فصلنامه (علمی)

زیست شناسی تکوینی

سال پانزدهم، شماره ۳، تابستان ۱۴۰۲ ص. ۲۴-۱۳

مقاله پژوهشی

اثر برخی تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی بر القاء کالوس و کربوهیدارت‌ها بر ترکیبات بیوشیمیایی گیاه کاسنی (*Cichorium intybus* L.) در شرایط In vitro

لیلا بیک‌مهدوی[۱]، رؤیا بیشه کلایی[۲*]، عباسعلی دهپور جویباری[۲]، سعید سلطانی[۲]

[۱] گروه زیست‌شناسی، واحد قایمشهر، دانشگاه آزاد اسلامی، قائمشهر، مازندران، ایران.

[۲] گروه زیست شناسی، دانشکده فنی و مهندسی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد قائمشهر، قائمشهر، ایران.

[۳] گروه زیست شناسی دانشگاه آزاد اسلامی واحد قائمشهر، قایمشهر، ایران.

[۴] فیزیولوژی گیاهی، ریست شناسی، علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی قائمشهر، قائمشهر، ایران.

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

تاریخ دریافت: خرداد ۱۴۰۱ تاریخ پذیرش: آذر ۱۴۰۱

DOI: 10.30495/jdb.2023.1959436.1306 https://dorl.net/dor/20.1001.1.2008692.1402.15.3.2.4

چکیده

کاسنی (*Cichorium intybus* L.) گیاهی دارویی است که از همه قسمت‌های این گیاه (ریشه، برگ، بذر) در صنعت داروسازی و آرایشی استفاده می‌شود که تولید انبوه آن در شرایط درون شیشه‌ای دارای اهمیت است. هدف این پژوهش بررسی اثر تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی بر القاء کالوس حاصل از برگ و دمبرگ کاسنی و بررسی اثر کربوهیدرات‌ها (ساکارز و گلوکز) بر ترکیبات بیوشیمیایی (فلاونوئید، فعالیت آنتی‌اکسیدان، فنل، قند، آنتوسیانین) کالوس‌های تولیدشده می‌باشد. برای این منظور از سیتوکنین‌های BAP و KIN در سه سطح (۰/۵، ۱ و ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر) و NAA در سه سطح (۰/۲، ۰/۵ و ۱ میلی‌گرم در لیتر) در محیط‌کشت MS برای القاء کالوس استفاده شد. اثر سطوح مختلف ساکارز و گلوکز در پنج سطح (۱، ۲، ۳، ۴، ۵ درصد) با تیمار شاهد در محیط کشت MS ½ مایع مورد بررسی قرار گرفت. در حضور یک میلی‌گرم در لیتر از BAP و NAA بیشترین درصد کالوس‌زایی و وزن توده کالوس مشاهده شد. نتایج نشان داد که کربوهیدرات‌های مورد مطالعه بر ترکیبات بیوشیمیایی کاسنی اثر معنی‌دار ($P<0.01$) دارد. بیشترین میزان فنل (۰/۲۸ میلی‌گرم گالیک‌اسید بر گرم وزن‌تر) در تیمار سه درصد گلوکز و بیشترین میزان فلاونوئید (۰/۲۹ میلی‌گرم کوئرستین بر گرم وزن تر) در غلظت ۴ درصد گلوکز مشاهده شد. بیشترین مقدار فعالیت‌های آنتی‌اکسیدانی و قند به‌ترتیب در غلظت گلوکز ۱ درصد (۸۹/۵۱ درصد) و گلوکز چهار درصد (۸۶/۹۷ میکروگرم) مشاهده شد. بیشترین میزان آنتوسیانین به‌میزان ۷/۱ میکرومول بر گرم وزن تر در تیمار گلوکز ۵ درصد مشاهده شد. با مقایسه تیمار شاهد و سطوح غلظت ساکارز و گلوکز نتیجه‌گیری شد که ترکیبات بیوشیمیایی در حضور گلوکز مقدار بیشتری را داشتند. با توجه به نتایج این پژوهش، استفاده از غلظت مناسب از کربوهیدرات‌ها و تنظیم‌کننده‌های رشد می‌تواند پروتکل بهینه برای افزایش غلظت ترکیبات بیوشیمیایی گیاه کاسنی شود که در استفاده از این گیاه دارویی برای مصارف دارویی ارزشمند باشد.

کلیدواژه‌ها: آنتی‌اکسیدان، آنتوسیانین، فلاونوئید، فنل.

مقدمه

کاسنی (*Cichorium intybus* L.) گیاهی دارویی متعلق به خانواده Asteraceae است و در مناطق مدیترانه‌ای و بومی اروپا، غرب آسیا، مصر و آمریکای شمالی پراکنش دارد [۱]. در ایران نیز در دامنه‌های کم ارتفاع البرز، مناطق کوهستانی خراسان، گیلان و مازندران، آذربایجان و تهران رشد می‌کند [۲]. برگ‌های کاسنی حاوی کربوهیدرات‌ها، کاتکول، تانن، شیکوریک اسید، فلاونوئید، گلیکوزیدها، تارتاریک اسید، استرول‌های اشباع نشده و ترکیبات ثانویه فراوانی است [۴,۳]. سرعت تولید متابولیت‌های ثانویه در طبیعت آهسته است [۵]، بنابراین میزان تولید برخی از ترکیبات ثانویه اقتصادی نیست. کشت بافت گیاهان دارویی راه‌حلی مناسب برای تولید سریع و انبوه متابولیت‌های ثانویه و مواد دارویی می‌باشد [۵]. کشت گیاه کاسنی با خواص دارویی فراوان در شرایط درون شیشه‌ای این فرصت را برای تولید متابولیت‌های ثانویه باارزش فراهم خواهد کرد.

