فصلنامه (علمی – پژوهشی)

زیست شناسی تکوینی

سال چهاردهم، شماره ۲، بهار ۱۴۰۱ ص. ۶۵-۵۵

مقاله پژوهشی

بررسی تأثیرسالیسیلیک اسید بر میزان متابولیت‌های ثانویه ریشه‌های نابجا و کالوس گیاه سرخارگل (*Echinacea purpurea* L.)

عباس علی دهپور جویباری[۱*]، سید حسین هاشمیان احمدی[۲]، علی پاکدین پاریزی[۳]، وحید عبدوسی[۴]، باقر سیدعلیپور[۵]

[۱] گروه علوم باغبانی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

[۲۰] استادیار، گروه زیست شناسی، واحد قائمشهر، دانشگاه آزاد اسلامی، قائمشهر، ایران

[۳] استادیار، پژوهشکده ژنتیک و زیست فناوری کشاورزی طبرستان، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ساری، ایران.

[۴] استادیار، گروه علوم باغبانی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

[۵] استادیار، گروه زیست شناسی، دانشگاه مازندران، بابلسر، ایران

[*] (نویسنده مسئول مکاتبات): dehpour@gmail.com

تاریخ دریافت: دی ۱۴۰۰ تاریخ پذیرش: اسفند ۱۴۰۰

چکیده

در این تحقیق به بررسی تاثیر سالیسیلیک اسید در محیط کشت بافت بر میزان متابولیت‌های ثانویه کالوس و ریشه‌های نابجای گیاه سرخارگل (*Echinacea purpurea* L) پرداخته شد. لپه جهت تشکیل کالوس در غالب آزمایش فاکتوریل با هورمون بنزیل آدنین (۰/۵ و ۱ میلی‌گرم بر لیتر) و توفوردی و نفتالین استیک اسید (۰/۵ و ۱ میلی‌گرم بر لیتر) کشت شدند. جهت تهیه ریشه نابجا نیز لپه در محیط حاوی نفتالین استیک اسید و ایندول بوتیریک اسید (۰، ۰/۲، ۱، ۱/۵ و ۲ میلی‌گرم بر لیتر) بر پایه طرح کاملا تصادفی کشت شدند. تیمارهای اسیدسالیسیلیک در غلظت‌های ۰، ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم بر لیتر در محیط کشت MS مایع اعمال شد و سپس ترکیباتی شامل میزان کلروفیل کل، فنل، فلاونوئید، فعالیت آنتی اکسیدانی، اسیدکافئیک و اسیدگالیک اندازه‌گیری شد. بهترین تیمار از نظر تولید کالوس محیط کشت MS حاوی نیم میلی‌گرم بر لیتر هورمون بنزیل آدنین و یک میلی‌گرم بر لیتر هورمون توفوردی و همچنین بهترین تیمار جهت تولید ریشه‌های نابجا از محیط کشت ۱/۲MS حاوی نیم میلی‌گرم بر لیتر هورمون ایندول بوتیریک اسید بدست آمد. بیشترین میزان فعالیت آنتی اکسیدانی بترتیب در تیمار ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم بر لیتر اسیدسالیسیلیک در کالوس و ریشه‌های نابجای مشاهده شد. بیشترین مقدار اسیدگالیک با ۲/۱۱ میلی‌گرم در گرم وزن تر در ریزنمونه ریشه در غلظت100 میلی‌گرم بر لیتر اسیدسالیسیلیک در روز سوم نمونه برداری ثبت شد. بالاترین مقدار اسیدکافئیک با ۲/۵۸ میلی‌گرم بر گرم وزن تر در ریزنمونه ریشه در غلظت ۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر اسید سالیسیلیک در روز پنجم نمونه‌برداری مشاهده شد.

کلیدواژه‌ها: سرخارگل، ریشه نابجا، اسید سالیسیلیک، متابولیت ثانویه.

مقدمه

سرخارگل (*Echinacea purpurea* L.) از جمله گیاهان دارویی مهمی است که کاربرد وسیعی در صنایع دارویی، غذایی، آرایشی و بهداشتی دارد. این گیاه با وجود اینکه بومی ایران نمی‌باشد اما در سال‌های اخیر وارد گیاهان بومی ایران شده است. این گیاه علفی، چندساله و متعلق به خانواده میناسانان (گل ستاره‌ای) است. تمام پیکر این گیاه اعم از ریشه و پیکر رویشی حاوی مواد موثره ارزشمندی از قبیل ترکیبات آلکیل آمیدی، ۲- متیل بوتیل آمید، مواد فنلی به‌ویژه شامل مشتقات کافئیک اسید و فلاونوئیدهایی مانند کوئرسیتین و کامفرول [۱]، ترکیبات پلی‌ساکاریدی مانند اکیناسئین، اکیناکوزید، اکینولون و همچنین اسانس است. مواد موثره این گیاه فعالیت آنتی‌اکسیدانی با ظرفیت خنثی‌سازی رادیکال‌ها آزاد را دارا می‌باشد که به اجزاء پلی فنلی آن نسبت داده می‌شود [۲].

سلول‌های گیاهی از نظر بیوسنتزی خاصیت توتی‌پوتنسی دارند، بدین معنی که هر سلول تحت کشت، تمام اطلاعات ژنتیکی گیاه والد را دارا است و بدین جهت این توانایی را دارد تا دامنه‌ای از مواد شیمیایی را که در گیاه والدینی یافت می‌شود را تولید نماید. ریشه‌های نابجا در پاسخ به سیگنال‌های محیطی مانند آسیب‌های مکانیکی، تنش‌های زنده یا در پاسخ به هورمون‌ها در کشت بافت توسعه می‌یابند. به‌علاوه تنظیم مولکولی و هورمونی باعث القا و رشد این ریشه‌ها می‌شوند، اکسین مهمترین هورمون تقویت‌کننده رشد برای تشکیل ریشه‌های نابجا است [۳]. پژوهش‌های متعددی در زمینه کاربرد تنظیم‌کننده‌های رشد در محیط کشت بافت برای ریشه‌زایی گونه‌های سرخارگل انجام شده است. برای مثال: برای القای ریشه‌های نابجا از سه هورمون اکسین شامل IAA و IBA و NAA در محیط‌کشت MS بر روی ریزنمونه‌های گیاه *Echinacea purpurea* L. استفاده شد، نتایج نشان داد هر دو IAA و IBA برای القای تشکیل ریشه موثر بودند [۴]. ترکیب مقادیر بالای NAA (۲/۶۹ میکرومولار) و مقدار کم BAP (۰/۴۴ میکرومولار) باعث القای شاخه‌ها و برخی ریشه‌های نابجا از ریزنمونه‌های برگ سرخارگل در محیط MS شد. القای ریشه‌های نابجا در گیاه *Echinacea angustifolia* L روی محیط MS ۱/۲ حاوی غلظت‌های مختلف اکسین‌های IAA، IBA و NAA در غلظت‌های مختلف نشان داد که ۲ میلی‌گرم در لیتر IBA بهترین اکسین از نظر تکثیر ریشه‌های نابجا و وزن تر و خشک و محتوای فنل و فلاونوئید بود [۱]. جنین‌های سوماتیکی *Echinacea purpurea* L استفاده منظور ریشه‌زایی روی محیط حاوی اکسین‌های NAA، IAA و IBA کشت شدند. محیط بهینه برای ریشه‌زایی اکسین NAA با ۷۳ درصد ریشه‌زایی بود [۵].

