ۱/۳۷ برابر بیش‌تر از کشت سوسپانسیون بود، بنابراین به‌نظر می‌رسد در

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2025-01-22]

عصاره‌های حاصل از برگ، کشت سوسپانسیون و کالوس برای ترکیبات مشابه از نظر میزان نسبت مقادیر براساس نوع ترکیب تفاوت وجود دارد.

٤-بحث

٤-١ کشت سوسپانسیون سلولی

عوامل متعددی از قبیل ژنوتیپ و شرایط فیزیولوژیک گیاه مادری، نوع ریزنمونه، نوع و غلظت تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی در رشد و نمو سلول‌ها در کشت درون‌شیشه‌ای مؤثر هستند[٢٢]. در مطالعه حاضر نیز کشت‌های سوسپانسیون سلولی حاصل از کالوس‌های برگی از رشد و تکثیر نسبتاً بالایی برخوردار بودند. به عبارت دیگر ریزنمونه برگ در محیط کشت دارای غلظت‌های ١/٥ میلی‌گرم بر لیتر BAP و ٠/٥ میلی‌گرم بر لیتر NAA در کالوس‌زایی و استقرار و رشد سوسپانسیون سلولی مؤثر بود. امروزه تولید متابولیت‌های ثانویه در سیستم‌های کشت سوسپانسیون سلولی گیاهان دارویی با انواع روش‌های بسته و پیوسته صورت می‌گیرد. در سیستم‌های بسته، رشد و نمو سلول‌ها و همچنین تولید متابولیت‌های ثانویه در تقابل با شرایط حاکم بر این سیستم اعم از مواد غذایی و پیشسازها قرار دارد که در طی دوره رشد با محدودیت روبه‌رو می‌شوند. رشد و نمو سلول‌ها در مراحل ابتدایی دوره کشت با سرعت بیشتری انجام گرفته و به‌تدریج با محدود شدن مواد غذایی محیط کشت، به فاز ثابت وارد می‌شود. نتایج به‌دست آمده از این پژوهش نیز این موضوع را تأیید می‌کند چرا که سلول‌های کشت شده آب‌بشقابی نیز در هفته سوم وارد فاز ثابت شدند. درصورتیکه هدف از القای کالوس در یک گیاه دارویی تولید و بهره‌برداری از متابولیت‌های ثانویه آن درون سیستم‌های کشت سوسپانسیون باشد، مطالعه منحنی تولید برای این سیستم بسیار ضروری است. نتایج حاصل از مطالعه الگوی رشد و تولید برای کشت‌های سوسپانسیون سلولی بهترین زمان برای بالاترین مقدار تولید را مشخص می‌کند.

رشد سلول در محیط کشت سوسپانسیون بعد از گذشت چهار روز از کشت، رشد سریع و قابل‌قبولی نشان داد و مرحله تصاعدی بعد از گذشت چهار روز دیده شد که در پی آغاز این مرحله به تدریج افزایش وزن و تراکم سلولی در سلول‌ها اتفاق افتاد که تا روز شانزدهم به حداکثر مقدار خود رسید. پس از این مرحله، رشد سلول ثابت شده و تراکم محیط کشت تا روز بیست‌ودوم ثابت ماند و پس از آن روند کاهشی را پیش گرفت. توقف رشد سلولی و کاهش وزن و تراکم سلول‌ها می‌تواند به دلیل تخلیه عناصر و تنظیم‌کننده‌های رشد موجود در محیط کشت باشد [٢٣]. تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی از عوامل اصلی در تقسیم و رشدونمو سلول‌های گیاهی هستند. تقسیم سلولی در محیط کشت وابسته به حضور اکسین و سایتوکنین است. سایتوکنین‌ها به‌طور مستقیم روی چرخه سلولی تأثیر دارند و در تنظیم سنتز پروتئین‌های درگیر در تشکیل و عملکرد رشته‌های دوک دخالت می‌کنند. اکسین نیز از طریق افزایش انبساط‌پذیری دیواره سلولی و تحریک رونویسی mRNAهای ویژه رمزکننده پروتئین‌های درگیر با رشد سلول در چرخه سلولی فعالیت می‌کند [٢٤]. نتایج این پژوهش نشان داد سلول‌های حاصل از کشت سوسپانسیون قابلیت تقسیم و افزایش تراکم سلولی را در مدت بیست‌ودو روز دارند و بعد از آن کاهش در میزان سلول‌ها دیده شد. هیدالگو و همکاران [١٧] در بررسی کشت سوسپانسیون آب‌بشقابی اشاره کردند در منحنی رشد سلولی فاز تصاعدی تا روز دوازدهم کشت ادامه داشت و شروع فاز سکون در روز هجدهم کشت بود که رشد رده‌های سلولی به‌طور قابل‌توجهی کاهش یافت که تاحدودی با نتایج این پژوهش همراستا است. کریشنان و همکاران [١٩] در بررسی کشت سوسپانسیون آب‌بشقابی بیان کردند فاز

