



The effect of melatonin elicitor on cell health and content of secondary metabolites of medicinal plant oregano (*Mentha longifolia*)

Abyari M*

-Ph.D., Department of Science, Farhanghiyan University, Tehran, Iran. Email: m.abiyari@cfu.ir

Original Article

Use your device to scan and read the article online



Citation: Abyari M. The effect of melatonin elicitor on cell health and content of secondary metabolites of medicinal plant oregano (*Mentha longifolia*). Journal of Cell and Tissue . 2025; 15(4):336-348.

<https://10.61186/JCT.15.3.336>

KEYWORDS

Biotic elicitor
Melatonin
Oregano
Secondary metabolites

ABSTRACT

Aim: Oregano (*Mentha longifolia*) is an important medicinal plant from the mint family, which is widely used in food and pharmaceutical industries due to its active compounds. As an efficient approach, the use of biological elicitors (yeast, bacterial, and fungal agents) as well as non-biological elicitors (inactive enzymes, ultraviolet rays, heavy metal salts, polysaccharides, salicylic acid, jasmonic acid, and melatonin) can provide a way to increase the production of secondary metabolites in plant cell cultures. Given the importance of Oregano in the pharmaceutical and therapeutic industries, this study was carried out to assess melatonin's effect on the percentage of cell viability and the level of important bioactive compounds of oregano.

Materials and methods: This study was performed in a factorial experiment with a completely randomized design and three replications in the lab. Melatonin (0, 100, and 200 μM based on the previous studies) was added to the MS culture medium containing 2,4-D (1 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$). Then, 24, 48, and 72 h after treatment, the percentage of cell survival and the level of important oregano compounds were measured by tetrazolium and HPLC tests, respectively. In SAS software version 9.4, analysis of variance (ANOVA) was used to analyze the data and the LSD method to compare the means.

Results: Based on the results of the tetrazolium test, there was no significant difference in the percentage of cell viability in various concentrations of melatonin. However, the survival percentage of cells decreased with the passage of time, so that the lowest survival percentage was observed 72 h after melatonin treatment. Adding melatonin to the culture medium increased the production of secondary metabolites. At the concentration of 100 μM , the amount of menthol, menthone, pulegone, and 1,8-cineole increased by 77, 108, 46, and 80%, respectively, after 48 hours in contrast to the control. The increase in the level of menthol, menthone, pulegone, and 1,8-cineole compounds in the concentration of 200 μM of melatonin was respectively 125, 130, 140, and 120%, after 48 hours when

* Corresponding author. Tel.: +98-9142256346

E-mail address: m.abiyari@cfu.ir

DOI: : <https://10.61186/JCT.15.4.336>

Received: 2 Sep. 2024; Received in revised form: 15 Dec. 2024; Accepted: 22. Dec. 2024

Original Article

© Author



compared to the control. Therefore, increasing melatonin concentration from 100 to 200 μM in cell culture significantly increased the level of compounds compared to the control. The levels of menthol, menthone, pulegone, and 1,8-cineole increased up to 48 hours after treatment, but after that time, they showed a significant decrease. Since the ultimate goal is to increase the production of biologically active compounds and not the highest cell viability, therefore, 48 hours after applying the treatment of 200 μM melatonin provides the best conditions for obtaining a high level of valuable oregano metabolites. The above treatment increased menthol, menthone, pulegone, and 1,8-cineole by 125, 130, 140, and 120%, respectively.

Conclusion: In this study, for the first time, the effect of melatonin elicitor on important secondary metabolites of the Oregano plant was investigated to determine the potential of using this metabolic stimulant in research and commercial areas. Overall, The use of melatonin at a concentration of 200 μM along with the extraction of metabolites 48 hours after the treatment can enhance menthol, menthone, pulegone, and 1,8-cineol, while maintaining the viability of oregano cells.



تأثیر الیسیستور ملاتونین بر سلامت سلولی و محتوای متابولیت‌های ثانویه گیاه دارویی پونه کوهی (*Mentha longifolia*)

محمد آبیاری*

- استادیار، گروه علوم پایه، دانشگاه فرهنگیان، تهران، ایران

واژگان کلیدی	چکیده
الیسیستور غیرزیستی پونه کوهی ملاتونین متابولیت‌های ثانویه	<p>هدف: با توجه به اهمیت پونه کوهی (<i>Mentha longifolia</i>) در صنایع دارویی، این مطالعه با هدف ارزیابی تأثیر ملاتونین بر درصد زنده‌مانی سلولی و سطح ترکیبات زیست‌فعال مهم پونه کوهی انجام شد. مواد و روش‌ها: این مطالعه در قالب آزمایش فاکتوریل با طرح پایه کاملاً تصادفی با سه تکرار انجام شد. ملاتونین (با غلظت‌های ۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میکرومولار بر مبنای مطالعات گذر شده) به محیط کشت MS حاوی ۲،۴-D با غلظت 1 mg.L^{-1} افزوده شد. بعد از ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت از تیمار، درصد زنده‌مانی سلولی و سطح ترکیبات مهم پونه به ترتیب توسط آزمون تترازولیوم و HPLC سنجش شدند. نتایج: با افزودن ملاتونین در کشت سلولی، زنده‌مانی سلول‌های پونه کاهش یافت. با افزایش ملاتونین از ۱۰۰ به ۲۰۰ میکرومولار در کشت سلولی، سطح ترکیبات به‌طور معنی‌داری نسبت به شاهد افزایش یافت. سطوح منتول، منتون، پولگون و ۱،۸-سینئول تا ۴۸ ساعت بعد از تیمار افزایش یافتند اما بعد از آن زمان، کاهش معنی‌داری نشان دادند. از آنجایی که هدف نهایی، افزایش تولید ترکیبات فعال بیولوژیکی است و نه بالاترین زنده‌مانی سلولی، لذا با رعایت اعتدال، ۴۸ ساعت بعد از اعمال تیمار ۲۰۰ میکرومولار ملاتونین، بهترین شرایط را برای حصول سطح بالای متابولیت‌های ارزش پونه فراهم می‌کند. به‌طوری‌که تیمار فوق باعث افزایش ۱۲۵ درصدی منتول، ۱۳۰ درصدی منتون، ۱۴۰ درصدی پولگون و ۱۲۰ درصدی ۱،۸-سینئول شد. نتیجه‌گیری: کاربرد ملاتونین در غلظت ۲۰۰ میکرومولار و برداشت متابولیت‌ها ۴۸ ساعت بعد از تیمار می‌تواند ضمن حفظ سطح کافی زنده‌مانی سلول‌های پونه کوهی، باعث افزایش غلظت متابولیت‌های ثانویه شود.</p>
تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۰۶/۱۲	
تاریخ بازنگری: ۱۴۰۳/۰۹/۲۵	
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۱۰/۰۲	