در پژوهش‌های زیادی کشت درون‌شیشه‌ای گیاهان به‌منظور افزایش تولید متابولیت‌های ثانویه مهم دارویی بررسی شده است [۷,۶]. از مهم‌ترین گروه متابولیت‌های ثانویه در گیاهان فنل‌ها و فلاونوئیدها هستند [۸]. قندها هم به‌عنوان سیگنالی برای تنظیم سیستم دفاعی گیاه دارای اهمیت هستند [۹]. ساکارز یکی از بهترین منابع کربن است که در طی جذب سلول‌های گیاهی به گلوکز و فروکتوز هیدرولیز می‌شود و میزان جذب آن در سلول های گیاهی متفاوت است [۱۰]. وجود کربوهیدرات‌هایی مانند ساکارز و گلوکز بر ویژگی‌های بیوشیمیایی گیاهان دارویی مؤثر است. در پژوهشی روی کاسنی گزارش شده که در حضور گلیسرول با دو برابر شدن غلظت ساکارز در محیط‌کشت، رویان‌زایی گیاه افزایش یافته است [۱۱]. در پژوهشی که بر تجمع زی‌توده ناشی از کربوهیدرات‌های ساکارز، گلوکز و مالتوز روی متابولیت ثانویه کالوس‌های فاگونیا ایندیکا (*Fagonia indica*) انجام شد به‌ترتیب بیشترین تولید متابولیت ثانویه و بیشینه زی‌توده را در گلوکز ۳ درصد و ساکارز ۵ درصد گزارش کردند [۷]. پژوهش‌های مختلفی گزارش شده است که فعالیت آنتی‌اکسیدانی گیاهان با افزایش غلظت کربوهیدرات‌ها، افزایش خواهد یافت [۱۲]. در پژوهشی پس از بررسی اثر کربن ساکارز بر متابولیت‌های ثانویه کالوس‌های گیاه Solanum nigrum گزارش شده است که با افزایش غلظت ساکارز و گلوکز (۳، ۴ و ۶ درصد) میزان فلاونوئید به‌صورت معنی‌داری کاهش یافت [۱۳]. Dantas و همکاران (۲۰۲۱) تأثیر منبع کربن بر رشد سلولی و تولید ترکیبات بیوشیمیایی گیاه دارویی مانگابا (*Hancornia speciosa* Gomes) را مورد بررسی قرار دادند و غلظت ۳ درصد ساکارز و گلوکز را برای بیشینه وزن تر و خشک سلول و بیشترین تولید پلی‌فنل‌ها، مناسب‌ترین غلظت معرفی کردند [۱۴].

حضور تنظیم‌کننده‌های رشد در محیط کشت بر ویژگی‌های کالوس‌های حاصل از برگ کاسنی تأثیرگذار است. اولین پژوهش روی برگ کاسنی در محیط کشت مایع حاوی تنظیم‌کننده‌های رشد NAA ۱ میلی‌گرم در لیتر، 2,4-D ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر و BAP ۱ میلی‌گرم در لیتر منجر به تولید میکروکالوس شد [۱۵]. در پژوهشی در ارتباط با بهینه‌سازی باززایی برگ گیاه کاسنی تحت تأثیر تنظیم‌کننده‌های رشد نتیجه‌گیری شد که محیط‌کشت حاوی ترکیب اکسین و سیتوکنین به‌ویژه BAP ۱ میلی‌گرم در لیتر و NAA۰/۷۵ میلی‌گرم در لیتر در القاء کالوس بسیار مؤثر است [۱۶]. در پژوهش دیگری، سیستم باززایی کاسنی را از بافت‌های لپه‌ای، برگ، ریشه و هیپوکوتیل تحت تنظیم‌کننده‌های رشد IAA، IBA، NAA، 2,4-D و BAP مورد بررسی قرار گرفت و گزارش شد که ترکیب BAP ۲ میکرومول و 2,4-D ۰/۷۵۲ میکرومول در محیط‌کشت بیشترین درصد کالوس‌زایی را ایجاد کرد [۱۷]. در پژوهشی بهینه‌سازی شرایط القاء کالوس همراه با هدف افزایش تولید ترکیبات فنلی و آنتی‌اکسیدانی گیاه دارویی پونه‌سای (*Nepeta binaloudensis* Jamzad) مورد بررسی قرار دادند [۱۸]. آنها نتیجه گرفتند که بیشترین وزن تر و خشک کالوس، فنل کل و فلاونوئید در ریزنمونه‌های برگ کشت شده در محیط کشت MS ½ حاوی BAP و NAA با غلظت یکسان ۲ میلی‌گرم مشاهده شد.

برگ گیاه کاسنی در طب سنتی و مدرن مورد استفاده دارویی قرار می‌گیرد. دستیابی به بهترین شرایط القاء کالوس و در نتیجه پرآوری کاسنی در محیط درون شیشه، از جنبه دستیابی به بهترین ترکیب تنظیم‌کننده‌های رشد، کربوهیدرات و سطوح غلظت آنها دارای اهمیت است. مطالعات نشان داده که منبع کربوهیدرات مورد استفاده و همچنین مقدار آن بر میزان رشد اندام یا سلول و

مقدار متابولیت‌های ثانویه مؤثر هستند. کربوهیدارت‌ها به‌عنوان جزء اصلی از ترکیبات محیط کشت هستند، بنابراین هدف این پژوهش بررسی نوع کربوهیدرات و غلظت آن بر میزان متابولیت‌های ثانویه برگ و دمبرگ گیاه کاسنی بود.

مواد و روش

کشت بذر جهت تهیه گیاهچه استریل

به‌منظور تهیه گیاهچه استریل، بذرهای کاسنی وحشی از پاکان بذر اصفهان در اردیبهشت ۱۴۰۰ تهیه شد. برای ضدعفونی، ابتدا بذور به‌مدت ۹۰ ثانیه با الکل ۷۰ درصد و پس از شستشو با آب مقطر استریل با محلول هیپوکلریت سدیم دو درصد برای مدت ۲۰ دقیقه ضدعفونی شدند. در پایان چند مرتبه با آب مقطر استریل مجددا شستشو شدند تا بقایایی محلول آب ژاول از بین برود. پس از ضدعفونی بذرها در محیط کشت MS ½ [۱۹] حاوی دو درصد ساکارز، ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر میواینوزیتول، و ۰/۷ درصد آگار کشت شده و در اتاقک رشد با دمای ۲±۲۵ درجهٔ سانتی‌گراد و شدت نور ۲۵۰۰ لوکس و مدت زمان ۱۶ ساعت روشنایی و هشت ساعت تاریکی نگهداری شدند. محیط کشت، آب مقطر و ابزارآلات کشت در دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد و فشار ۱/۲ اتمسفر به‌مدت ۲۰ دقیقه استریل شدند. تنظیم pH با استفاده از محلول اسید هیدروکلریدریک و هیدروکسید سدیم ۱ نرمال صورت گرفت. پنج روز پس از کشت، بذرها شروع به جوانه‌زنی کرده (شکل ۱- الف) و دو هفته پس از جوانه‌زنی ریزنمونه‌های برگ و دمبرگ برای القاء کالوس آماده شدند.