امروزه گزارش‌های مختلفی از تولید ترکیبات فعال گیاهی در کشت سوسپانسیون سلولی و در مقیاس وسیع در دسترس است. متابولیت‌های ثانویه در گیاه عمدتاً طی یک فرایند نموی در بافت با یک جریان هدایت شده ژنتیکی و متأثر از شرایط محیطی ایجاد می‌گردد و همچنین در کشت سوسپانسیون سلولی بعضی از گونه‌های گیاهی ژن‌های مسئول در مسیرهای بیوسنتزی دست نخورده باقی مانده و فقط در زمان تمایز و سازمان یافتگی سلول فعال می‌شوند [۶]. با استفاده از محرک‌های زیستی چون میسیلیوم‌های اتوکلاو شده، قارچ‌های پاتوژن و عصاره‌های پروتئینی مختلف و محرک‌های غیر زیستی مانند دما و تغییرات اسیدیته و انواع تنش‌های محیطی باعث تحریک مسیرهای متابولیکی سلولهای کشت شده و افزایش قابل توجه متابولیت‌های ثانویه شد [۷]. همچنین از برخی مواد شیمیایی مانند اسید سالیسیلیک را می‌توان به عنوان محرک استفاده نمود. محرک‌ها می‌توانند سیستم‌های متابولیکی مختلفی را در گیاه درگیر کرده و باعث القاء فعالیت آنزیم‌های ویژه و بروز تغییرات بیوشیمیایی وسیعی در سلول‌های تحریک شده گردد. محرک‌ها از طریق گیرنده‌های موجود در غشای پلاسمایی دریافت می‌شوند و از طریق سیستم سیگنالینگ نسخه‌برداری و ترجمه (بیان ژن‌ها) دخیل در بیوسنتز، متابولیت‌ها را تحت تأثیر قرار می‌دهند [۶]. سالیسیلیک اسید از الیسیتورهای طبیعی بی‌خطری هستند که به عنوان ترکیبات محرک تولید متابولیت‌های ثانویه از طریق القاء تنش کاذب عمل می‌نمایند [۸]. سالیسیلیک اسید از ترکیبات فنلی موجود در گیاهان بوده که رشد و نمو، میزان تنفس، فتوسنتز، جذب و انتقال یون‌ها را تحت تاثیر قرارداده و تغییراتی را در آناتومی برگ و ساختار کلروفیل کل ایجاد می‌کند [۹]. تأثیر افزایشی اسید سالیسیلیک در تولید تروپان الکالوئیدهای آسکوپولامین و هیوسیامین در کشت ریشه موئین گیاه شیپور

فرشته، تجمع ایندول الکالوئیدها در کشت کالوس‌های گیاه پروانش تیمار شده با اسید سالیسیلیک و یا اثر القایی اسید سالیسیلیک و متیل‌جاسمونات بر ترکیبات آنتراکینون درکشت کالوس گیاه روناس گزارش شده است [۷].

از آنجا که مطالعه کمی روی تأثیراسید سالیسیلیک بر میزان متابولیت‌های ثانویه گیاه دارویی سرخارگل انجام شده است، در این تحقیق به بررسی تأثیراسید سالیسیلیک در شرایط درون شیشه بر رشد و میزان متابولیت‌های ثانویه ریشه جانبی گیاه سرخارگل پرداخته خواهد شد.

مواد و روش‌ها

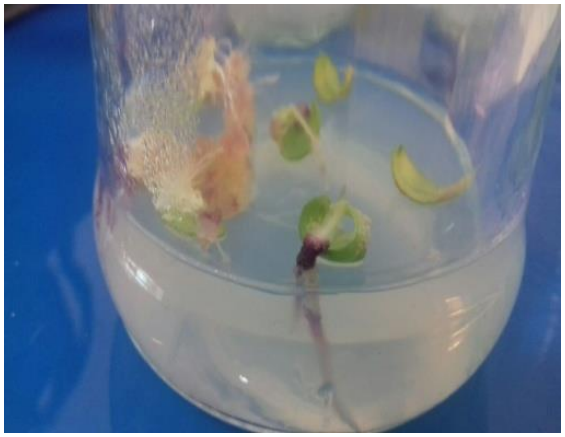
تهیه محیط کشت و گیاهچه استریل

بذر گیاه دارویی سرخارگل از طریق سایت پاکان بذر اصفهان تهیه گردید. جهت تهیه ریزنمونه‌های استریل برای کشت ریشه‌های نابجا ابتدا بذر را با الکل ۷۰% به مدت ۱ دقیقه و پس از شستشو با آب مقطر استریل با استفاده از محلول هیپوکلریدسدیم ۱/۵ درصد به مدت ۲۰ دقیقه ضدعفونی شدند. در پایان برای حذف مواد شیمیایی چند مرتبه با آب مقطر استریل شستشو شدند. محیط کشت در دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد و فشار ۱ اتمسفر به مدت ۲۰ دقیقه استریل شدند. بذور ضدعفونی شده در محیط‌کشت MS ۱/۲ (Murashige and Skoog) با ۳ درصد ساکارز منتقل شدند. از بذر گیاه رشد کرده نمونه‌های گیاه سرخارگل تهیه و برای به دست آوردن ریزنمونه‌های از آنها استفاده شد (شکل ۱). شیشه‌های حاوی بذرهای کشت شده در اتاق رشد با شرایط دمای ۲±۲۵ درجه‌ی سانتی‌گراد و شرایط نوری ۱۶ ساعت تاریکی و ۸ ساعت روشنایی نگهداری شدند. پس از ۳ هفته، گیاهچه آماده برای تهیه ریزنمونه جهت ریشه‌های نابجا شدند. برای تهیه ریزنمونه در شرایط استریل از گیاهچه‌های مورد نظر ریزنمونه لپه، برگ و دمبرگ تهیه شد.

تولید ریشه از لپه

برای تهیه ریزنمونه در شرایط استریل از گیاهچه‌های مورد نظر ریزنمونه لپه تهیه شد، سپس ریزنمونه‌ها در محیط کشت MS ۱/۲ جامد حاوی اکسین‌های ایندول‌بوتریک اسید (IBA) و نفتالین‌استیک اسید (NAA) با غلظت‌های مختلف ۰، ۰/۲، ۱، ۱/۵ و ۲ میلی‌گرم بر لیتر کشت شدند. شیشه‌های کشت در شرایط دمایی ۲۵ درجه سانتی‌گراد و تاریکی نگهداری شدند. پس از ۴ هفته صفات روز تا تولید ریشه، تعداد ریشه، طول ریشه و درصد ریشه‌زایی اندازه‌گیری شدند. ریشه‌های نابجا به دست آمده از محیط‌کشت MS ۱/۲ حاوی تیمارهای هورمونی ایندول بوتریک اسید و NAA به محیط کشت MS مایع منتقل شدند.

شکل ۱- کشت بذر و تشکیل گیاهچه استریل سرخارگل.



شکل ۴-۴- تشکیل ریشه از لپه سرخارگل.

تهیه کالوس از ریز نمونه لپه

پس از جوانه‌زنی، ریز نمونه لپه در محیط MS کشت شده و تیمارهای هورمونی BA (۰/۵ و ۱ میلی‌گرم بر لیتر)، 2, 4, D (۰/۵ و ۱ میلی‌گرم بر لیتر) و NAA (۰/۵ و ۱ میلی‌گرم بر لیتر) اعمال گردید و نمونه‌ها در تاریکی کامل قرار گرفتند. در انتهای این مرحله بهترین تیمار بر اساس ارزیابی صفاتی نظیر درصد کالوس‌زایی، وزن کالوس و خصوصیات ظاهری کالوس انتخاب شد. پس از آن به منظور افزایش میزان کالوس‌ها، به محیط مایع

انتقال شده تا پس از گذشت مدت زمان سی روز بر مقدار کالوس‌ها افزوده شود.

شکل ۴-۱- تشکیل کالوس از لپه سرخارگل.