۱- مقدمه

پونه کوهی (*Mentha longifolia*) یک گیاه دارویی مهم از خانواده نعناعیان است که به‌واسطه ترکیبات فعال خود، کاربرد فراوانی در صنایع غذایی و دارویی دارد. در طب سنتی، از پونه کوهی به‌عنوان یک گیاه با خواص ضدالتهاب، ضداسپاسم، ضدنفخ، ضد درد، مقوی معده، ضدقارچ، ضدباکتری استفاده می‌شود (۱). پونه کوهی به‌واسطه خاصیت آنتی‌اکسیدانتی بسیار قوی در درمان سرطان نیز به‌کار می‌رود، به‌طوری‌که با مهار رادیکال‌های آزاد از مارکرومولکول‌های سلولی نظیر DNA و پروتئین‌ها محافظت به‌عمل می‌آورد (۲). این خواص درمانی ریشه در حضور ترکیبات نظیر منتول (۱۸ تا ۳۵ درصد ترکیب اسانس)، منتون (۲۱ تا ۲۸ درصد)، پولگون (۸ تا ۱۸ درصد) و ۱،۸-سینئول (۶ تا ۱۱ درصد) دارند (۳).

* نویسنده مسئول؛ تلفن: ۰۹۱۴۲۲۵۶۳۴۶

آدرس پست الکترونیک: m.abiyari@cfu.ir

علیرغم اهمیت متابولیت‌های ثانویه پونه کوهی در صنعت دارو، محققان با چالش غلظت پایین آن‌ها در این گیاه دارویی مواجه هستند (۱). تاکنون، رویکردهای مختلفی به منظور افزایش غلظت متابولیت‌های ثانویه در گیاهان دارویی مورد توجه قرار گرفته است که از آن جمله می‌توان به مهندسی متابولیک، کاربرد الیسیتورها و غیره اشاره داشت (۴). به‌عنوان یک رویکرد کارآمد، کاربرد الیسیتورهای زیستی با منشای مخمر، باکتریایی و قارچی و الیسیتورهای غیرزیستی نظیر آنزیم‌های غیرفعال، اشعه ماورابنفش، نمک فلزات سنگین، پلی‌ساکاریدها، سالیسیلیک اسید، جاسمونیک اسید و هورمون‌ها (مثل ملاتونین) می‌تواند راه را برای افزایش تولید متابولیت‌های ثانویه در کشت سلولی گیاه فراهم کند (۵).

ملاتونین (ان-استیل-۵-متوکسی تریپتامین)، به‌عنوان یک هورمون ایندولآمین از تریپتوفان سنتز می‌شود و در جانوران، وظایف فیزیولوژیکی متعددی در تنظیم سیستم ایمنی بدن، خواب، سیستم آنتی‌اکسیدانسی، ریتم شبانه‌روزی و تولیدمثل را برعهده دارد (۶). در گیاهان، از نظر مسیر بیوسنتزی و وظایف فیزیولوژیکی، ملاتونین دارای وجه مشترکی با هورمون اکسین (IAA) است (۷). مکان سنتز ملاتونین در گیاهان کلروپلاست است و ضمناً غلظت ملاتونین سلول گیاهی در مقایسه با نوع جانوری بسیار بیشتر است (۶). آن‌چه ملاتونین را به‌عنوان یک ترکیب مهم در گیاهان شناخته است، وظایف متعددی است که این ترکیب در رشدونمو و دفاع علیه عوامل تنش‌زا ایفا می‌نماید (۸). تاکنون، تاثیر مثبت کاربرد ملاتونین در افزایش تحمل تنش‌هایی نظیر تنش اکسیداتیو (۹)، سمیت یونی (۱۰)، سمیت شیمیایی (۱۱)، شوری (۱۲-۱۴) و خشکی (۱۵-۱۷) گزارش شده است. علاوه بر نقش‌های بالا، یکی دیگر از وظایف کلیدی ملاتونین در رابطه با محافظت نوری و حفظ سطح فتوسنتز است (۱۷). در رابطه با کاربرد ملاتونین در کشت سلول به‌منظور افزایش سطح متابولیت‌های ثانویه چندین گزارش با نتایج رضایت‌بخش وجود دارد. برای مثال، Jafari و Shahsavari (۱۸) در کاوش اثر ملاتونین بر پروفایل متابولیتی پرتغال طی تنش خشکی دریافتند که غلظت ۱۰۰ میکرومولار ملاتونین باعث افزایش سطح ترکیبات مهم لیمون و هسپریدین شد. آن‌ها پیشنهاد کردند که این افزایش ریشه در مشابهت ساختاری و عملکردی ملاتونین با ایندول-۳-اسید استیک (IAA) دارد. در مطالعه‌ای دیگر، Ma و همکاران (۱۹) مشاهده کردند که تیمار ملاتونین، پروفایل متابولیت ثانویه انگور را با القای بیوسنتز اتیلن با واسطه فاکتور رونویسی MYB14 (Myb myeloblastosis viral oncogene homolog 14) تغییر می‌دهد. به‌عنوان یک ترکیب نمونه، آن‌ها پیشنهاد کردند که افزایش ناشی از ملاتونین در محتوای ترکیب رسوراترول و سطح بیان ژن *STS1* تا حد زیادی به اتیلن بستگی دارد، که نشان دهنده نقش میانجی‌گر اتیلن مابین ملاتونین و پروفایل متابولیتی است.