اعمال تیمار هورمونی برای القاء کالوس

ریزنمونه‌های استریل برگ در قطعات ۰/۵ سانتی‌متر مربع و ریزنمونه دمبرگ در قطعات یک سانتی‌متر مربع برای القاء کالوس در محیط کشت MS کامل با ساکارز سه درصد و میواینوزیتول ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر و آگار ۰/۷ درصد حاوی غلظت‌های متفاوت تنظیم کننده‌های رشد گیاهی کشت شدند. برای القاء کالوس دو هورمون سیتوکنین شامل بنزیل آدنین و کینتین در غلظت‌های (۰/۵، ۱، ۱/۵ میلی گرم در لیتر) در ترکیب با هورمون نفتالین استیک اسید در غلظت‌های (۰/۲، ۰/۵، ۱ میلی‌گرم در لیتر) مورد استفاده قرار گرفتند. کشت‌ها در اتاقک رشد با دمای ۲±۲۵ درجهٔ سانتی‌گراد و شدت نور ۲۵۰۰ لوکس و مدت زمان ۱۶ ساعت روشنایی و هشت ساعت تاریکی تا زمان تشکیل کالوس نگهداری شدند. شش هفته پس از کشت برگ و دمبرگ (شکل ۱-ب) صفات درصد کالوس‌زایی، وزن توده کالوس، صفات مورفولوژیکی کالوس، وجود ریشه و گیاهچه همزمان با تشکیل کالوس مورد ارزیابی قرار گرفت.

شکل ۱- الف) گیاهچه‌های استریل حاصل از بذر (دانهال)، ب) کالوس‌های حاصل از برگ کاسنی بعد از گذشت ۶ هفته

اعمال تیمارهای کربوهیدرات برای بررسی ترکیبات فیتوشیمیایی در کالوس

پس از تعیین بهترین تیمار هورمون از نظر وزن توده کالوس و خصوصیات کیفی کالوس، نمونه‌ها به محیط کشت مایع MS کامل منتقل شده و روی شیکر با دور ۱۰۰ دور در دقیقه و تحت شرایط نوری ۵۰۰ لوکس و دمای ۲۵ درجه سانتی گراد قرار گرفتند. در هر شیشه کشت، مقدار سه گرم کالوس در ۴۰ میلی‌لیتر محیط کشت مایع MS کامل حاوی BAP در غلظت یک میلی‌گرم در لیتر همراه با هورمون NAA در غلظت یک میلی‌گرم در لیتر قرار گرفتند. یک هفته پس از کشت کالوس در محیط مایع اعمال تیمار کربوهیدرات‌ها جهت بررسی تغییرات ترکیبات فیتوشیمیایی موجود در کالوس اعمال شد. غلظت‌های ساکارز و گلوکز شامل پنج غلظت ۰، ۱، ۲، ۳، ۴ و ۵ درصد روی کالوس‌ها اعمال شد و ۱۰ روز پس از اعمال تیمار، کالوس‌ها از محیط کشت استخراج شده و جهت بررسی صفات فیتوشیمیایی مورد ارزیابی قرار گرفتند. صفاتی مانند میزان قند کل، آنتوسیانین، ترکیبات فنلی، فلاوونوئید و فعالیت آنتی‌اکسیدانی اندازه‌گیری شد.

اندازه‌گیری قند کل

برای اندازه‌گیری قندهای محلول به ۱۰۰ میکرولیتر عصاره متانولی (برای تهیه عصاره متانولی در بخش ترکیبات فنلی کل رجوع شود) مقدار سه میلی‌لیتر انترون ۱۰ میلی‌مولار (محلول در اسید سولفوریک ۷۰ درصد) افزوده شد و به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. سپس نمونه‌ها به دمای محیط منتقل شد و پس از هم دما شدن با محیط و ورتکس کردن جذب آنها در طول‌موج ۶۲۰ نانومتر برآورد شد. از گلوکز جهت رسم منحنی استاندارد (صفر تا ۱۰۰ میکروگرم گلوکز، R2=9920 معادله خط شامل Y=0.229X+0.0438) استفاده شد [۲۰].

اندازه‌گیری آنتوسیانین

برای سنجش آنتوسیانین، از روش [۲۱] برای اندازه‌گیری مقدار آنتوسیانین نمونه‌ها استفاده خواهد شد. یک گرم از نمونه گیاهی را در هاون چینی با ۱۰ میلی‌لیتر متانول اسیدی (متانول خالص و اسید کلریدریک خالص به نسبت حجمی ۹۹ به ۱) کاملا ساییده و عصاره در لوله‌های آزمایش سر پیچ‌دار ریخته شده و به‌مدت ۲۴ ساعت در تاریکی و در یخچال قرار می‌گیرد. سپس به‌مدت ۱۰ دقیقه در ۴۰۰۰g سانتریفوژ و جذب محلول بالایی در طول موج ۵۵۰ نانومتر اندازه‌گیری می‌شود. محاسبه غلظت با استفاده از فرمول A=εbc به‌دست آمد. در این فرمول e یا ضریب خاموشی (۳۳۰۰۰ $M^{-1}cm^{-1}$)، A مقدار جذب b عرض کووت که برابر است با ۱ سانتی‌متر و c مقدار آنتوسیانین بر حسب میکرومول بر وزن تر گیاه بیان شد.

عصاره‌گیری برای ارزیابی صفات آنتی‌اکسیدانی

به‌منظور اندازه‌گیری فنل کل، ترکیبات فلاونوئیدی و میزان درصد مهار رادیکال‌های آزاد، یک گرم از بافت گیاهی را در ۱۰ گرم متانول ۸۰ درصد ساییده و محلول مورد نظر را برای ۴۸ ساعت در تاریکی رو شیکر قرار گرفته و به‌مدت ۱۵ دقیقه در دستگاه التراسونیک سونیکه شدند. از قسمت فوقانی عصاره، برای اندازه‌گیری صفات بیوشیمیایی مورد نظر استفاده شد.

اندازه‌گیری فنل کل

برای اندازه‌گیری فنل کل از روش فولین سیوکالتیو [۲۲] استفاده شد. بدین منظور ۲۰ میکرولیتر از عصاره متانولی با ۱۰۰ میکرولیتر فولین سیوکالتیو و ۱/۱۶ میلی‌لیتر آب مقطر مخلوط و پس از پنج دقیقه استراحت، ۳۰۰ میکرولیتر کربنات سدیم ۱ مولار به آن افزوده شد. محلول فوق به مدت ۳۰ دقیقه در تاریکی و حمام بخار ۴۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. در نهایت نمونه‌ها در طول موج ۷۶۵ نانومتر قرائت شدند. در نمونه شاهد نیز به جای عصاره، از متانول ۸۰ درصد استفاده شد. برای رسم منحنی کالیبراسیون از غلظت‌های متفاوت استاندارد اسید گالیک (۵، ۱۰، ۲۰، ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰ و ۲۵۰ میلی‌گرم در لیتر) استفاده شد. سپس با استفاده از معادله شیب خط به‌دست آمده با قرار دادن عدد جذب نمونه به جای Y میزان فنل (X) برحسب میلی‌گرم در گرم به‌دست آمد.