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2025-01-22]

خفتگی و سکون در منحنی رشد سلولی دیده نشد و فاز تصاعدی تا سی و نه روز ادامه داشت و فاز مرگ سلول در روز چهل بود. در این پژوهش فاز تصاعدی تا روز شانزدهم ادامه داشت و در نهایت روند کاهشی در رشد و تقسیم سلولی دیده شد. تولید متابولیت‌ها با مرحله لگاریتم یا نمایی یک کشت مرتبط است که طی دوره رشد فعال سلول قابلیت تولید ترکیبات متعددی فراهم می‌شود [۲۵]. در بررسی تولید متابولیت‌های ثانویه در سلول‌های سوسپانسیون سلولی، دو نوع فنوتیپ مختلف از آب‌بشقابی بیان شد. فاز خفتگی تا روز سوم کشت و پس از آن فاز رشد نمایی تا روز دوازدهم ادامه داشت و فاز سکون در روزهای سیزدهم و چهاردهم دیده شد[۱۷] و نتایج مشابهی توسط بوهوچی [۲٦] گزارش شد که تا حدودی با نتایج این پژوهش مطابقت دارد. مطابق نتایج این پژوهش فاز خفتگی تا روز چهارم بود و بعد از آن مرحله تصاعدی آغاز شد و بالاترین میزان رشد سلولی براساس وزن تر و خشک سلول‌ها در روز شانزدهم دیده شد. سپس، مرحله سکون تا روز بیست‌ودوم ادامه داشت و به تدریج روند کاهشی در میزان رشد سلولی دیده شد. مطالعه حاضر نشان داد که کشت سوسپانسیون سلولی یک انتخاب مناسب برای تولید متابولیت‌های مختلف گیاهی است. بالاترین مقدار بیوماس سلولی در هفته سوم کشت به‌دست آمد که می‌تواند برای استفاده از الیسیتورها در آزمایشات جالب توجه باشد.