علیرغم گزارشات علمی پیرامون تاثیر ملاتونین بر پاسخ گیاهان به محرک‌های تنش‌زا و الیسیتورها، هنوز تحقیقی بر روی اثر این هورمون بر بیوسنتز متابولیت‌های ثانویه پونه کوهی صورت نگرفته است. بنابراین، این مطالعه با هدف تعیین تاثیر الیسیتور ملاتونین بر سلامت سلولی و غلظت متابولیت‌های ثانویه مهم پونه یعنی منتول، منتون، پولگون و ۱،۸-سینئول انجام شد.

۲- مواد و روش‌ها

تهیه ملاتونین: ملاتونین از شرکت دایا-اکسیر با وزن مولکولی ۲۳۲/۲۸ تهیه شد. نخست ملاتونین در اتانول حل و سپس با آب مقطر به حجم مورد نظر رسید تا غلظت‌های ۱۰۰ و ۲۰۰ میکرومولار تهیه شوند. غلظت‌های ملاتونین بر مبنای مطالعات گذشته انتخاب شدند (۱۹). در ادامه، ملاتونین در کشت سلولی پونه کوهی استفاده شد.

کشت سلولی و القای کالوس: جهت تولید کالوس از ریزنمونه ساقه، از محیط کشت موراشیگ و اسکوگ (MS) غنی‌شده با D-۲،۴ با غلظت ۱ میلی‌گرم بر لیتر استفاده شد. کالوس‌های ترد و سفید مناسب برای کشت سلولی، در شرایط کاملاً استریل به

۱۰۰ میلی لیتر محیط کشت مایع افزوده شدند (۲۰). پیک رشد سلولی بدین گونه تعیین شد که هر ۳ روز یک‌بار تا یک ماه نمونه‌برداری انجام شد و سپس مقدار وزن تر و خشک سلول‌ها سنجش شد. پس از حصول پیک رشد سلولی، ملاتونین با غلظت‌های ۱۰۰ و ۲۰۰ میکرومولار به محیط کشت افزوده شد. در ادامه، ارلن حاوی محیط کشت و ملاتونین روی شیکر انکوباتور با سرعت ۱۰۰ دور در دقیقه در دمای 25 ± 1 درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. هر دو هفته یکبار، بازکشت سلولی به محیط کشت مایع تازه حاوی همان غلظت الیسیتور صورت گرفت.

سنجش غلظت منتول، منتون، پولگون و ۱،۸-سینئول: جهت تعیین غلظت ترکیبات فعال در برگ، کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا HPLC انجام شد. جهت آماده‌سازی برای عصاره‌گیری، نخست نمونه‌ها در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و تاریکی خشک شده و سپس ۰/۵ گرم بافت خشک خردشده با ۲۵ میلی‌لیتر اتانول ۸۰ درصد ترکیب شد. بعد از فرایند استخراج به مدت ۲ ساعت بر روی شیکر، محلول به‌دست‌آمده با کاغذ صافی واتمن فیلتر شد. بعد از سانتریفیوژ با دور ۵۰۰ rpm به مدت ۵ دقیقه، محلول کاملاً شفاف توسط دستگاه تبخیرکننده چرخان خشک شد. از هر نمونه، محلول استوک (۱۰۰۰ پی‌پی‌ام) با حلال متانول تهیه شد که این محلول‌ها برای سنجش غلظت ترکیبات فعال به کار گرفته شدند. در ادامه، ۵۰ میکرولیتر از عصاره به دستگاه HPLC (مجهز به آشکارساز UV و ستون C18 با اندازه ذرات ۵ میکرومتر، قطر ۴ میلی‌متر و طول ۲۵۰ میلی‌متر) تزریق شد. سنجش منتول، منتون، پولگون و ۱،۸-سینئول به ترتیب در طول موج‌های ۴۹۸، ۳۶۵، ۲۶۵ و ۲۹۰ صورت گرفت. برای آنالیز کمی ترکیبات، بعد از تزریق محلول‌های استاندارد با غلظت‌های مشخص و حصول سطح زیر پیک برای هر کدام، منحنی کالیبراسیون هر ترکیب رسم شد و توسط معادله خطی منحنی کالیبراسیون، مقدار هر ترکیب در عصاره پونه کوهی برآورد شد (۲۰).

زنده‌مانی سلولی: از آزمون تترازولیوم جهت سنجش زنده‌مانی سلولی استفاده شد. در این آزمون، غلظت ۵ میلی‌گرم بر لیتر تترازولیوم به کار رفت. بعد از گذشت ۱۰ روز از کشت سلولی، ۰/۷۵ میلی‌لیتر از کشت سوسپانسیون با ۱/۵ میلی‌لیتر از محلول تترازولیوم مخلوط شده و به مدت یک شبانه‌روز روی شیکر قرار گرفت. در ادامه، چند قطره از محیط کشت مایع حاوی سلول‌های پونه کوهی روی لام قرار گرفت و با بزرگ‌نمایی ۷۵۰ در میکروسکوپ نوری ارزیابی شد. سلول‌های قرمز رنگ شمارش شدند و نسبت سلول‌های زنده به مرده تعیین شد.