اندازه‌گیری محتوای فلاونوئید

برای محاسبه محتوای فلاونوئیدی از روش آلومینیوم کلراید استفاده شد [۲۳]. بدین جهت ابتدا ۰/۵ میلی‌لیتر از عصاره

متانولی تهیه شده با ۱/۵ میلی‌لیتر متانول، ۰/۱ میلی‌لیتر آلومینیوم کلراید ۱۰ درصد در اتانول (۱۰ گرم آلومینیوم کلراید در ۱۰۰ میلی‌لیتر اتانول و آب مقطر)، ۰/۱ میلی‌لیتر استات پتاسیم یک مولار (۹/۸ گرم در ۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر) و ۲/۸ میلی‌لیتر آب مقطر مخلوط شد. در نمونه شاهد به جای عصاره متانولی، از متانول خالص استفاده شد. سپس محلول ۰/۵ ساعت در تاریکی قرار داده شد و سپس بلافاصله در طول موج ۴۱۵ نانومتر قرائت گردید. برای رسم منحنی کالیبراسیون از غلظت‌های متفاوت استاندارد کوئرسیتین (۰، ۵، ۱۰، ۲۰، ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر) استفاده شد. با استفاده از معادله شیب خط بدست آمده با قرار دادن عدد جذب نمونه به جای Y میزان فلاونوئید (X) بر حسب میلی‌گرم در گرم به‌دست آمد.

اندازه‌گیری درصد مهار رادیکال آزاد

برای اندازه‌گیری درصد مهار رادیکال آزاد (DPPH) [۲۴]، ۱ میلی‌لیتر از عصاره متانولی را به یک میلی‌لیتر، DPPH و برای شاهد به جای عصاره متانولی از متانول خالص استفاده شد. سپس نمونه‌ها به‌مدت ۳۰ دقیقه در محیط تاریک نگهداری شدند. در پایان جذب نمونه‌ها در طول موج ۵۱۷ نانومتر قرائت شد.

تجزیه و تحلیل داده‌ها

در بخش القاء کالوس به‌صورت فاکتوریل بر پایه طرح کاملاً تصادفی با سه فاکتور نوع ریز نمونه، غلظت‌های مختلف سیتوکنین بنزیل آدنین و کینتین و فاکتور سوم اکسین نفتالین استیک اسید با سه تکرار و هر تکرار شامل ۴ مشاهده و در بخش اعمال تیمارهای کربوهیدرات از طرح فاکتوریل در قالب کاملا تصادفی با دو فاکتور غلظت‌های متفاوت ساکارز و گلوکز به‌صورت جداگانه با سه تکرار و هر تکرار شامل ۴ مشاهده انجام شد. به‌منظور تجزیه و تحلیل داده‌ها از نرم‌افزار SAS نسخه ۹/۱ استفاده گردید و مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون توکی برای بخش القاء کالوس و آزمون حداقل اختلاف معنی‌دار (Least Significant Difference (LSD) برای تیمارهای کربوهیدرات انجام شد.

نتایج

بعد از گذشت ۱۰ روز ریزنمونه‌های کشت‌شده شروع به تورم و تولید کالوس کردند. کالوس‌های تولید شده در ابتدا دارای رنگ سفید و زرد شفاف بودند و به مرور زمان در اندازه و رنگ‌های مختلفی (سبز، قرمز و قهوه‌ای) مشاهده شدند (شکل ۱- ب و جدول ۱).

نتایج تجزیه واریانس تنظیم‌کننده‌های رشد درصد کالوس‌زایی و وزن توده کالوس در جدول ۲ آمده است. نتایج نشان داد که متغیر ریزنمونه بر درصد کالوس‌زایی و وزن توده کالوس تأثیر معنی‌دار نداشت. همچنین اثر سیتوکنین و اکسین روی درصد کالوس‌زایی در سطح پنج درصد و بر وزن توده کالوس در سطح یک درصد دارای تفاوت معنی‌دار است. در متغیرهای برهم‌کنش ریزنمونه و سیتوکنین و ریزنمونه و اکسین روی درصد کالوس‌زایی تفاوت معنی‌دار مشاهده نگردید اما روی وزن توده کالوس دارای تفاوت معنی‌دار ($P<0.01$) است. همچنین برهم‌کنش اکسین و سیتوکنین و برهم‌کنش تمامی متغیرها روی درصد کالوس‌زایی و وزن توده کالوس تفاوت معنی‌دار دارد ($P<0.01$).

جدول ۱- واکنش ریزنمونه‌های تولیدشده در محیط‌کشت‌های حاوی تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی

تیمار	ریزنمونه	سیتوکنین (میلی گرم در لیتر)		نفتالین استیک اسید (میلی گرم در لیتر)	درصد کالوس‌زایی	وزن توده کالوس (گرم)	رنگ کالوس	وجود ریشه	وجود گیاهچه
۱	برگ	بنزیل آدنین	۰/۵	۰/۲	۰±۱۰۰	۱/۷۶ ± ۰/۰۷۶	سبز	−	−
۲	برگ	بنزیل آدنین	۱	۰/۲	۰±۱۰۰	۱/۲۷ ± ۰/۱۵	سبز	−	−
۳	برگ	بنزیل آدنین	۱/۵	۰/۲	۷۷/۳۳ ± ۱۹/۷	۲/۱۷ ± ۰/۲۹	سبز	−	++
۴	برگ	بنزیل آدنین	۰/۵	۰/۵	۵۸/۶۷ ± ۸/۰۸	۱/۰۳ ± ۰/۱۵	سبز	+	+
۵	برگ	بنزیل آدنین	۱	۰/۵	۰±۱۰۰	۱/۵۳ ± ۰/۲۳	سبز	+	+
۶	برگ	بنزیل آدنین	۱/۵	۰/۵	۰±۱۰۰	۱/۱۶ ± ۰/۲۵	سبز	−	−
۷	برگ	بنزیل آدنین	۰/۵	۱	۰±۱۰۰	۲/۴ ± ۰/۱	سبز	−	+
۸	برگ	بنزیل آدنین	۱	۱	۸۸/۶۷ ± ۱۹/۶۳	۲/۷۷ ± ۰/۴۶	سبز	−	+