٤-۲ آنالیز GC/MS

طبق نتایج به‌دست آمده از آنالیز GC/Mass و مقایسه میان ترکیبات موجود در عصاره‌های گیاه گلدانی، کالوس‌های حاصل از کشت جامد و سوسپانسیون سلولی تفاوت قابل‌توجهی در نوع ترکیبات موجود در نمونه‌های تزریق‌شده وجود دارد. از میان ترکیبات موجود در عصاره‌ها نئوفیتادین، هگزادیکانوئیک اسید، استیگماسترول و بتاسیتوسترول ترکیباتی مشابه در عصاره‌های گیاه و کشت سوسپانسیون بودند. همچنین، اکتادیکانوئیک اسید و اورس-۱۲-ان-۲۸-اوئیک اسید، ۳، هیدروکسی ترکیباتی مشابه در کالوس و کشت سوسپانسیون سلولی بودند که نشان‌دهنده تفاوت قابلیت سلول‌های تمایزیافته و غیرتمایزیافته در تولید ترکیبات مختلف می‌باشد[۲۹-۲۷]. برگ‌های گیاه در مقایسه با کالوس و سلول‌های سوسپانسیون دارای ترکیبات بیش‌تر و متفاوتی بوده و این امر می‌تواند به‌دلیل تمایز و اختصاصی بودن بافت برگ باشد. به‌طور کلی ژن‌هایی که آنزیم‌های بیوسنتز متابولیت‌های مختلف گیاهی را کد می‌کنند، ظاهراً در یک سلول یا بافت خاص در سیستم‌های مختلف تنظیم می‌شوند. در کشت‌های تمایزنیافته یا در بافت‌های غیرمعمول، ژن‌های مربوطه معمولاً متفاوت عمل کرده و تنها پس از تمایز بافتی، تنظیم صحیح ژن‌های کدکننده آنزیم‌های بیوسنتز یا ناقل‌های بالقوه ارائه می‌شود [۳۰]. همچنین با مشاهده تفاوت ترکیبات موجود در عصاره کالوس و کشت سوسپانسیون به‌نظر می‌رسد ژن‌های مؤثر در سنتز متابولیت‌ها تحت‌تاثیر شرایط کشت و عوامل محیطی نیز قرار می‌گیرند. سلول‌های حاصل از کشت سوسپانسیون سلولی قابلیت تولید ترکیبات متنوعی را داشت که نشان از اثربخشی نوع کشت و شرایط تولید سلول در سنتز متابولیت‌های گیاهی می‌باشد. تولید متابولیت‌ها به‌وسیله ژن‌ها کنترل می‌شود اما تولید آنها تحت‌تاثیر عوامل محیطی نیز می‌باشد و اثر هر دو منجر به تغییراتی در نوع و کیفیت متابولیت‌ها می‌شود. نتایج این پژوهش نشان داد کالوس و کشت سوسپانسیون سلولی قابلیت تولید ترکیبات متفاوتی را دارا هستند که این ترکیبات می‌تواند متفاوت از گیاه مادری باشد[۳۱]. مقایسه نتایج GC/Mass حاصل از کالوس با کشت سوسپانسیون سلولی نیز بیانگر توان بیوشیمیایی متفاوت این محیط‌ها است. کالوس و کشت سوسپانسیون سلولی تا حد زیادی قابلیت تولید ترکیباتی غیرمشابه با گیاه را دارد و می‌توان

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2025-01-22]

نتیجه گرفت متابولیسم گیاه در کالوس و کشت سوسپانسیون سلولی تا حدود زیادی متفاوت از بافت‌های گیاهی می‌باشد.

۵-نتیجه‌گیری

مطابق نتایج این پژوهش، کالوس و سلول‌های حاصل از کشت سوسپانسیون سلولی قابلیت تولید ترکیبات متفاوتی را دارند. سلول‌های حاصل از کشت سوسپانسیون قابلیت تولید ترکیبات بیش‌تری نسبت به کالوس دارد که می‌تواند ناشی از شرایط کشت و تماس مستقیم سلول‌ها با محیط کشت دارای تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی باشد. سلول‌های غیرتمایزیافته قابلیت تولید متابولیت‌های مختلفی را داشته و از این ویژگی می‌توان برای افزایش و تولید ترکیبات خاص استفاده کرد.

٦-منابع

[1] Mozaffarian, V. 1983. The family of Umbelliferae in Iran (Keys and distribution). Research Institute of Forests and Rangelands. Iran, pp: 23-24.

[2] Rechinger, K.H. Flora Iranica (Umbelliferae). 1987. Akademische Druck-U. Verlagsanstalt. Graz –Austria. vol: 162; p: 39.

[3] Jalili, A. and Jamzad, Z. 1999. Red data book of plant species of Iran. Research Institute of forests and rangelands. Iran, p: 663.

[4] Gruenwald, J., Brendler, A. and Jaenicke, C. 2000. PDR for Herbal Medicine. 2th Edition. Medical economics Co. Montvale New Jersey, pp: 729-731.

[5] Frank, S. and Amelio, D. 1999. Botanicals aphytocosmetic desk reference CRC. America, pp: 119-21.

[6] Kuhn, M.A. 2000. Herbal therapy and supplements, Lippincott. NewYork, pp: 163-66.

[7] Edeoga, H.O., Okwu, D.E., Mbabie, B.O. 2005. Phytochemical constituents of some Nigerian medicinal plants. African Journal of Biotechnology, 4:685-688.