۳- آنالیز آماری

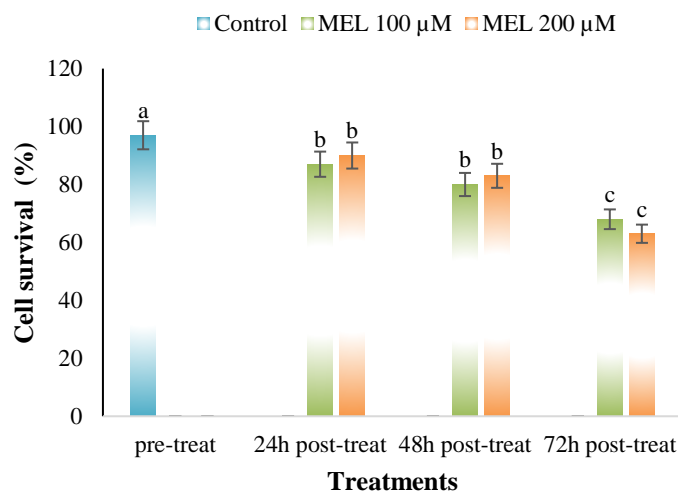
این مطالعه در قالب آزمایش فاکتوریل با طرح پایه کاملاً تصادفی با سه تکرار در آزمایشگاه انجام شد. ملاتونین (با غلظت‌های ۱۰۰ و ۲۰۰ میکرومولار) به محیط کشت MS حاوی D-۲،۴ با غلظت 1 mg.L^{-1} افزوده شد. بعد از ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت از تیمار، درصد زنده‌مانی سلولی و سطح ترکیبات مهم پونه به ترتیب توسط آزمون تترازولیوم و HPLC سنجش شدند. در نرم افزار SAS (نسخه ۹/۴)، از تجزیه واریانس (ANOVA) به منظور تجزیه و تحلیل داده‌ها و از روش LSD (حداقل تفاوت معنی‌دار) برای مقایسه میانگین استفاده شد. نمودارها نیز با استفاده از Office Excel ترسیم شدند.

۴- نتایج

زنده‌مانی سلولی

نتایج آزمون تترازولیوم و بررسی درصد زنده‌مانی سلول‌ها در محیط کشت سوسپانسیون پونه کوهی آشکار ساخت که تفاوت معنی‌داری در درصد زنده‌مانی سلول‌ها در غلظت‌های مختلف ملاتونین وجود دارد. درصد زنده‌مانی سلول‌ها با گذشت زمان کاهش

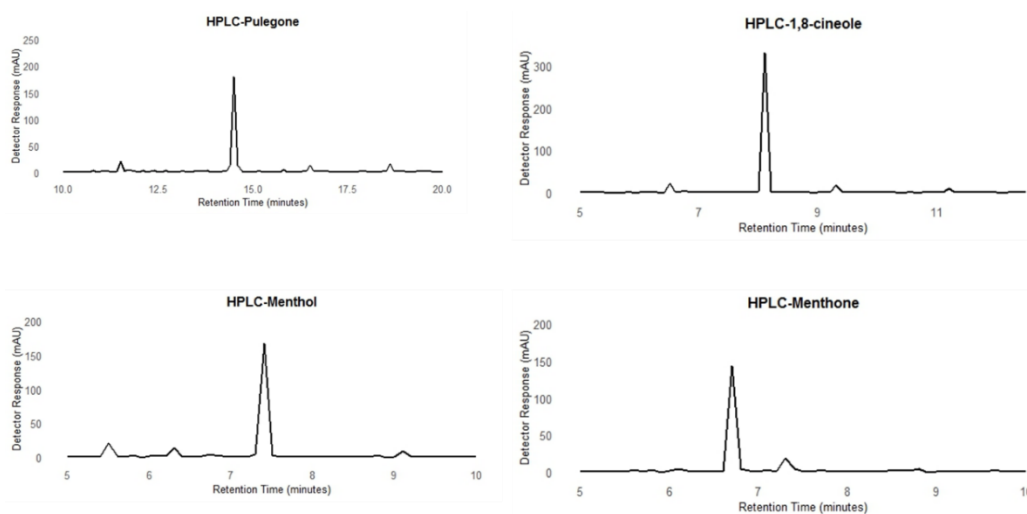
یافت به نحوی که کمترین درصد زنده‌مانی ۷۲ ساعت بعد از تیمار ملاتونین مشاهده شد (شکل ۱). از آن‌جای که هدف نهایی، افزایش تولید ترکیبات فعال بیولوژیکی است و نه بالاترین زنده‌مانی سلولی، لذا در گام بعدی به دنبال غلظتی از ملاتونین خواهیم بود که بتواند باعث بیشترین تولید متابولیت‌های ثانویه شود.



شکل ۱: درصد زنده‌مانی سلول‌ها در بازه‌های زمانی و غلظت‌های مختلف ملاتونین. حروف یکسان نشان‌دهنده عدم تفاوت معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد با آزمون LSD می‌باشد. اختصارات: pre-treat: قبل از اعمال تیمارها؛ 24h post-treat، ۲۴ ساعت بعد از اعمال تیمارها؛ 48h post-treat، ۴۸ ساعت بعد از اعمال تیمارها؛ 72h post-treat، ۷۲ ساعت بعد از اعمال تیمارها؛ Control بدون تیمار ملاتونین؛ MEL، تیمار ملاتونین ۱۰۰ و ۲۰۰ میکرومولار.

محتوای متابولیت‌های ثانویه در کشت سلولی پونه کوهی

نتایج ما گویای این موضوع بود که اثر تیمار ملاتونین بر غلظت منتول، منتون، پولگون و ۱،۸-سینئول معنی‌دار بود (جدول ۱). بنابراین، در گام بعدی به دنبال مقایسه میانگین و تعیین کارآمدترین تیمارها (از نظر غلظت و زمان) برای افزایش میزان منتول، منتون، پولگون و ۱،۸-سینئول در کشت سلولی پونه کوهی بودیم (شکل ۲).



شکل ۲: کروماتوگراف HPLC برای ترکیبات منتول، منتون، پولگون و ۱،۸-سینئول.