تیمار	ریزنمونه	سیتوکنین (میلی گرم در لیتر)	نفتالین استیک اسید (میلی گرم در لیتر)	درصد کالوس‌زایی	وزن توده کالوس (گرم)	رنگ کالوس	وجود ریشه	وجود گیاهچه
۹	برگ	بنزیل آدنین ۱/۵	۱	۰±۱۰۰	۱/۸۷ ± ۰/۲۱	سبز	+	−
۱۰	دمبرگ	بنزیل آدنین ۰/۵	۰/۲	۷۷/۳۳ ± ۱۹/۶۳	۱/۴ ± ۰/۲	سبز	−	+
۱۱	دمبرگ	بنزیل آدنین ۱	۰/۲	۸۸/۶۷ ± ۱۹/۶۳	۲/۰۷ ± ۰/۲۳	سبز	−	−
۱۲	دمبرگ	بنزیل آدنین ۱/۵	۰/۲	۸۸/۶۷ ± ۱۹/۶۳	۲/۰۶ ± ۰/۲۳	سبز	−	−
۱۳	دمبرگ	بنزیل آدنین ۰/۵	۰/۵	۷۷/۳۳ ± ۱۹/۶۳	۱/۹ ± ۰/۱	سبز	+	+
۱۴	دمبرگ	بنزیل آدنین ۱	۰/۵	۰±۱۰۰	۲/۴ ± ۰/۲۶	سبز	−	+
۱۵	دمبرگ	بنزیل آدنین ۱/۵	۰/۵	۰±۱۰۰	۱/۸ ± ۰/۱	سبز	−	−
۱۶	دمبرگ	بنزیل آدنین ۰/۵	۱	۰±۱۰۰	۲/۴ ± ۰/۲۶	سبز	−	+
۱۷	دمبرگ	بنزیل آدنین ۱	۱	۰±۱۰۰	۲/۳ ± ۰/۲	قهوه‌ای	−	++
۱۸	دمبرگ	بنزیل آدنین ۱/۵	۱	۷۷/۳۳ ± ۱۹/۶۳	۲/۱۵ ± ۰/۱۳	سبز	+	−
۱۹	برگ	کینتین ۰/۵	۰/۲	۷۷/۳۳ ± ۱۹/۶۳	۰/۵۲ ± ۰/۲۲	سبز	−	−
۲۰	برگ	کینتین ۱	۰/۲	۷۷/۳۳ ± ۱۹/۶۳	۰/۸۳ ± ۰/۱۶	سبز	−	−
۲۱	برگ	کینتین ۱/۵	۰/۲	۰±۱۰۰	۱/۳ ± ۰/۲	قهوه‌ای	−	−
۲۲	برگ	کینتین ۰/۵	۰/۵	۰±۱۰۰	۱/۵۷ ± ۰/۳	سبز	+	−
۲۳	برگ	کینتین ۱	۰/۵	۰±۱۰۰	۱/۵ ± ۰/۲۶	سبز	++	−
۲۴	برگ	کینتین ۱/۵	۰/۵	۸۸/۶۷ ± ۱۹/۶۳	۱/۴ ± ۰/۲	سبز	++	−
۲۵	برگ	کینتین ۰/۵	۱	۰±۱۰۰	۱/۵۷ ± ۰/۲۵	سبز	+	−
۲۶	برگ	کینتین ۱	۱	۰±۱۰۰	۲/۳۶ ± ۰/۱۵	سبز	++	+
۲۷	برگ	کینتین ۱/۵	۱	۰±۱۰۰	۲/۶۷ ± ۰/۳۲	قرمز	++	−
۲۸	دمبرگ	کینتین ۰/۵	۰/۲	۰±۱۰۰	۰/۴۵ ± ۰/۱۳	سبز	−	−
۲۹	دمبرگ	کینتین ۱	۰/۲	۰±۱۰۰	۱/۱۳ ± ۰/۱۵	سبز	−	−
۳۰	دمبرگ	کینتین ۱/۵	۰/۲	۰±۱۰۰	۱/۳ ± ۰/۲	سبز	−	−
۳۱	دمبرگ	کینتین ۰/۵	۰/۵	۷۷/۳۳ ± ۱۹/۶۳	۱/۸۲ ± ۰/۱	سبز	+	−
۳۲	دمبرگ	کینتین ۱	۰/۵	۰±۱۰۰	۱/۳۳ ± ۰/۰۶	سبز	+	−
۳۳	دمبرگ	کینتین ۱/۵	۰/۵	۸۸/۶۷ ± ۱۹/۶۳	۱/۲۸ ± ۰/۲۱	قرمز	++	+
۳۴	دمبرگ	کینتین ۰/۵	۱	۰±۱۰۰	۱/۵۵ ± ۰/۲۶	سبز	+	−
۳۵	دمبرگ	کینتین ۱	۱	۰±۱۰۰	۰/۷۷ ± ۰/۱۱	سبز	++	−
۳۶	دمبرگ	کینتین ۱/۵	۱	۰±۱۰۰	۱/۸۵ ± ۰/۲۵	سبز	++	−

جدول ۲- نتایج تجزیه واریانس تأثیر تیمارهای آزمایشی بر مشخصه‌های مورد مطالعه

		درصد کالوس‌زایی		وزن توده کالوس	
منبع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات	آماره F و معنی‌داری	میانگین مربعات	آماره F و معنی‌داری
ریزنمونه	۱	۴/۴۸۱۴	۰/۰۳^{ns}	۰/۰۸۶۱	۱/۹۶^{ns}
سیتوکنین	۵	۳۳۳/۹۰۳۷	۲/۲۶*	۱/۴۹۵۵	۳۴/۰۴**
اکسین	۲	۴۹۹/۳۷۰۳	۳/۸۳*	۵/۰۹۵۰	۱۱۵/۹۶**
ریزنمونه× سیتوکنین	۵	۶۴/۹۲۵۹	۰/۵۰^{ns}	۰/۴۳۰۸	۹/۸۱**
ریزنمونه× اکسین	۲	۸۰/۰۳۷۰	۰/۶۱^{ns}	۱/۰۷۱۰	۲۴/۳۸**
اکسین× سیتوکنین	۱۰	۴۷۲/۹۲۵۹	۳/۶۳**	۰/۶۲۷۶	۱۴/۲۸**
ریزنمونه× سیتوکنین× اکسین	۱۰	۴۴۶/۴۸۱۵	۳/۴۳**	۰/۴۸۳۰	۱۰/۹۹**
خطا	۷۲	۱۳۰/۲۵۹۳		۰/۰۴۴۰	
کل	۱۰۷				
		ضریب تغییرات= ۱۲/۴۳		ضریب تغییرات= ۱۲/۸۶	

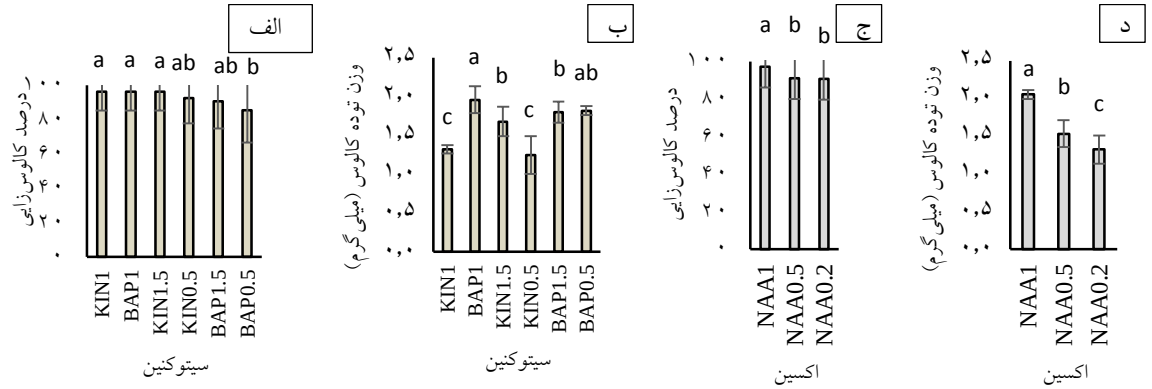
**، * و ns به‌ترتیب معنی‌داری ($P<0.01$)، ($P<0.05$) و عدم معنی‌داری را نشان می‌دهد.