[8] Pichersky, E, Gang, D.R. 2000. Genetics and biochemistry of secondary metabolites: an evolutionary perspective. Trends Plant Science, 5:439-445.

[9] Moore, B.D., Andrew. R.L., Kulheim, C., Foley, W.J. 2014. Explaining intraspecific diversity in plant secondary metabolites in an ecological context. New Phytologist, 201:733-750.

[10] Mulabagal, V., Tsay, H.S. 2004. Plant cell cultures an alternative and efficient source for the production of biologically important secondary metabolites. International Journal of Applied Science and Engineering Research, 2: 29-48.

[11] Kumar, J., Gupta, P.K. 2008. Molecular approaches for improvement of medicinal and aromatic plants. Plant Biotechnology Reports, 2: 93-112.

[12] Sato, F., Hashimoto, T. and Hachiya, A., 2001. Metabolic engineering of plant alkaloid biosynthesis. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 17(3): 201-211.

[13] Ikeuchi, M., Sugimoto, K. and Iwase, A. 2013. Plant callus: Mechanism of induction and repression. The Plant Cell, 25(9): 3159-3173.

[14] Mujib, A., Bandhyopadhyay, S., Ghosh, P.D. 2000. Tissue culture derived plantlet variation in Caladium an important ornamental. Plant Cell, Tissue and Organ Culture., 10: 149-155.

[15] Senoussi, M.M., Nora, B., Joe, C. 2009. Impact of hypoxia on the growth and alkaloid accumulation in *Catharanthus roseus* cell suspension. Acta Physiologiae Plantarum., 31: 359–362.

[16] Phillips, G.C., Hubstenberger, J.F., Hansen, E.E. 1995. Plant regeneration by organogenesis from callus and cell suspension cultures. Plant Cell,Tissue and Organ Culture, pp. 67-78.

[17] Terry, J., Riaan, J. and Dubery, H. 2008. Characterisation of two phenotypes of *Centella asiatica* in southern africa through the composition of four triterpenoides in callus, cell suspensions and leaves. Plant cell Tissue and Organ Culture, 94: 91-99.

[18] Hidalgo, D., Steinmetz, V., Brossat, M., Tournier, L., Cusido, M., Corchete, P. and Palazon, J. 2017. An optimized biotechnological system for the production of centellosides based on elicitation and bioconversion of *Centella asiatica* cell

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2025-01-22]