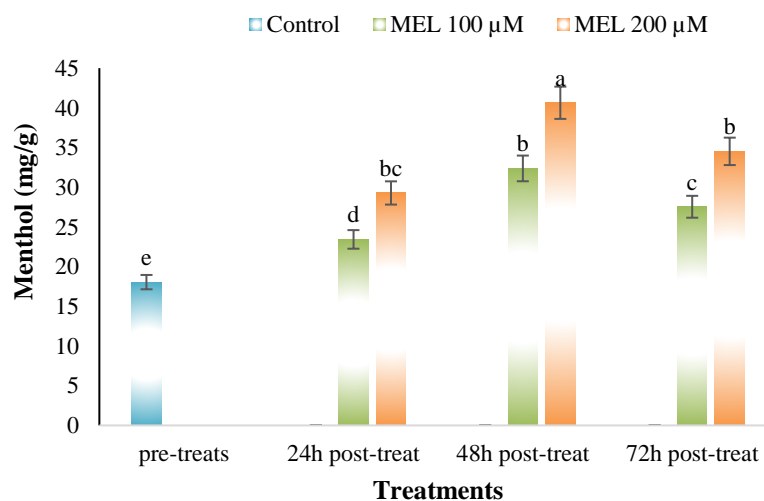
جدول ۱: تجزیه واریانس محتوای متابولیت‌های پونه کوهی تحت تیمار ملاتونین در زمان‌های متفاوت

میانگین مربعات Means of square				درجه آزادی df	منبع تغییرات Source of variation
۱،۸-سینئول 8-1, cineol	پولگون Pulegone	منتون Menthone	منتول Menthol		
924.42**	547.21**	1145.78**	953.43**	3	زمان Time
637.35**	362.98**	689.46**	789.18**	2	غلظت Concentration
364.21**	279.74**	396.47**	2896.45**	6	زمان × غلظت T*C
40.36	73.50	53.41	36.46	24	خطا Error
18.62	11.47	21.34	15.86	-	ضریب تغییرات

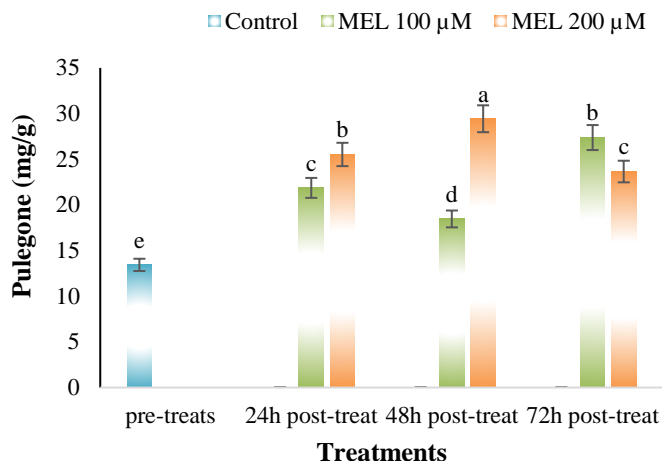
علامت * و ** به ترتیب گویای معنی‌داری در سطح ۱ و ۵ درصد است.

محتوای منتول

کاوش پاسخ پونه کوهی به غلظت‌های مختلف ملاتونین و ارزیابی غلظت متابولیت‌های مهم این گیاه در بازه‌های زمانی مختلف بعد از تیمار ملاتونین نشان داد که افزایش غلظت ملاتونین سبب افزایش معنی‌دار محتوای منتول می‌شود. با این حال، این افزایش منتول با گذشت زمان با کاهش همراه بود به طوری که میزان منتول تا ۴۸ ساعت بعد از تیمار افزایش یافت اما ۷۲ ساعت بعد از تیمار با کاهش همراه بود. ارزیابی سطح منتول ۴۸ ساعت بعد از تیمار ۲۰۰ میکرومولار ملاتونین (به‌عنوان موثرترین تیمار) گویای افزایش ۱/۲۵ برابری مقدار منتول در مقایسه با شاهد بود (شکل ۳).



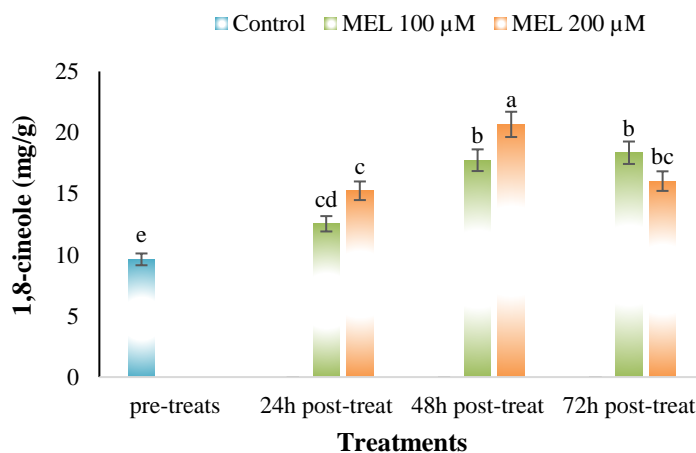
شکل ۳: محتوای منتول در کشت سلولی پونه کوهی در بازه‌های زمانی و غلظت‌های مختلف ملاتونین. حروف یکسان نشان‌دهنده عدم تفاوت معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد با آزمون LSD می‌باشد. اختصارات: pre-treat: قبل از اعمال تیمارها؛ 24h post-treat؛ 24 ساعت بعد از اعمال تیمارها؛ 48h post-treat؛ 48 ساعت بعد از اعمال تیمارها؛ 72h post-treat؛ 72 ساعت بعد از اعمال تیمارها.



شکل ۵: محتوای پولگون در کشت سلولی پونه کوهی در بازه‌های زمانی و غلظت‌های مختلف ملاتونین. حروف یکسان نشان‌دهنده عدم تفاوت معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد با آزمون LSD می‌باشد. اختصارات: pre-treat، قبل از اعمال تیمارها؛ 24h post-treat، ۲۴ ساعت بعد از اعمال تیمارها؛ 48h post-treat، ۴۸ ساعت بعد از اعمال تیمارها؛ 72h post-treat، ۷۲ ساعت بعد از اعمال تیمارها؛ Control بدون تیمار ملاتونین؛ MEL، تیمار ملاتونین ۱۰۰ و ۲۰۰ میکرومولار.