نتایج مقایسه میانگین تیمارهای اکسین و سیتوکنین بر درصد کالوس‌زایی و وزن توده کالوس در شکل ۲ آمده است. نتایج نشان داد که BAP با غلظت یک میلی‌گرم در لیتر بیشترین درصد کالوس‌زایی و وزن توده کالوس را به‌ترتیب به‌میزان ۹۶/۲۲ درصد و ۱/۹۶ میلی‌گرم در لیتر داشت. البته KIN با غلظت یک میلی‌گرم در لیتر نیز دارای درصد کالوس‌زایی بالایی (۹۶/۲۲ درصد) بود ولی وزن توده کالوس (۱/۳۲ میلی‌گرم) در این تیمار کمتر از BAP یک میلی‌گرم در لیتر بود.

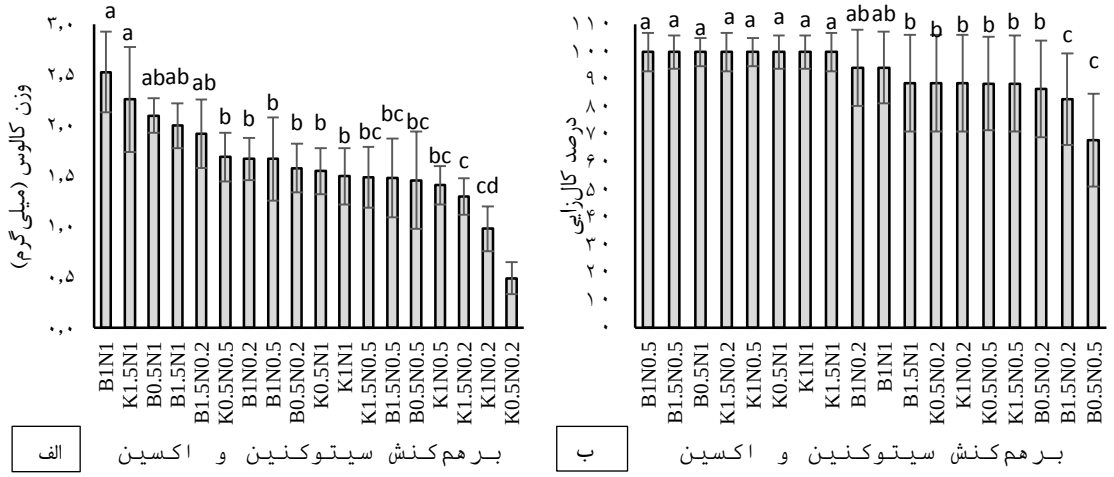
نتایج نشان داد بیشترین و کمترین وزن توده کالوس به‌ترتیب در BAP یک میلی‌گرم در لیتر و KIN ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر به میزان ۱/۹۶ و ۱/۲۶ میلی‌گرم مشاهده شد (شکل ۲- ب).

همان‌طور که مشاهده شد بیشترین درصد کالوس‌زایی و وزن توده کالوس در تیمارهای اکسین مربوط به تیمار NAA با غلظت یک میلی‌گرم در لیتر به‌ترتیب با ۹۷/۱۷ درصد و ۲/۰۵ درصد بود. همچنین با کاهش غلظت NAA درصد کالوس‌زایی و وزن توده کالوس کاهش یافته است.

نتایج اثر برهم‌کنش سیتوکنین و اکسین‌های مورد مطالعه روی درصد کالوس‌زایی و وزن توده کالوس در شکل ۳ آمده است. نتایج نشان داد که تیمارهای BAP در غلظت‌های ۰/۵، ۱ و ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر همراه با NAA در غلظت‌های ۰/۵ و یک میلی‌گرم در لیتر بیشترین درصد کالوس‌زایی (۱۰۰ درصد) را داشتند (شکل ۳- ب). البته همانطور که در شکل مشاهده می‌شود اثر بر همکنش ۸ ترکیب تیماری دیگر (شامل B1.5N0.5، B0.5N1، K1.5N0.2، K1N0.5، K1N1 و K1.5N1) نیز دارای ۱۰۰ درصد کالوس‌زایی بودند.



شکل ۲- آزمون مقایسه میانگین تیمارهای سیتوکنین بر درصد کالوس‌زایی (الف) و وزن توده کالوس (ب) و تیمارهای اکسین بر درصد کالوس‌زایی (ج) و وزن توده کالوس (د) به روش LSD.



شکل ۳- اثر برهم‌کنش سیتوکنین و اکسین روی درصد کالوس‌زایی (الف) و وزن توده کالوس (ب) ریزنمونه‌های گیاه کاسنی

اثر برهم‌کنش سیتوکنین و اکسین روی وزن توده کالوس نشان داد که بیشترین وزن توده کالوس در محیط‌کشت حاوی غلظت برابر ۱ میلی‌گرم در لیتر از BAP و NAA به‌میزان ۲/۵۳ میلی‌گرم بود (شکل ۳- الف). همچنین کمترین وزن توده کالوس در اثر برهم‌کنش KIN با غلظت ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر و NAA ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر به‌میزان ۰/۴۹ میلی‌گرم مشاهده شد.

نتایج تجزیه واریانس تیمارهای شاهد، ساکارز (۵ سطح) و گلوکز (پنج سطح) بر صفات بیوشیمیایی گیاه کاسنی در جدول ۳ آمده است. نتایج نشان داد که تیمارهای مورد مطالعه بر صفات بیوشیمیایی در سطح یک درصد دارای تفاوت معنی‌دار است. به‌عبارت دیگر تیمارهای شاهد، ساکارز و گلوکز در ۵ سطح غلظت اثر معنی‌دار بر ترکیبات فیتوشیمیایی گیاه کاسنی داشته است.

آزمون مقایسه میانگین تیمارهای مورد مطالعه روی مشخصه‌های قند و آنتی‌اکسیدان در شکل ۴ آمده است. نتایج نشان داد که بیشترین مقدار آنتی‌اکسیدان در گلوکز یک درصد به‌میزان ۸۹/۵۱ درصد بود. همچنین در گلوکز چهار درصد بیشترین میزان قند (۸۶/۹۷ میکروگرم) مشاهده شد.