cultures. Engineering in Life Sciences, 17: 413-419.
[19] Krishnan, M., Roy, A. and Bharadvaja, N. 2019. Elicitation effect on the production of Asiaticosid and Asiatic acid in shoot, callus and cell suspension culture of *Centella asiatica*. Journal of Applied Pharmaceutical Science, 9(6): 67-74.
[20] Hoang Loc, N. and Giang, N. 2012. Effect of elicitors on the enhancement of Asiaticoside biosynthesis in cell cultures of Centella (*Centella asiatica* L. urban). Chemical papers, 66(9): 642-648.
[21] Heidargholinezhad, F., Hamidoghli, Y., Ghasemiomran, V. and Biparva, P. 2023. Evaluation of the callogenesis of *Centella asiatica* (L.) Urban, a medicinal plant. Nova Biologica Reperta, 4(10). (In Persian)
[22] Alavi, S.M., Masoumiasl, A., Zare, N., Asghari Zakaria, R. and Sheikhzade Mosaddegh, P. 2019. The role of ecotype, explant and plant growth regulators on cell suspension culture of Ferulago angulate (Schlecht.) Bioss. Journal of Horticultural Science, 33(3): 525-536.
[23] Sellapan, P., Rosseleena, E. and Mohdnoor, N. 2018. Sesquiterpene production in methyl jasmonate induced Persicaria minor cell suspension culture. Sains Malaysiana, 47(12): 3051-3059.
[24] Richard, D., Lescot, M., Inze, D. and Deveylder, L., 2002. Effect of auxin, cytokinin, and sucrose on cell cycle gene expression in *Arabidopsis thaliana* cell suspension cultures. Plant Cell Tissue and Organ Culture, 69: 167-176.
[25] Ridzuan, S.Z., Rossleena, R., Baharum, S.N. and Mohdnoor, N. 2018. Metabolite profiles of callus and cell suspension cultures of mangosteen. Biotech, 8:322-327.
[26] Bouhouche N, Solet JM, Simon-Ramiasa A, Bonaly J, Cosson L. 2000. Conversion of 3-dimethylthiocolchicine into thiocolchicoside by Centella asiatica suspension cultures. Phytochemistry, 47:743–747.
[27] Sugunabai, J., Jeyaraj, M., Karpagam, T., Varalakshmi, B., Senthilrani, S., Shamugapriya, A., Kalaiyarasi, G., Renuga, R. and Gomathi, S. 2018. Outlining of phytochemicals and GC-MS profile of Centella asiatica. International Journal of Pharmaceutics & Drug Analysis, 6(2): 252-256.
[28] Onkedo, D.A., Juma, F.B., Baraza, D.L. and Nyongesa, P.K. 2020. LC-ESI/MS and GC-MS methanol extract analysis, phytochemical and antimicrobial activity studies of Centella asiatica. Asian Journal of Chemical Scinces, 8(3): 32-51.
[29] Thuraisingam, S., Salim, N., Azmi, I., Kassim, N.K., Barsi, H. 2023. Development of nanoemulsion containing Centella asiatica crude extract as a promising drug delivery system for epilepsy treatment. Biointerface Research in Applied Chemistry, 13(1):1-24.
[30] Margl, L., Teib, A., Istva, G. and Wink, M. 2001. GLC and GLC-MS analysis of thiophene derivatives in plants and in in vitro cultures of Tagetes patula L. (Asteracea). Journal of Medicinal Plants, 21(3): 121-127.
[31] Bonfill, M., Mangas, S., Moyano, E., Cusido, R.M. and Palazon, J. 2011. Production of centelloside and phytosterols in cell suspension cultures of Centella asiatica L. Plant Cell Tissue Organ Culture, 104: 61-67.

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2025-01-22]

Production of cell culture in *Centella asiatica* L. and comparison of metabolites production in callus, cell suspension culture and whole plant.

Fereshteh Heidargholinezhad[1], Yousef Hamidoghli[2*], Valiollah ghasemiomran[3], Pouria Biparva[4]

1. PhD student of breeding and biotechnology of horticultural products in Guilan University, Rasht, Iran.
2. Associate professor of department horticulture Guilan University, Rasht, Iran.
3. Assistant professor of tabarestan institute of genetics and biotechnology, Sari, Iran.
4. Associate professor of department basic sciences of sari agricultural sciences and natural resources university, Sari, Iran

y.hamidoghli@yahoo.com

Receipt: 2023/03/16 Accepted: 2024/07/31

Abstract

The production of secondary metabolites of medicinal plants through cell culture is valuable for studying and accessing to these resources. *Centella asiatica* L. is one of the valuable medicinal plants, which is very important due to its medicinal properties, specific and limited distribution. The application of undifferentiated cell culture including callus and cell suspension culture is a biotechnological method for the production of valuable compounds. In this study, the cells obtained of suspension culture from callus and identification of its volatile compounds are interested by GC-MS device. The study of the cell growth pattern shown that the fresh weight, dry weight and number of cells in the period of 42 days after inoculation, the time of growth and increase of cells is the fifth day and exponential phase continued until the16th day that was obtained the highest amount of fresh weight (0.684 gr), dry weight (0.057 gr) and cell number (88000 cells per 1 ml). After that, the cells entered the stationary phase, which lasted until the 22nd day and after passing through the stationary phase, a gradual decrease cell growth was seen. Also, the results of extracts analysis showed the callus and cell suspension culture are produce different compounds from the mother plant. In the plant, callus and cell suspension culture were identified 17, 6 and 13 compounds respectively. Among the compounds found in the extracts, Neophytadiene, Stigmasterol and beta-Sitosterol were in plant and cells of suspension culture, also Octadicanoic acid and Urs-12-en-28-oic acid were in callus and cell suspension culture.

Keywords: Gas chromatography, *In vitro* culture, Medicinal plant, Mass spectrometry, Plant metabolites.

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2025-01-22]