اعمال تیمار سالیسیلیک اسید

ریشه‌ها و کالوس‌های حاصل از بهترین تیمار در محیط مایع کشت شده و تیمار اسید سالیسیلیک در غلظت‌های ۰، ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم بر لیتر به محیط کشت افزوده شد. محیط مایع حاوی ریشه‌های نابجا و کالوس روی شیکر با ۱۱۰ دور در دقیقه در شرایط دمایی ۲۵±۲ درجه سانتی‌گراد و تاریکی قرار داده شدند و در مدت زمان ۳ و ۵ روز بعد از اعمال تیمار سالیسیلیک اسید اندازه گیری صفات کلروفیل کل، کاراتنوئیدها، فنل کل و فلاونوئید کل، آنتی‌اکسیدان، کافئیک اسید و گالیک اسید بررسی شدند.

اندازه‌گیری وزن، طول، تعداد و درصد ریشه

ریشه‌های به دست آمده از محیط هورمونی پس از ۲۸ روز از کشت از محیط خارج شدند، با استفاده از ترازوی دیجیتالی ۰/۰۰۱ وزن شدند، طول ریشه بر حسب سانتی متر اندازه گیری شد. تعداد ریزنمونه‌هایی که در محیط هورمون‌دار ریشه‌دار شدند، شمارش و میانگین آن‌ها در هر تکرار به‌صورت درصد بیان شد.

اندازه‌گیری رنگدانه‌های فتوسنتزی

تعیین میزان کلروفیل کل و کاراتنوئیدها بر اساس روش پیشنهادی بارنس (۱۹۹۲)، به منظور استخراج کلروفیل کل و کاراتنوئیدها ابتدا ۰/۵ گرم کالوس تر از هر تکرار در لوله‌های آزمایش توزین گردید، و با ۱۰ میلی‌لیتر دی متیل سولفوکسید (DMSO) مخلوط شد. به مدت سه ساعت در آون ۷۵ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت؛ سپس از نمونه حاصل ۱ میکرولیتر برداشته و مجدد چهار میلی‌لیتر DMSO به آن اضافه شد. نمونه‌ها به وسیله دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج‌های ۶۴۵، ۶۶۳، ۴۸۰، و ۵۱۰ نانومتر جهت اندازه‌گیری میزان کلروفیل کل و کاراتنوئیدها قرائت شد [۱۰].

تعیین محتوای فنل

جهت اندازه گیری فنل کل از روش فولین سیوکالتیو استفاده شد [۱۱]. بدین منظور ۲۰ میکرولیتر از عصاره متانولی با ۱۰۰ میکرولیتر فولین سیوکالتیو و ۱/۱۶ میلی‌لیتر آب مقطر مخلوط و پس از ۵ الی ۸ دقیقه استراحت ۳۰۰ میکرولیتر کربنات سدیم یک مولار به آن افزوده شد. محلول فوق به مدت ۳۰ دقیقه در تاریکی و حمام بخار ۴۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. در نهایت با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتری نمونه‌ها در طول موج ۷۶۵ نانومتر قرائت شدند. با استفاده از منحنی کالیبراسیون اسید گالیک و معادله‌ی به دست آمده میزان فنول کل بر حسب میلی‌گرم گالیک‌اسید در یک گرم عصاره تر کالوس محاسبه گردید.

تعیین محتوای فلاونوئید کل

برای محاسبه محتوای فلاونوئیدی از روش آلومینیوم کلراید استفاده شد [۱۲]. بدین جهت ابتدا ۰/۵ میلی‌لیتر از عصاره متانولی تهیه شده با ۱/۵ میلی‌لیتر متانول، ۰/۱ میلی‌لیتر آلومینیوم کلراید ۱۰% در اتانول، ۰/۱ میلی‌لیتر استات پتاسیم یک مولار و ۲/۸ میلی‌لیتر آب مقطر مخلوط شد. در نمونه شاهد به جای عصاره متانولی، از متانول خالص استفاده شد. سپس محلول نیم ساعت در تاریکی قرار داده شد و سپس بلافاصله در طول موج ۴۱۵ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتری قرائت گردید.

اندازه گیری میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی

برای محاسبه آنتی‌اکسیدانی،یک میلی‌لیتر از عصاره متانولی نمونه به همراه یک میلی‌لیتر معرف دی‌پی‌پی‌اچ ۰/۱ میلی‌مولار به لوله

آزمایش ۲۰ میلی‌لیتری اضافه شد. برای نمونه شاهد به جای عصاره متانولی از متانول ۸۰ درصد استفاد شد. سپس لوله‌های آزمایش حاوی محلول به مدت ۳۰ دقیقه در شرایط تاریک نگهداری شد. پس از طی مدت زمان لازم، توسط دستگاه اسپکترفتومتر در طول موج ۵۱۷ نانومتر میزان جذب اندازه‌گیری شد [۱۳].

اندازه‌گیری کافئیک اسید و گالیک اسید در دستگاه HPLC

جهت اندازه‌گیری صفات مورد نظر عصاره‌گیری با استفاده از متانول ۸۰ به نسبت یک گرم از نمونه در ۱۰ سی سی متانول ۸۰ درصد برای مدت ۲۴ ساعت غوطه ور شد. سپس به مدت ۲۰ دقیقه در حمام التراسونیک (Ultrasonic cleaner) با بسامد ۴۰ کیلوهرتز قرار گرفته و پس از آن بمدت دو ساعت شیک شدند. درنهایت نمونه‌ها در دور ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه بمدت ۱۰ دقیقه سانتریوفیوژ شده و فاز رویی جهت اندازه گیری صفات کافئیک اسید و گالیک اسید مورد استفاده قرار گرفت. درنهایت تعیین مقدار کافئیک اسید و گالیک اسید بر اساس روش هو و کیتس (۲۰۰۰) و با استفاده از دستگاه HPLC مدل KANUER انجام شد [۱۴]. ستون مورد استفاده جهت اندازه گیری دو ترکیب مورد نظر ستون C18 بوده و فاز متحرک نیز شامل دو حلال که حلال اول آب و اسید استیک به نسبت ۰/۵ سی سی اسید استیک در ۲۰۰ سی سی آب دیونیزه و حلال دوم شامل استونیتریل بود. سرعت تزریق فاز متحرک ۰/۸ سی سی در دقیقه و دمای ستون ۳۸ درجه سانتی گراد و فشار ستون ۱۳۰–۱۴۰ مگاپاسکال بود.

تجزیه و تحلیل داده‌ها

این آزمایش به‌صورت آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملا تصادفی در سه تکرار انجام شد. داده‌ها، از طریق نرم افزارآماری SAS مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند و مقایسه میانگین داده‌ها از طریق روش دانکن در سطح پنج درصد انجام گرفت. رسم نمودارها ازطریق نرم افزار اکسل انجام شد.

نتایج و بحث

کالوس‌زایی سرخارگل

نتایج تجزیه واریانس نشان داد که تأثیر سطوح مختلف بنزیل آدنین بر کالوس زایی و وزن تر کالوس معنی داری نبود. این در حالی است که بین سطوح نفتالین استیک اسید و توفوردی در سطح احتمال یک درصد اختلاف معنی دار از نظر صفات مورد بررسی وجود داشت. اثر متقابل اکسین بر بنزیل آدنین بر درصد کالوس زایی اختلاف معنی‌داری نشان نداد اما بر وزن تر کالوس در سطح یک درصد تفاوت معنی دار نشان داد (جدول ۱).