محتوای ۱،۸-سینئول (اکالیپتول)

برآورد میزان ۱،۸-سینئول در بازه‌های زمانی مختلف (۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت بعد از تیمار) ملاتونین به کمک تکنیک کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا گویای این مطلب بود که مقدار ۱،۸-سینئول در کشت سلولی پونه کوهی تحت تاثیر مثبت ملاتونین قرار گرفت به گونه‌ای که افزایش غلظت هورمون ملاتونین باعث افزایش ۱،۸-سینئول شد. با این حال، گذشت زمان سبب افت در این روند افزایشی شد به طوری که میزان ۱،۸-سینئول تا ۴۸ ساعت بعد از تیمار افزایش یافت اما ۷۲ ساعت بعد از اعمال تیمار ملاتونین کاهش یافت. اندازه‌گیری سطح ۱،۸-سینئول در بازه زمانی ۴۸ ساعت بعد از تیمار ۲۰۰ میکرومولار ملاتونین (به‌عنوان موثرترین تیمار) نشان از افزایش ۱/۲ برابری محتوای ۱،۸-سینئول در مقایسه با شاهد داشت (شکل ۶).



شکل ۶: محتوای ۱،۸-سینئول در کشت سلولی پونه کوهی در بازه‌های زمانی و غلظت‌های مختلف ملاتونین. حروف یکسان نشان‌دهنده عدم تفاوت معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد با آزمون LSD می‌باشد. اختصارات: pre-treat، قبل از اعمال تیمارها؛ 24h post-treat، ۲۴ ساعت بعد از اعمال تیمارها؛ 48h post-treat، ۴۸ ساعت بعد از اعمال تیمارها؛ 72h post-treat، ۷۲ ساعت بعد از اعمال تیمارها؛ Control بدون تیمار ملاتونین؛ MEL، تیمار ملاتونین ۱۰۰ و ۲۰۰ میکرومولار.

۵- بحث

با توجه به اهمیت غلظت متابولیت‌های ثانویه در گیاه دارویی پونه کوهی و همچنین پتانسیل اثرگذاری ملاتونین بر مسیرهای پیام‌رسانی و متابولیسمی گیاهان، این مطالعه با هدف تعیین تاثیر الیسیستور غیرزیستی ملاتونین بر سلامت سلولی و غلظت متابولیت‌های ثانویه مهم گیاه دارویی پونه کوهی یعنی منتول، منتون، پولگون و ۱،۸-سینئول انجام شد.

زنده‌مانی سلولی

تفاوت معنی‌داری در درصد زنده‌مانی سلول‌ها در غلظت‌های مختلف ملاتونین وجود نداشت. با این حال، درصد زنده‌مانی سلول‌ها با گذشت زمان کاهش یافت. به عبارتی دیگر، هر چه زمان بیشتری بعد از تیمار ملاتونین بگذرد، از درصد زنده‌مانی سلول‌های پونه کاسته خواهد شد که با ماهیت ترکیبات الیسیستوری سازگار است. این موضوع نشان می‌دهد که تا حد امکان بایستی زمان کوتاه‌تری مابین تیمار ملاتونین و برداشت متابولیت‌های ثانویه در پونه کوهی در نظر گرفته شود. در پژوهشی مشابه، Neamah و Jdayea دریافتند با افزایش غلظت ملاتونین از ۰/۵ به ۲ میلی‌گر بر لیتر، زنده‌مانی سلول‌های کشت سوسپانسیون *Hyoscyamus pusillus* دچار کاهش معنی‌داری می‌شوند (۲۱). افزایش غلظت ملاتونین در محیط کشت سلولی گیاهان ممکن است باعث کاهش زنده‌مانی سلول‌ها شود که این موضوع به چند عامل مرتبط است: ۱- اثر سمی در غلظت‌های بالا؛ اگرچه ملاتونین در غلظت‌های پایین به‌عنوان یک آنتی‌اکسیدانت عمل کرده و از سلول‌ها در برابر تنش اکسیداتیو محافظت می‌کند، اما در غلظت‌های بالا می‌تواند سبب تولید بیش از حد گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) شود. این پدیده به دلیل اختلال در تعادل سیستم آنتی‌اکسیدانتی سلولی است که آسیب اکسیداتیو، تخریب غشاهای و در نهایت مرگ سلولی را در پی خواهد داشت. ۲- اختلال در مسیرهای متابولیکی: ملاتونین ممکن است به مسیرهای هورمونی و متابولیکی گیاه وارد شود و در غلظت‌های بالا، عملکرد متعادل این مسیرها را مختل کند، که این مسئله بر رشد و بقای سلول تاثیر منفی می‌گذارد (۶).

محتوای متابولیت‌های ثانویه در کشت سلولی پونه کوهی

ترکیباتی نظیر منتول، منتون، پولگون و ۱،۸-سینئول در این مطالعه بررسی شدند. منتول یک مونوترپنوئید است که به‌صورت طبیعی در گیاهانی مانند پونه، نعنا و اکالیپتوس یافت می‌شود و کاربردهای فراوانی به‌عنوان طعم‌دهنده در تولید خمیر دندان، کرم دندان، شل‌کننده عضلانی، ضد درد، شربت سینه و غیره دارد (۲). منتون یک مونوترپن با طعم نعناع است که به‌طور طبیعی در تعدادی از اسانس‌ها گیاهی وجود دارد. از نظر ساختاری با منتول مرتبط است که به‌جای کربونیل یک الکل ثانویه دارد. این ترکیب در طعم‌دهنده‌ها، عطرها و لوازم آرایشی به‌دلیل بوی معطر و نعنائی خاص خود استفاده می‌شود (۳). پولگون یک کتون مونوترپن است که در برگ‌های چندین عضو از خانواده نعناع وجود دارد. این ترکیب بوی مطبوعی شبیه به پنی‌روئیل، نعناع فلفلی و کافور دارد؛ لذا از آن در طعم‌دهنده‌ها، عطرسازی و رایحه‌درمانی استفاده می‌شود (۱). ۱،۸-سینئول یک مونوترپن طبیعی است که به نام اکالیپتول نیز شناخته می‌شود. این ترکیب خاصیت باکتری‌کشی، بهبود دهنده کارکرد شش‌ها در بیماران مبتلا به آسم و درمان‌کننده بیماری‌های مزمن انسدادی ریه دارد (۱).