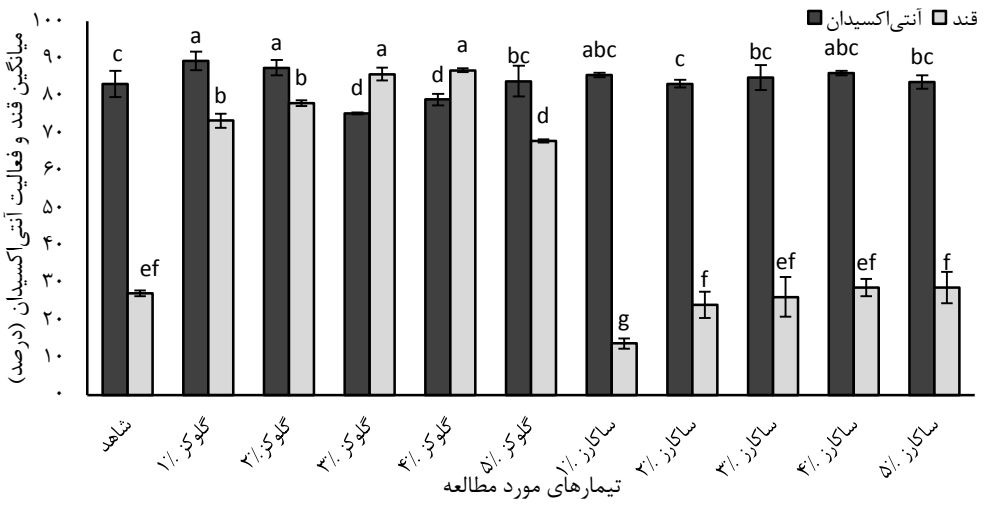
مقایسه میانگین تیمارهای ساکارز و گلوکز بر فلاونوئید و فنل در شکل ۵ آمده است. بیشترین میزان فلاونوئید در گلوکز۴ درصد به‌میزان ۰/۲۹ میلی‌گرم کوئرستین بر گرم وزن تر مشاهده شد. همچنین در ساکارز ۳ درصد بیشترین میزان فنل (۰/۲۸ میلی‌گرم گالیک‌اسید بر گرم وزن تر) مشاهده شد.

مقایسه میانگین غلظت‌های ساکارز و گلوکز بر فعالیت آنتوسیانین نشان داد که بیشترین میزان آنتوسیانین به‌میزان ۷/۱ در تیمار گلوکز ۵ درصد مشاهده شد (شکل ۶). نتایج نشان داد که بیشترین میزان آنتوسیانین در سطوح غلظت ساکارز متعلق به ساکارز ۵ درصد به‌میزان ۴/۱۴ میکرومول بر گرم وزن تر درصد بوده است. همان‌طور که مشاهده شد در غلظت‌های بالا از ساکارز و گلوکز فعالیت آنتوسیانین بیشترین میزان را داشته است.

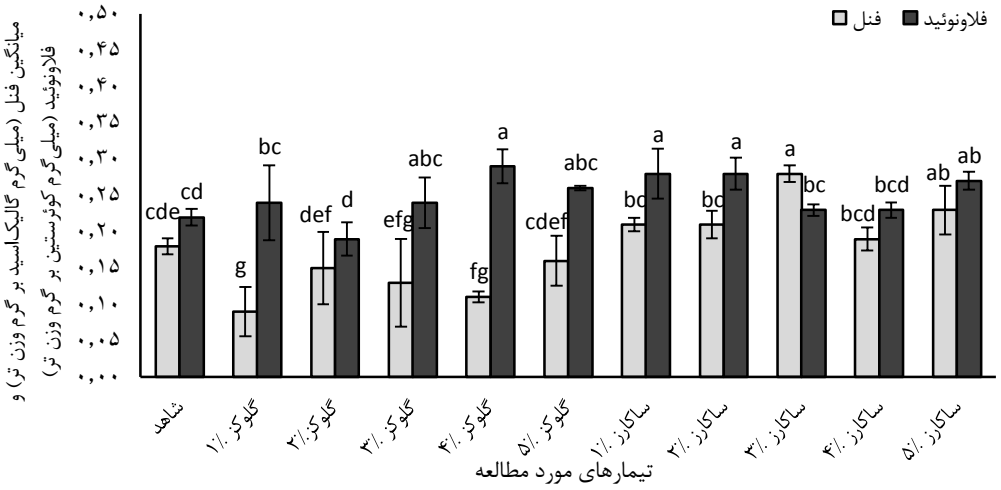
جدول ۳- جدول تجزیه واریانس اثر تیمارهای مورد مطالعه بر صفات بیوشیمیایی کاسنی

منبع تغییرات	درجه آزادی	قند		آنتوسیانین		فنل		فلاونوئید		آنتی‌اکسیدان	
		میانگین مربعات	آماره F و معنی‌داری	میانگین مربعات	آماره F و معنی‌داری	میانگین مربعات	آماره F و معنی‌داری	میانگین مربعات	آماره F و معنی‌داری	میانگین مربعات	آماره F و معنی‌داری
تیمار	۱۰	۲۴۸۷/۲۲	۳۷/۰۷**	۸/۴۶	۹۹/۲۱**	۰/۰۱	۴/۱۲**	۰/۰۰۳	۹/۸۹**	۴۵/۲۸	۸/۵۳**
خطا	۲۲	۶/۶۰		۰/۰۹		۰/۰۰۱		۰/۰۰۰۶		۵/۳۱	
کل	۳۲										

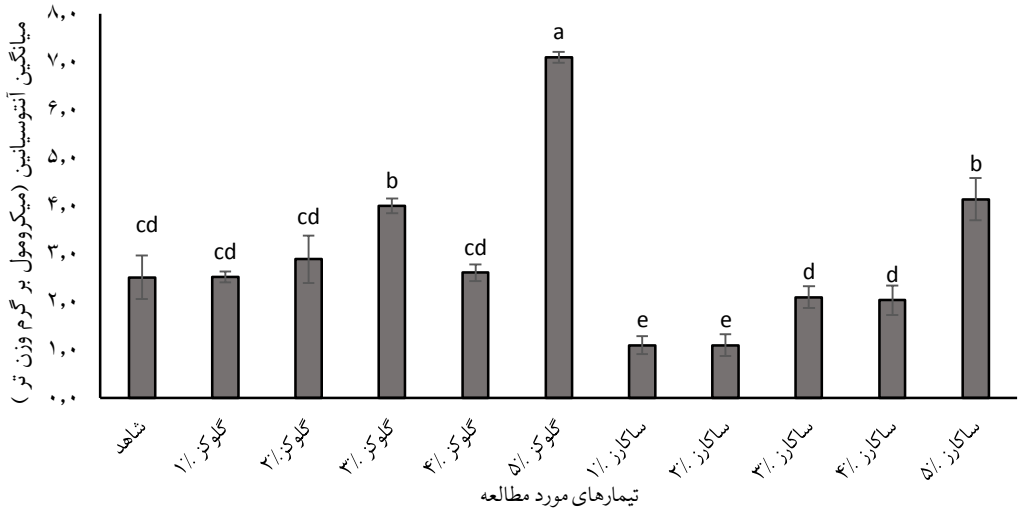
** معنی‌داری ($P<0.01$) را نشان می‌دهد.