مقایسه میانگین اثر متقابل بنزیل آدنین، نفتالین استیک اسید و توفوردی بر درصد کالوس زایی نشان داد که صددرصد کالوس زایی مربوط به هر دو سطح ۰/۵ و یک میلی‌گرم در لیتر بنزیل آدنین با ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر نفتالین استیک اسید به دست آمد. کمترین درصد کالوس‌زایی با میانگین ۷۶/۶۶ درصد در تیمار ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر بنزیل آدنین با ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر توفوردی و همچنین در تیمار یک میلی‌گرم در لیتر بنزیل آدنین با یک میلی گرم در لیتر نفتالین استیک اسید مشاهده شد. بالاترین وزن تر کالوس با میانگین ۱/۳۰ گرم در تیمار ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر بنزیل آدنین با یک میلی‌گرم در لیتر توفوردی مشاهده شد. کمترین وزن تر کالوس با میانگین ۰/۵۰ گرم در تیمار ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر بنزیل آدنین با یک میلی‌گرم در لیتر نفتالین استیک اسید به دست آمد (جدول ۲).

جدول ۱- تجزیه واریانس تأثیر BAP و اکسین بر کالوس زایی سرخارگل.

منبع تغییرات	درجه آزادی	درصد کالوس‌زایی	وزن تر کالوس
BAP	۱	۱۶/۶۶ ns	۰/۰۴ ns
Auxin	۳	۵۸۸/۸۸ **	۰/۱۹ **
BAP * Auxin	۳	۲۷/۷۷ ns	۰/۲۴ **
خطا	۱۶	۱۶/۶۶	۰/۰۱۲
CV%		۴/۷۱	۱۲/۷۶

** معنی دار بودن در سطح احتمال (P<0.01). ns عدم اختلاف معنی دار.

جدول ۲ - مقایسه میانگین اثرات متقابل تأثیر BAP و اکسین بر کالوس زایی سرخارگل.

BAP (میلی گرم)	Auxin (میلی گرم)	درصد کالوس‌زایی	وزن تر کالوس (گرم)
۰/۵	۰/۵ 2,4-D	۷۶/۶۶ d	۱/۱۰ b
	۱ 2,4-D	۸۶/۶۶ bc	۱/۳۰ a
	۰/۵ NAA	۱۰۰ a	۰/۷۳ d
	۱ NAA	۸۰ cd	۰/۵۰ e
۱	۰/۵ 2,4-D	۸۳/۳۳ bcd	۰/۸۶ cd
	۱ 2,4-D	۹۰ b	۰/۸۰ cd
	۰/۵ NAA	۱۰۰ a	۰/۶۶ de
	۱ NAA	۷۶/۶۶ d	۰/۹۵ bc

اعداد دارای حروف مشترک در هر ستون اختلاف معنی‌داری بر اساس آزمون دانکن ندارند.

ریشه زایی از لپه‌های سرخارگل

نتایج حاصل از تجزیه واریانس تاثیر سطوح مختلف اکسین‌های ایندول بوتریک اسید و نفتالین استیک اسید بر ریشه زایی لپه‌های سرخارگل حاکی از آن است که تفاوت معنی‌داری در سطح احتمال یک درصد بین سطوح تیمارها از لحاظ درصد ریشه‌زایی، تعداد ریشه، طول ریشه و روز تا ریشه زایی وجود دارد (جدول ۳).

مقایسه میانگین تأثیر سطوح مختلف ایندول بوتریک اسید و نفتالین استیک اسید بر درصد ریشه زایی لپه‌های سرخارگل نشان می‌دهد که صد درصد ریشه‌زایی در تیمار ۰/۵ و یک میلی‌گرم در لیتر ایندول بوتریک اسید ثبت گردید. کمترین ریشه‌زایی با ۲۱/۶۶ درصد با کاربرد ۱/۵ میلی گرم در لیتر نفتالین استیک اسید به دست آمد (جدول ۴). مقایسه میانگین تأثیر سطوح مختلف ایندول بوتریک اسید و نفتالین استیک اسید بر تعداد ریشه نشان می دهد که بالاترین تعداد ریشه حاصل از باززایی لپه‌های سرخارگل مربوط به سطح ۰/۵ و یک میلی‌گرم در لیتر ایندول بوتریک اسید به ترتیب با میانگین ۵/۶۶ و ۵/۳۳ عدد می‌باشد. نتایج نشان داد که کمترین تعداد ریشه حاصل از باززایی لپه‌ها مربوط به تیمارهای نفتالین استیک اسید می‌باشد.

مقایسه میانگین اثر ایندول بوتریک اسید و نفتالین استیک اسید بر طول ریشه باززایی شده از لپه‌های سرخارگل نشان می دهد که بیشترین طول ریشه در تیمار شاهد با میانگین ۱۰/۶۶ بدون استفاده از ایندول بوتریک اسید و نفتالین استیک اسید به دست آمده است. به لحاظ آماری تیمارهای سطح ۰/۵ و ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر ایندول بوتریک اسید (۵/۳۳ سانتی‌متر) و سطح ۰/۲ میلی گرم در لیتر نفتالین استیک اسید (۶ سانتی‌متر) از لحاظ طول ریشه باززایی شده از لپه‌های سرخارگل تفاوت معنی داری وجود نداشت. مقایسه میانگین تأثیر سطوح مختلف ایندول بوتریک اسید و نفتالین استیک اسید بر تعداد روز تا ریشه‌دهی لپه‌های سرخارگل نشان می‌دهد که بالاترین تعداد روز مربوط به سطح ۰/۲ و ۰/۵ میلی گرم در لیتر ایندول بوتریک اسید به ترتیب با میانگین ۱۷ روز می باشد. نتایج نشان داد که سریع‌ترین روز تا ریشه دهی حاصل از باززایی لپه‌ها با میانگین ۱۱ تا ۱۲ روز مربوط به تیمارهای ایندول بوتریک اسید می باشد (جدول ۴).

جدول ۳- تجزیه واریانس تأثیر اکسین بر ریشه زایی لپه‌های سرخارگل.

منبع تغییرات	درجه آزادی	درصد ریشه‌زایی	تعداد ریشه	طول ریشه	روز تا ریشه زایی
اکسین	۸	۲۱۸۳/۶ **	۱۱/۶۹ **	۲۳/۹۱ **	۱۷/۳۷ **
خطا	۱۸	۲۶/۸۵	۰/۱۴	۰/۱۷	۰/۲۲
CV%		۷/۶۳	۱۴/۳۰	۹/۲۴	۳/۶۱

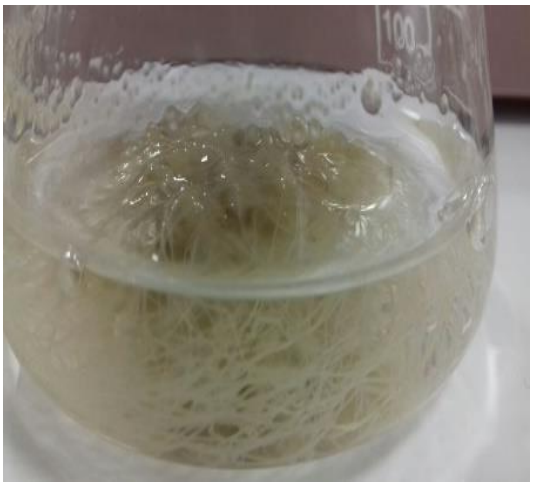
** معنی دار بودن در سطح احتمال P<0.01

جدول ۴- مقایسه میانگین تأثیر اکسین بر ریشه زایی لپه‌های سرخارگل.