همان‌گونه که مشاهدات ما نشان داد، افزایش غلظت هورمون ملاتونین در کشت سلولی باعث افزایش مقدار منتول، منتون، پولگون و ۱،۸-سینئول شد. با این حال، با گذشت زمان، از مقدار این تاثیرگذاری مثبت کاسته شد. به‌عنوان یک دستاورد مهم، نتایج ما نشان داد که کاربرد ملاتونین در غلظت ۲۰۰ میکرومولار و برداشت متابولیت‌ها در ۴۸ ساعت بعد از تیمار می‌تواند ضمن حفظ زنده‌مانی سلول‌های پونه کوهی در محیط کشت، باعث افزایش ۱۲۵ درصدی منتول، ۱۳۰ درصدی منتون، ۱۴۰ درصدی پولگون و ۱۲۰ درصدی ۱،۸-سینئول شود. هم‌راستا با نتایج ما، Neamah و Jdayea (۲۱) نشان دادند که با افزایش غلظت ملاتونین از ۰/۵ به ۲ میلی‌گرم بر لیتر، مقدار ترکیبات فلانوئیدی و فنولیکی در کشت سوسپانسیون *H. pusillus* افزایش معنی‌داری یافتند. آن‌ها پیشنهاد کردند که ملاتونین با اثرگذاری بر آنزیم فنیل‌آلانین آمونیا لیاز (به‌عنوان کاتالیزور مهم سنتز ترکیبات فنولی) سبب افزایش متابولیت‌های ثانویه می‌شود. در مطالعه‌ای دیگر، Coskun و همکاران (۲۲) مدارک آزمایشی دال

بر این موضوع ارائه دادند که با افزایش غلظت ملاتونین از ۱۰۰ به ۲۰۰ میکرومولار، مقدار ترکیبات رزمارینیک اسید و کافئیک اسید در کشت سوسپانسیون *Rosmarinus officinalis* افزایش معنی‌داری یافتند. آن‌ها نیز پیشنهاد کردند که ملاتونین با اثرگذاری بر آنزیم فنیل‌آلانین آمونیا لیاز سبب افزایش ترکیبات فنولیک نظیر رزمارینیک اسید و کافئیک اسید می‌شود.

تأثیر مثبت ملاتونین بر غلظت متابولیت‌های منتول، منتون، پولگون و ۱،۸-سینئول، گویای تأثیرپذیری نقاط مختلف دستگاه بیان، تنظیم و متابولیسم سلولی پونه کوهی از ملاتونین است. برای مثال، گزارشات علمی حاکی از این موضوع است که تیمار ملاتونین منجر به توسعه سیستم ریشه‌ای (جهت تامین آب و مواد مغذی جهت رشد و نمو) و افزایش ظرفیت فتوسنتزی (جهت تولید ترکیبات اولیه و ثانویه) می‌شود (۲۳). تیمار ملاتونین همچنین با افزایش سطح بیان و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانتی، توانایی گیاه جهت مقابله با تنش اکسیداتیو را بهبود می‌بخشد (۲۲). علاوه بر این، تیمار ملاتونین سبب افزایش پایداری کلروپلاست و جلوگیری از تجزیه کلروفیل (به‌عنوان عضو کلیدی دستگاه فتوسنتز) می‌شود (۲۱). در راستای مطالب فوق، Azizi و همکاران (۲۴) نشان دادند که با تیمار ملاتونین، محتوای پروتئین‌های محلول، قندهای محلول، رنگیزه‌های فتوسنتزی و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت افزایش درحالی‌که غلظت H_2O_2 و مالون‌دی‌آلدهید (به‌عنوان معیارهای تنش اکسیداتیو) کاهش یافتند. بنابراین، نویسندگان پیشنهاد کردند که ملاتونین از توانایی تعدیل متابولیسم اولیه و ثانویه جهت سازگاری با عوامل تنش‌زا (الیسیتورهای) مختلف برخوردار است.

تا به این لحظه، عملکرد ملاتونین در تولید اسانس و متابولیت‌های ثانویه در گیاهان دارویی به‌خوبی مورد مطالعه قرار نگرفته است. با این حال، شباهت بین ملاتونین و ایندول-۳-اسید استیک (IAA) در ساختار شیمیایی (هر دو مشتق شده از کوريسمات) و عملکرد زیستی (تقویت بیوسنتز اسانس) را می‌توان به‌عنوان یکی از مکانیسم‌های ممکن پیشنهاد کرد (۲۳ و ۲۵). همچنین، Silva و همکاران (۲۶) نشان دادند که افزایش تولید اسانس مریم گلی در پاسخ به کاربرد ملاتونین ممکن است به‌دلیل بهبود بالقوه سلول‌های مریستمی و محل بیوسنتز چندین جزء شیمیایی باشد که برای تولید اسانس بسیار مهم هستند. نویسندگان دیگر به نقش ملاتونین به‌عنوان پیام‌رسان، تثبیت‌کننده غشا و تقویت‌کننده فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت نیز اشاره دارند (۲۷).

۶- نتیجه‌گیری

افزایش غلظت الیسیتور ملاتونین سبب کاهش درصد زنده‌مانی سلولی و افزایش غلظت متابولیت‌های ثانویه پونه کوهی نسبت به شاهد شد. با عنایت به این که هدف مطالعه اخیر، حصول بیشترین محتوای متابولیت‌های ثانویه است و نه درصد زنده‌مانی، لذا استفاده از غلظت ۲۰۰ میکرومولار ملاتونین و برداشت متابولیت‌ها در ۴۸ ساعت بعد از تیمار باعث حصول بیشترین زنده‌مانی و محتوای متابولیت‌های ثانویه می‌شود، به‌طوری‌که سطح منتول، منتون، پولگون و ۱،۸-سینئول را به‌ترتیب تا ۱۲۵، ۱۳۰، ۱۴۰ و ۱۲۰ درصد در کشت سلولی پونه کوهی افزایش می‌دهد. پیشنهاد می‌شود که غلظت‌های بالاتر از نظر تأثیرگذاری و سمیت نیز مورد بررسی قرار گیرند.