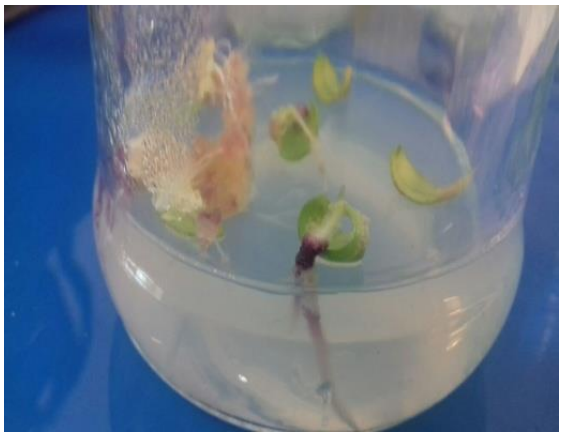
Auxin (میلی گرم بر لیتر)	درصد ریشه‌زایی	تعداد ریشه	طول ریشه (سانتی‌متر)	روز تا ریشه زایی
0	۶۶/۰۰ c	۱/۰۰ d	۱۰/۶۶ a	۱۲/۶۶ b
۰/۲ IBA	۹۳/۳۳ a	۲/۱۸ c	۴/۳۳ c	۱۲/۰۰ bc
۰/۵ IBA	۱۰۰ a	۵/۶۶ a	۵/۳۳ b	۱۱/۳۳ cd
۱ IBA	۱۰۰ a	۵/۳۳ ab	۳/۱۶ d	۱۱/۰۰ d
۱/۵ IBA	۷۶/۶۶ b	۴/۸۳ b	۵/۳۳ b	۱۱/۳۳ cd
۰/۲ NAA	۵۶/۶۶ d	۱/۶۶ cd	۶/۰۰ b	۱۷/۳۳ a
۰/۵ NAA	۵۰/۰۰ de	۱/۰۰ d	۳/۰۰ d	۱۷/۰۰ a
۱ NAA	۴۶/۶۶ e	۱/۳۳ d	۱/۶۶ e	۱۲/۳۳ b
۱/۵ NAA	۲۱/۶۶ f	۱/۳۳ d	۱/۳۳ e	۱۲/۳۳ b

اعداد دارای حروف مشترک در هر ستون اختلاف معنی‌داری بر اساس آزمون دانکن ندارند.

نتایج این پژوهش نشان می‌دهد که هورمون‌های اکسین بر صفات درصد ریشه‌زایی، روزتا ریشه‌زایی، تعداد ریشه و طول ریشه تأثیر معنی‌داری را نشان داد. در این بین اثر اکسین IBA در صفات نسبت به اکسین NAA بیشتر بود. به‌طوری‌که بیشترین درصد ریشه‌زایی را سطوح ۰/۵ و ۱ میلی‌گرم در لیتر IBA نشان دادند. همچنین این تیمارها، موثرترین تیمار در صفت تعداد روز تا ریشه‌زایی و تعداد ریشه بودند. IBA موثرترین اکسین در زمینه ریشه‌زایی بوده است. حرکت کند IBA در داخل بافت و همچنین تخریب دیر هنگام آن می‌تواند دلیل اصلی تأثیر این اکسین باشد [۱۵]. نتایج تحقیق حاضر با پژوهش‌های دیگر محققان مبنی بر تأثیر بیشتر اکسین IBA در ریشه‌زایی، مطابقت دارد [۱۷و ۱۶].



شکل ۴-۵: کشت ریشه سرخارگل در محیط مایع



شکل ۴-۴: تشکیل ریشه از لپه سرخارگل.

خصوصیات بیوشیمیایی درون شیشه‌ای سرخارگل

نتایج حاصل از تجزیه واریانس نشان داد که اثر ریزنمونه، اسید سالیسیلیک و روز نمونه‌برداری بر خصوصیات فیتوشیمیایی درون شیشه‌ای سرخارگل نشان می‌دهد که اثر اصلی و متقابل تیمارها در سطح احتمال یک درصد بر صفات کلروفیل کل، آنتی‌اکسیدان، فنل کل، فلاونوئید کل، گالیک اسید و کافئیک اسید معنی‌دار بود. اثر متقابل سه گانه ریزنمونه، اسید سالیسیلیک و روز نمونه برداری بر میزان کاراتنوئیدها و همچنین اثر اصلی ریزنمونه و روز نمونه برداری بر میزان آنتی اکسیدانی سرخارگل معنی‌دار نبود (جدول ۵).

جدول ۵- تجزیه واریانس تأثیر نوع ریزنمونه، اسید سالیسیلیک و روز نمونه برداری بر خصوصیات فیتوشیمیایی سرخارگل در شرایط درون شیشه‌ای.

منبع تغییرات	درجه آزادی	کلروفیل کل	کارتنوئیدها	آنتی اکسیدان	فنل کل	فلاونوئید کل	گالیک اسید	کافئیک اسید
ریزنمونه	۱	۰/۳۷ **	۲۲۱۰/۱ **	۰/۰۱ ns	۱۷/۵۲ **	۱۷/۵۸ **	۴/۱۵ **	۵/۳۷ **
اسید سالیسیلیک SA	۳	۰/۰۳ **	۲۴۲/۲ **	۳۶۱/۹ **	۱/۸۴ **	۳/۳۵ **	۰/۴۶ **	۰/۴۶ **
روز	۱	۰/۰۰۸ *	۲۰۵۴/۱ **	۰/۰۰۱ns	۱/۲۰ *	۷/۰۳ **	۰/۰۰۱ ns	۳/۰۷ *
ریزنمونه * SA	۳	۰/۰۴ **	۵۳۶/۹ **	۱۲۵/۰۱ **	۱/۲۶ *	۳/۱۳ **	۰/۳۱ **	۱/۱۲ **
ریزنمونه * روز	۱	۰/۰۱ **	۱۳۲۳/۰ **	۱۲۷/۷ **	۲/۰۰ **	۶/۰۹ **	۰/۰۰۵ ns	۱/۲۸ **
روز * SA	۳	۰/۰۰۶ *	۸۳۹/۹ **	۸۳/۷ **	۲/۳۲ **	۱/۵۴ **	۰/۴۱ **	۰/۴۴ *
ریزنمونه * روز* SA	۳	۰/۰۱۱ **	۱۸/۸۳ ns	۵۴۵/۰۵ **	۴/۶۳ **	۱/۴۸ **	۰/۳۸ **	۰/۲۴ **
خطا	۳۲	۰/۰۰۲	۲۸/۵۶	۸/۵۴	۰/۲۲	۰/۰۲۴	۰/۰۰۶	۰/۰۲۴
CV%		۲۰/۷۳	۹/۹۴	۲۳/۴۹	۱۹/۸۷	۱۴/۹۳	۱۰/۶۷	۱۷/۰۹

** و * به ترتیب معنی دار بودن در سطح احتمال P<0.01 و P<0.05 ns عدم اختلاف معنی دار.

مقایسه میانگین اثرات متقابل ریزنمونه، اسید سالیسیلیک و روز نمونه برداریبر خواص فیتوشیمیایی سرخارگل نشان می‌دهد که بیشترین مقدار کلروفیل کل با ۰/۴۶ و ۰/۳۹ میلی‌گرم در گرم وزن تر در ریزنمونه ریشه در غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر اسید سالیسیلیک در نمونه برداری روز ۳ و ۵ به دست آمده است. همچنین بیشترین مقدار کارتنوئید با ۹۹، ۹۵/۶۶ و ۹۱/۶۶ میلی‌گرم در گرم وزن تر در ریزنمونه ریشه به ترتیب در غلظت‌های ۲۰۰، ۱۰۰ و صفر میلی‌گرم در لیتر اسید سالیسیلیک در روز سوم نمونه برداری حاصل شده است (جدول ۶). کارتنوییدها تتراترپن‌های ۴۰ کربنی هستند که در پلاستید بافت‌های فتوسنتزی و غیرفتوسنتزی گیاهان یافت می‌شوند. از لحاظ ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانی، کارتنوییدها می‌توانند فتوسیستم‌ها را از چهار طریق ۱- واکنش با محصولات پراکسیداسیون لیپید برای پایان دادن به واکنش‌های زنجیره‌ای، ۲- جذب اکسیژن سینگل و انتشار انرژی به صورت گرما، ۳- واکنش با مولکول‌های کلروفیل برانگیخته شده جهت ممانعت از تشکیل اکسیژن سینگل و ۴- پراکندن انرژی مازاد برانگیخته شده از طریق چرخه‌ی زآنتوفیل، محافظت نمایند. در پژوهش حاضر، همه‌ی تیمارها موجب افزایش غلظت کارتنوئید نسبت به شاهد شدند که حفاظت بیشتر فتوسیستم در برابر صدمه‌ی اکسیداتیو و تنش‌های نوری را در پی داشت [۱۸].

مقایسه میانگین اثرات متقابل ریزنمونه، اسید سالیسیلیک و روز نمونه برداری بر ظرفیت آنتی اکسیدانی سرخارگل نشان می‌دهد بالاترین درصد آنتی اکسیدانی با ۹۹/۰۳ و ۹۸/۴۳ درصد به ترتیب در ریزنمونه کالوس با ۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر اسید سالیسیلیک در روز سوم نمونه برداری و ریزنمونه ریشه با صفر میلی‌گرم در لیتر اسید سالیسیلیک در روز سوم نمونه برداری به دست آمده است. نتایج تیمارها حاکی از آن است که تیمار ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر اسید سالیسیلیک با میانگین ۲/۷۶ میلی گرم بر گرم بیشترین مقدار فنل کل و تیمار ۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر اسید سالیسیلیک با میانگین ۱/۴۶ میلی‌گرم بر گرم بیشترین مقدار فلاونوئید کل را داشت. ریزنمونه ریشه فنل و فلاونوئید کل بیشتری نسبت به ریزنمونه کالوس ثبت کرد اما نمونه برداری در روز سوم بالاترین فنل و فلاونوئید را نشان داد (جدول ۶).فنل‌ها یکی از گسترده‌ترین و متنوع‌ترین ترکیبات طبیعی هستند که توانایی پالایش و زدودن رادیکال آزاد را دارند. این ویژگی آن‌ها به ساختار آن‌ها، حضور حلقه‌های آروماتیک و گروه فنلی این متابولیت‌ها مرتبط می‌باشد. گروه هیدروکسیل آزاد متصل به حلقه آروماتیک توان زدودن رادیکال‌های آزاد را دارا هستند. به همین خاطر، آسیب‌های اکسیداتیو را کاهش داده و ساختارهای سلولی را از اثرات منفی رادیکال‌های آزاد حفظ می‌کنند[۱۹]. در بررسی اثر متیل‌جاسمونات بر آنزیم‌های متابولیسمی و مواد فنلی در گیاه دارویی آگاستاکه در شرایط درون شیشه‌ای بیان داشتند که تیمار متیل‌جاسمونات سبب افزایش فعالیت آنزیم‌های فنیل‌آلانین-آمونیولیاز و ۴-کوماراتکوآلیگاز گردید. با وجود این تیمارهای متیل‌جاسمونات هیچ اثرمعنی‌داری بر مقدار فنل کل بعد از

گذشت ۸، ۱۲ و ۲۴ ساعت از تیمار در مقایسه با تیمارهای شاهد هر یك از زمان‌های یاد شده نداشتند [۱۹]. اسید سالیسیلیک مسیر سیگنالینگ اختصاصی دارد. در واقع اسید با تأثیر بر آنزیم فنیل آلانین آمونیالیاز سبب فعالسازی مسیر فنیل پروپانوئیدی و افزایش تولید ترکیبات فنلی می‌شوند [۲۰]. بسیاری از مطالعات نشان می¬دهند که افزودن اسید سالیسیلیک خارجی با اتصال به گیرنده‌های غشا سبب تولید اکسیژن‌های فعال، NO و پروتئین کینازها می‌شود [۲۱]. با تاثیر مستقیم این تغییرات بر رونویسی ژن‌ها و آنزیم‌های دخیل در بیوسنتز متابولیت‌های ثانویه سبب افزایش تولید این ترکیبات می‌شوند. این ترکیبات خود به طور مستقیم به عنوان عامل دفاعی عمل نمی‌کنند بلکه با فعالسازی مسیرهای تولید متابولیت‌های ثانویه سبب حفاظت از گیاه در برابر استرس‌های زنده و غیر زنده می‌شوند [۱۸]. در گزارشی تغییرات فعالیت آنزیم فنیل‌آلانین آمونیالیاز کنگرفرنگی تحت تأثیر متیل‌جاسمونات و اسید سالیسیلک در شرایط درون شیشه‌ای بیان شده است که بیشترین میزان فنل کل و فلانوئید در ۱۰۰ میکرمولار متیل‌جاسمونات مشاهده شده است. با افزایش اسید سالیسیلک نیز تجمع ترکیبات فنیل پروپانوئیدی افزایش یافت [۲۲].

مقایسه میانگین‌اثرات متقابل ریزنمونه، اسید سالیسیلیک و روز نمونه برداریبر خواص فیتوشیمیایی سرخارگل نشان می‌دهد که بیشترین مقدار گالیک اسید با ۲/۱۱ میلی‌گرم در گرم وزن تر در ریزنمونه ریشه در غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر اسید سالیسیلیک در روز سوم نمونه برداری ثبت شده است. بالاترین مقدار کافئیک اسید با ۲/۵۸ میلی گرم در گرم وزن تر در ریزنمونه ریشه در غلظت ۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر اسید سالیسیلیک در روز پنجم نمونه برداری اندازه گیری شده است (جدول ۶).

از راه‌های متداول برای تولید متابولیت‌های ثانویه، استفاده از تکنیک‌هایی مبتنی بر کشت بافت می‌باشد که در آن‌ها می‌توان به استفاده از الیسیتورها، افزودن پیش‌سازها، بهینه‌سازی محیط کشت اقدام کرد. الیسیتورها از طریق القای پاسخ‌های دفاعی باعث بیوسنتز و انباشت متابولیت‌های ثانویه می‌گردند [۲۳]. اسید سالیسیلیک یک مولکول پیام‌رسان طبیعی با ماهیت فنلی می باشد که با رادیکال‌های آزاد اکسیژن دارای اثر متقابل است. گزارش شده است که تیمار با اسید سالیسیلیک تجمع پراکسید هیدروژن را در آرابیدوپسیس سبب گردیده است [۲۴]. همچنین اسید سالیسیلیک در القای واکنش‌های آنتی‌اکسیدانی دارای نقش مهمی است و از راه ممانعت از پراکسیداسیون لیپیدها و به تأخیر انداختن پیری سبب حفاظت گیاهان می‌شوند [۷]. پژوهش‌های متعددی در زمینه کاربرد تنظیم‌کننده‌های رشد در محیط کشت بافت برای ریشه‌زایی گونه‌های سرخارگل انجام شده است. برای مثال: برای القای ریشه‌های نابجا از سه هورمون اکسین شامل ایندول استیک اسید، ایندول بوتریک اسید و نفتالین استیک اسید در محیط‌کشت MS بر روی ریزنمونه‌های سرخارگل استفاده شد، نتایج نشان داد هر دو ایندول استیک اسید و ایندول بوتریک اسید برای القای تشکیل ریشه موثر بودند [۴]. سالیسیلیک اسید به عنوان یک ایلیسیتور طبیعی سبب سنتز آنزیم‌های دفاعی گیاه از قبیل گلوکوناز و لیپواکسیژناز می‌شود. همچنین افزایش و تجمع ترکیبات فنلی، افزایش فعالیت آنتی اکسیدانی در کشت بافت گیاه مریم گلی [۲۵] و افزایش سطح کارتنوئید کل، کاروتن، لوتئین، کلروفیل کل، فنل کل و کلروژنیک اسید در گیاه گشنیز [۸] تحریک فعالیتگلوکاناز، آنزیم فنیل‌آلانین‌آمونیالیاز و پروکسیداز در گیلاس [۷] گزارش شده است. القای ریشه‌های نابجا در سرخارگل روی محیط MS ۱/۲ حاوی غلظت‌های مختلف اکسین‌های IAA، ایندول بوتریک اسید و نفتالین استیک اسید در غلظت‌های مختلف نشان داد که ۲ میلی‌گرم در لیتر ایندول بوتریک اسید بهترین اکسین از نظر تکثیر ریشه‌های نابجا و وزن تر و خشک و محتوای فنل و فلاونوئید بود [۱] .