۷- منابع

1. Farzaei H, Roodabeh B, Ali G. Pharmacological activity of *Mentha longifolia* and its phytoconstituents. *Journal of Traditional Chinese Medicine*. 2017; 37(5): 710-720.
2. Mimica-Dukic N, Bozin B. *Mentha L.* species (Lamiaceae) as promising sources of bioactive secondary metabolites. *Current Pharmaceutical Design*. 2008; 14(29): 3141-50.
3. Mikaili P, Mojaverrostami S, Moloudizargari M, et al. Pharmacological and therapeutic effects of *Mentha longifolia* L. and its main constituent menthol. *Ancient Science of Life*. 2013; 33(2): 131-8.

4. Silpa P, Roopa K, Dennis Thomas T. Production of plant secondary metabolites: current status and future prospects, *Biotechnological Approaches for Medicinal and Aromatic Plants*, Springer, Singapore. 2018.
5. Hidalgo D, Sanchez R, Lalaleo L, Bonfill M, Corchete P, Palazon J. Biotechnological production of pharmaceuticals and biopharmaceuticals in plant cell and organ cultures. *Current Medicinal Chemistry*. 2018; 25:3577–3596.
6. Sharif R, Xie C, Zhang H, et al. Melatonin and its effects on plant systems. *Molecules*. 2018;23: 2352.
7. Wang Y, Reiter RJ, Chan Z. Phyto-melatonin: a universal abiotic stress regulator. *Journal of Experimental Botany*. 2018;69: 963–974.
8. Arnao M B, Hernandez-Ruiz J. Melatonin and its relationship to plant hormones. *Annals of Botany*. 2017; 121:195–207.
9. Li H, He J, Yang X, et al. Glutathione-dependent induction of local and systemic defense against oxidative stress by exogenous melatonin in cucumber (*Cucumis sativus* L.). *Journal of Pineal Research*. 2016; 60:206–216.
10. Yadu B, Chandrakar V, Meena RK, et al. Spermidine and melatonin attenuate fluoride toxicity by regulating gene expression of antioxidants in *Cajanus cajan* L. *Journal of Plant Growth Regulation*. 2018; 37:1113–1126.
11. Park S, Lee DE, Jang H, et al. Melatonin-rich transgenic rice plants exhibit resistance to herbicide-induced oxidative stress. *Journal of Pineal Research*. 2012; 54(3):258-63.
12. Zhang H, Zhang N, Yang R, et al. Melatonin promotes seed germination under high salinity by regulating antioxidant systems, ABA and GA4 interaction in cucumber (*Cucumis sativus* L.). *Journal of Pineal Research*. 2014;57: 269–279.
13. Jiang X, Li H, Song X. Seed priming with melatonin effects on seed germination and seedling growth in maize under salinity stress. *Pakistan Journal of Botany*. 2016; 48(4): 1345-1352.
14. Zeng L, Cai J, Li J, et al. Exogenous application of a low concentration of melatonin enhances salt tolerance in rapeseed (*Brassica napus* L.) seedlings. *Journal of Integrative Agriculture*. 2018; 17(2):328–335.
15. Cui G, Zhao X, Liu S, et al. Beneficial effects of melatonin in overcoming drought stress in wheat seedlings. *PPB*. 2017; 118: 138-149.
16. Li J, Zeng L, Cheng Y, et al. Exogenous melatonin alleviates damage from drought stress in *Brassica napus* L. (rapeseed) seedlings. *Acta Physiologiae Plantarum*. 2018; 40: 43.
17. Ye J, Wang S, Deng X, et al. Melatonin increased maize (*Zea mays* L.) seedling drought tolerance by alleviating drought-induced photosynthetic inhibition and oxidative damage. *Acta Physiologiae Plantarum*. 2016;38:48.
18. Jafari M, Shahsavari A. The effect of foliar application of melatonin on changes in secondary metabolite contents in two *Citrus* species under drought stress conditions. *Frontiers in Plant Science*. 2021; 12:692735.
19. Ma W, Xu L, Gao S, et al. Melatonin alters the secondary metabolite profile of grape berry skin by promoting *VvMYB14*-mediated ethylene biosynthesis. *Horticulture Research*. 2021; 8: 43-52.
20. Bertoli A, Leonardi M, Krzyzanowska J, et al. *Mentha longifolia* in vitro cultures as safe source of flavouring ingredients. *Acta Biochimica Polonica*. 2011; 58(4): 581-7.

21. Neamah SI, Jdayea NA. Positive Response of *Hyoscyamus pusillus* Callus Cultures to Exogenous Melatonin on Biochemical Traits and Secondary Metabolites under Drought Conditions. IJAAR. 2022; 7447024.
22. Coskun Y, Duran RE, Kilic S. Striking effects of melatonin on secondary metabolites produced by callus culture of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.). PCTOC. 2019; 138:89–95.
23. Wang Q, An B, Wei Y, et al. Melatonin regulates root meristem by repressing auxin synthesis and polar auxin transport in *Arabidopsis*. Frontiers in Plant Science. 2016; 7:1882.
24. Azizi F, Amiri H, Ismaili A. Effect of Melatonin on Some Morpho-physiological Characteristics of *Phaseolus Vulgaris* Cv. Sadri under Salinity Stress. Journal of Plant Research. 2019; 32(3): 00-00.
25. Hazzoumi Z, Moustakime Y, Amrani Joutei K. Effect of gibberellic acid (GA), indole acetic acid (IAA) and benzylaminopurine (BAP) on the synthesis of essential oils and the isomerization of methyl chavicol and trans-anethole in *Ocimum gratissimum* L. SpringerPlus. 2014; 3: 321.
26. Silva SD, Sato A, Lage CLS, et al. Essential oil composition of *Melissa officinalis* L. in vitro produced under the influence of growth regulators. Journal of the Brazilian Chemical Society. 2005;16:1387–1390.
27. Nazir M, Ullah MA, Mumtaz S, et al. Interactive effect of melatonin and UV-C on phenylpropanoid metabolite production and antioxidant potential in callus cultures of purple basil (*Ocimum basilicum* L. Var purpurascens). Molecules. 2020; 25: 1072.