نتیجه گیری کلی

ریشه‌های نابجا بسیاری از گیاهان را می‌توان با استفاده از غلظت‌های معینی از تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی افزایش داد. نتایج این پژوهش نشان می‌دهد که هورمون‌های اکسین بر صفات درصد ریشه‌زایی، روزتا ریشه‌زایی، تعداد ریشه و طول ریشه تاثیر معنی داری را نشان داد. اثرایندول بوتریک اسید در صفات نسبت به نفتالین استیک اسید بیشتر بود. بیشترین درصد ریشه‌زایی را سطوح ۰/۵ و ۱ میلی‌گرم در لیتر ایندول بوتریک اسید نشان داد، موثرترین تیمار در صفت تعداد روز تا ریشه‌زایی تیمارهای ۲ و ۱ میلی‌گرم در لیتر ایندول بوتریک اسید که با تیماهای ۰/۵ و ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر اختلافی را نشان ندادند. غلظت‌های ۰/۵ و ۱

جدول ۶- مقایسه میانگین اثرات متقابل ریزنمونه، اسید سالیسیلیک و روز نمونه برداری بر خصوصیات فیتوشیمیایی سرخارگل در شرایط درون شیشه ای.

ریزنمونه	اسید سالیسیلیک	روز	کلروفیل کل (میلی‌گرم بر گرم وزن تر)	کارتنوئید (میلی‌گرم بر گرم وزن تر)	آنتی اکسیدان (درصد)	فنل کل (میلی‌گرم بر گرم وزن تر)	فلاونوئید کل (میلی‌گرم بر گرم وزن تر)	گالیک اسید (میلی‌گرم بر گرم وزن تر)	کافئیک اسید (میلی‌گرم بر گرم وزن تر)
کالوس	صفر	۳	۰/۱۰ gh	۴۲/۶۶ cd	۸۹/۵۶ cf	۱/۵۳ fi	۰/۴۲ ef	۰/۴۲ f	۰/۳۵ f
		۵	۰/۱۹ ef	۳۴/۰۰ de	۸۴/۹۶ fg	۱/۴۳ ghi	۰/۵۲ def	۰/۶۰ ef	۰/۷۲ ef
	۵۰	۳	۰/۱۰ gh	۲۳/۳۳ f	۷۶/۵۰ h	۲/۳۶ def	۰/۳۲ f	۰/۵۱ ef	۰/۶۷ ef
		۵	۰/۱۵ eh	۴۶/۰۰ c	۹۳/۰۰ bcd	۲/۱۰ dg	۰/۵۱ def	۰/۵۵ ef	۱/۲۱ c
	۱۰۰	۳	۰/۱۹ ef	۴۱/۶۶ cd	۹۴/۲۶ abc	۲/۵۳ cde	۰/۵۵ def	۰/۶۰ ef	۰/۵۵ ef
		۵	۰/۰۷ h	۲۲/۳۳ f	۷۰/۶۶ i	۰/۹۳ i	۰/۳۰ f	۰/۵۲ ef	۰/۵۲ ef
	۲۰۰	۳	۰/۱۳ fgh	۲۶/۶۶ ef	۹۸/۴۳ a	۲/۱۰ d-g	۰/۵۷ def	۰ g	۰ g
		۵	۰/۱۴ fgh	۲۱/۶۶ f	۹۷/۰۳ ab	۱/۱۶ hi	۰/۳۲ f	۰ g	۰ g
ریشه	صفر	۳	۰/۲۴ de	۹۱/۶۶ a	۸۵/۰۳ efg	۲/۸۰ cd	۳/۳۳ b	۰/۸۳ d	۰/۶۶ ef
		۵	۰/۱۱ fgh	۶۷/۰۰ b	۹۱/۳۶ cde	۱/۶۶ ei	۱/۱۰ c	۰/۶۳ e	۲/۲۲ b
	۵۰	۳	۰/۳۰ cd	۶۱/۶۶ b	۸۸/۶۳ def	۲/۵۳ cde	۱/۲۶ c	۱/۰۶ c	۰/۸۲ de
		۵	۰/۲۳ de	۶۰/۶۶ b	۸۳/۲۰ g	۳/۲۶ bc	۰/۴۷ def	۱/۱۵ c	۱/۹۷ b
	۱۰۰	۳	۰/۴۶ a	۹۵/۶۶ a	۷۱/۸۶ hi	۲/۴۶ def	۰/۶۳ de	۲/۱۱ a	۰/۷۰ ef
		۵	۰/۳۹ ab	۵۸/۶۶ b	۹۰/۴۶ cde	۵/۱۳ a	۰/۷۵ d	۱/۰۶ c	۰/۵۸ ef
	۲۰۰	۳	۰/۳۷ bc	۹۹/۰ a	۸۶/۳۰ efg	۳/۹۳ b	۴/۳۳ a	۰/۵۱ ef	۱/۱۰ cd
		۵	۰/۳۹ ab	۶۷/۳۳ b	۹۳/۸۰ ad	۲/۰۳ eh	۱/۳۳ c	۱/۶۱ b	۲/۵۸ a

اعداد دارای حروف مشترک در هر ستون اختلاف معنی‌داری بر اساس آزمون دانکن ندارند.

میلی‌گرم در لیتر ایندول بوتریک اسید موثرترین تیمار بر صفت تعداد ریشه در سرخارگل بود. در بین اکسین‌های استفاده شده غلظت ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر نفتالین استیک اسید موثرترین تیمار برای طول ریشه با میانگین ۶ سانتی متر بود.

استفاده از اسید سالیسیلیک در سطح درون شیشه ای توانست تولید و تجمع متابولیت‌های ثانویه سرخارگل را تحریک کند. محرک‌ها با تأثیر بر فعالیت آنزیم‌های دخیل در مسیر سنتز فنیل پروپانوییدی سبب افزایش فنل‌ها شدند. تیمار اسید سالیسیلیک میزان فنل و فلاونوئید را نسبت به شاهد افزایش داد. با توجه به دسترسی آسان به اسید سالیسیلیک کاربرد آن برای رسیدن به غلظت بالاتر گالیک اسید و کافئیک اسید بیشتر توصیه می‌گردد. اما نکته مهم این است که افزایش تولید متابولیت‌ها نه تنها تحت تاثیر غلظت ایلیسیتور، بلکه به نوع بافت و زمان نمونه برداری نیز بستگی دارد. افزایش اسید سالیسیلیک بیش از حد معمول نه تنها افزایش متابولیت را در بر ندارد، بلکه از طریق کاهش فعالیت آنزیم که به احتمال قوی تحت تاثیر کاهش بیان ژن مربوطه است. تولید متابولیت را کم و یا متوقف می‌کند. بنابراین با بهینه‌سازی غلظت اسید سالیسیلیک، نوع بافت و زمان نمونه برداری می‌توان بدون دستکاری در ساختار ژنتیکی گیاه میزان متابولیت ثانویه مورد نظر را افزایش داد.

منابع

[1] Wu CH, Tang J, Jin ZX, Wang M, Liu ZQ, Huang T, Lian ML. Optimizing co-culture conditions of adventitious roots of *Echinacea pallida* and *Echinacea purpurea* in air-lift bioreactor systems. Biochemical engineering journal 2018 132, 206-216.

[2] Hu C, Kitts DD. Studies on antioxidant activity ofEchinacea root extract. J. Agric. Food Chem 2000 48:1466–1472.

[3] Gonin M, Bergougnoux V, Nguyen TD, Gantet P, Champion A. What Makes Adventitious Roots?. Plants 2019 8(240): 1-23.

[4] Choffe KL, Murch SJ, Saxena P K. Regeneration of *Echinaceapurpurea*: induction of root organogenesis from hypocotyl and cotyledon explants. Plant cell, tissue and organ culture 2000 62(3): 22-234.
[5] Zobayed SMA, Saxena PK.In vitro-grown roots: a superior explant forprolific shoot regeneration of St. John's wort (Hypericum perforatumL. cv 'New Stem') in a temporary immersion bioreactor. Plant Sci 2000 165:463 –470.
[6] Alizadeh, M. A User Manual On Plant Tissue Culture And Micropropagation. Nourozi Of Gorgan Publishers, 1390, 322.
[7] Zhao JL, Davis C, Verpoorte R. Elicitor signal transduction leading to production of plant secondary metabolites. Biotec.Adv 2005 23: 283–333.
[8] Divya P, Puthusseri B, Neelwarne, B. The effect of plant regulators on the concentration of caretonoids and phenolic compound in foliage of Coriander. 2013 Food Science and Technology110-120.
[9] Popova L, Ananieva E, Hristova V, Christov K, Georgieva K, Alexieva V, Stoinova Zh. Salicylic Acid and Methyl Jasmonte induced protection on photosynthesis to paraquat oxidative stress. Bulg. J.Plant Physiol.Special 2003 133-152.
[10] Barnes JD, Balaguer L, Manrique E, Elvira S, Davison AA. A reappraisal of the use of DMSO for extraction and determination of chlorophyll a and b in lichens and higher plants. Environ. Experim Bot. J 2002 32: 85-100.
[11] Ebrahimzadeh MA, Hosseinimehr SJ, Hamidinia A, Jafari M. Antioxidant and free radical scavenging activity of Feijoa sallowiana fruits peel and leaves. Pharmacologyonline 2008 1:7-14.
[12] Chang S, Tan C, Frankel EL, Barrett DM. Low-density lipoprotein antioxidant activity of phenolic compounds and polyphenol oxidase activity in selected clingstone nectarine cultivars. J. Agric. and Food Chem 2000 48: 147-151.
[13] Nakajima Ji, Tanaka I, Seo, S, Yamazaki M, Saito K. LC/PDA/ESI-MS profiling and radical scavenging activity of anthocyanins in various berries. J Biomed Biotechnol 2004 5: 241-247.
[14] Hu C, Kitts DD. Studies on antioxidant activity of Echinacea root extract. J. Agri. Food Chem 2000 48: 5. 1466-1472.
[15] Nasirkandi M, Hosseini B, Farokhzad A, Naseri L. Optimization Of Tissue Culture Conditions For Micropropagation In Semi-Dwarf M7 Apple Rootstock. Journal Of Plant Production 1397 V 25: N 2.
[16] Hussein S, Ibrahim R. Plant growth regulator effect on adventitious roots induction of *labisiapumila*. Malaysian Journal of Fundamental and Applied Sciences 2014 10(1):6-16.
[17] Ling AP K, Chin M F, Hussein S. Adventitious root production of *Centella asiatica* in response to plant growth regulators and sucrose concentration. Medicinal and Aromatic Plant Sciences and Biotechnology 2009 3: 36-41.
[18] Taiz L,Zeiger E. Plant Physiology (Third Edition). Sinauer Associates, Inc., Publishers, Sunderland 2002 675 p.
[19] Raouf Fard F, Sharifi M, Omidbaigi R, Sefidkon F, Behmanesh M,Ahmadi N. Effect of methyl jasmonate on metabolic enzymes and phenolics, in *Agastache foeniculum* [Pursh] Kuntze. Iranian J. Med. Arom. Plants 2014 30: 361-369.
[20] Wang K, Jin P, Cao S, Shang H, Yang Z, Zheng Y. Methyl jasmonate reduces decay and enhances antioxidant capacity in chines bayberries. J.Agric.Food Chem 2009 57:5809-5850.
[21] Raman V., Ravi S. Effect of Salicylic acid and methyl jasmonate on antioxidant systems of heamatococcus pluvialis. Acta Physiol Plant 2011 33:1043-1049.
[22] Samadi S, Ghasemnezhad A, Alizadeh M. Investigation on phenylalanine ammonia-lyase activity of artichoke (*Cynara scolymus* L.) affected by methyl jasmonate and salicylic acid in in-vitro conditions. J Plant Prod Res 2014 21: 135-148.
[23] Esmaeilzadeh-Bahabadi S, Sharifi M. The increasing of secondry metabolits in plant with use of biological elicitors. J. Cells Tissue 2013 4: 119-128.
[24] Rao MV, Paliyath G, Ormord DP. Watkins CB. Influence of salicylic acid on H_2O_2 production, oxidative stress and H_2O_2 metabolizing enzymes. Plant Physiol 1997 115: 137-149.
[25] Dong J, Wan G, Liang Z. Accumulation of salicylic acid induced phenolic compounds and raised activities of secondary metabolic and antioxidant enzymes in Salvia miltorrhiza cell culture. Journal of Biotechnology 2008 148:99-104.

Investigation of the effect of salicylic acid on adventitious root and callus secondary metabolites in *Echinacea purpurea L.* in tissue culture medium

Abbasali Dehpour Juybari*[1], Seyyed Hossein Hashemian Ahmadi [2], Ali Pakdin PariziI [3], Vahid Abdosi [4], Bagher Seyedalipour [5]

[1] Department of biology, Islamic Azad University, Qaemshahr, Iran.
[2] Department of horticulture, faculty of agriculture and Natural resources, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.
[3] Genetics and agricultural Institute of Tabarestan, Sari, Mazandaran, Iran.
[4] Assistant prof, Department of Horticultural science, science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.
[5] Cellular & Molecular Biology Department, Basic Sciences Faculty, University of Mazandaran, Babolsar, Iran.

* (Corresponding author): dehpour@gmail.com

Received: December.2021 Accepted: March 2022

Abstract

This research was conducted the effect of salicylic acid on secondary metabolite of *Echinacea purpurea* L. callus and adventitious root in tissue culture medium. Cotyledon was cultured based in factorial experiment in different BA concentration (0.5 and 1 mg/l) with 2,4-D and NAA (0.5 and 1 mg/l). For adventitious root production, cotyledon was cultured in medium contain NAA and IBA (0, 0.2, 1, 1.5, 2 mg/l) based on complete randomize design. Salicylic acid was applied at concentrations of 0, 50, 100 and 200 mg/l in liquid MS medium, and then fresh weight, phenol content, flavonoids and antioxidant activities were measured. The best treatment for callus production was MS medium contain 0.5 mg/l BA and 1 mg/l 2,4-D and best treatment for adventitious root was obtained in 1/2 MS medium contains 0.5 mg/l IBA. The highest antioxidant activity was observed in 100 and 200 mg/l of salicylic acid in callus and adventitious root respectively. The highest Gallic acid content with 2.11 mg/g root fresh weight was recorded in 100 mg/l 3 days after inoculation. Also the best medium for Cafeic acid content was observed in 200 mg/g root fresh weight 5 days after inoculation.

Keywords: Echinacea, adventitious root, Salicylic acid, secondary metabolite.