شکل ۴- مقایسه میانگین تیمارهای ساکارز و گلوکز بر قند و آنتی‌اکسیدان



شکل ۵- مقایسه میانگین تیمارهای ساکارز و گلوکز بر فلاونوئید و فنل



شکل ۶- مقایسه میانگین تیمارهای ساکارز و گلوکز بر آنتوسیانین

بحث

نتایج آنالیز واریانس نشان داد که نوع ریزنمونه‌های مورد مطالعه (برگ و دمبرگ) اثر معنی‌داری بر درصد کالوس‌زایی و وزن توده کالوس ندارد اما اثر برهم‌کنش آنها همراه با اکسین و سیتوکنین دارای تفاوت معنی‌دار ($P<0.01$) بود (جدول ۲). میانگین وزن توده کالوس در ریزنمونه برگ (۱/۶۷ میلی‌گرم) کمی بیشتر از ریزنمونه‌های دمبرگ (۱/۶۱ میلی‌گرم) مشاهده شد که می‌توان نتیجه گرفت ریزنمونه برگ با کمی اختلاف برای باززایی کاسنی مناسب‌تر است. در پژوهش‌های مختلفی نیز گزارش شد که القاء کالوس از برگ کاسنی و باززایی آن از برگ [۱۸,۱۷] و حتی نسبت به دیگر اندام گیاه مناسب‌تر است [۱۹]. یکی از دلایل مهم این موضوع می‌تواند به تمایل بیشتر اندام هوایی به خصوص جوانه به رویش باشد.

نتایج تجزیه واریانس تیمارهای تنظیم‌کننده رشد نشان داد که سیتوکنین و اکسین و ترکیب آنها در محیط‌کشت اثر معنی‌داری بر القاء کالوس و وزن توده کالوس گیاه کاسنی دارد (جدول ۲). بیشترین درصد کالوس‌زایی به‌میزان ۹۶/۲۲ درصد در BAP با غلظت ۱ میلی‌گرم در لیتر مشاهده شد (شکل ۲- الف و ب). از آنجایی‌که آزمون مقایسه میانگین تیمارهای سیتوکنین نشان داد که درصد کالوس‌زایی بین تیمارها تفاوت چندانی ندارند و تقریبا در یک کلاس معنی‌داری به روش توکی قرار دارند برای تصمیم به انتخاب مناسب‌ترین سیتوکنین برای کشت بافت گیاه کاسنی بهتر

است از تیمارهای وزن توده کالوس استفاده کرد. نتایج نشان داد بیشترین وزن توده کالوس در BAP با غلظت ۱ میلی‌گرم در لیتر وجود دارد پس این تیمار بهترین تیمار سیتوکنین برای کشت‌بافت کاسنی بود که با نتایج پژوهش‌های گذشته‌هم‌خوانی دارد [۱۸,۱۷]. نتایج نشان داد که با کاهش غلظت NAA ۲ مشخصه درصد کالوس‌زایی و وزن توده کالوس روند کاهشی داشته است (شکل ۲- الف و ب و شکل ۳) به‌طوری‌که بیشترین و کمترین میزان این دو مشخصه به‌ترتیب در NAA ۱ میلی‌گرم در لیتر و ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر مشاهد شد. پس تیمار NAA ۱ میلی‌گرم در لیتر بهترین اکسین برای کشت‌بافت کاسنی بود که با پژوهش‌های دیگر [۲۶,۲۵] همخوانی دارد. پژوهش‌های اندکی وجود دارد که حضور تنها یک تنظیم‌کننده رشد در محیط کشت را برای القاء کالوس و باززایی گیاهان توصیه کرده باشند. نتایج پژوهش حاضر نیز نشان داد که استفاده توأم اکسین و سیتوکنین در محیط کشت باعث افزایش درصد کالوس‌زایی و وزن توده کالوس شده است. این موضوع می‌تواند به دلیل فراهم سازی تنظیم‌کننده‌های متنوع برای رشد و تمایز سلول باشد که شرایط مناسب‌تری برای القای کالوس فراهم می‌کنند.

نتایج برهم‌کنش سیتوکنین و اکسین نشان داد که وزن توده کالوس در تیمار BAP و NAA با غلظت یکسان ۱ میلی‌گرم در لیتر بیشترین میزان خود بوده است (شکل ۳). از طرف دیگر از آنجاکه مطابق دسته‌بندی آزمون مقایسه میانگین به‌روش توکی، تیمار BAP و NAA با غلظت یکسان ۱ میلی‌گرم در لیتر در طبقه اول بیشترین درصد کالوس‌زایی قرار گرفت (شکل ۳) می‌توان نتیجه گرفت که محیط‌کشت حاوی BAP و NAA با غلظت یکسان ۱ میلی‌گرم در لیتر بهترین محیط برای باززایی گیاه کاسنی بوده است. این نتیجه با نتایج پژوهش‌هایی که گذشته روی القاء کالوس گیاه کاسنی انجام شده است هم‌خوانی دارد [۲۶,۲۵,۱۷]. برای باززایی کاسنی هم می‌توان از ترکیب BAP و NAA در محیط‌کشت MS استفاده کرد [۱۷].

کشت سلولی، به ویژه کشت کالوس، باعث افزیش تولید متابولیت ثانویه می‌شود [۲۷]. نتایج این پژوهش نشان داد که تیمارهای کربوهیدرات بر ترکیبات بیوشیمیایی کاسنی اثر معنی‌دار داشت ($P<0.01$) (جدول ۳). در ارتباط با میزان فلاونوئید نتایج نشان داد که با افزایش غلظت ساکارز، میزان فلاونوئید روند کاهشی داشته است (شکل ۵). روند کاهشی فلاونوئید با افزایش درصد ساکارز مطابق پژوهش‌های گذشته [۲۸] قابل پیش‌بینی بود. نتایج نشان داد که در ساکارز ۱ درصد، بیشترین میزان فلاونوئید مشاهده شد که در پژوهشی دیگر [۲۹] نیز چنین نتیجه‌ای به‌دست آمد.

در ارتباط با رابطه میزان فنل و کربوهیدرات نتایج نشان داد که به‌طور کلی وجود ساکارز در محیط کشت در مقایسه با گلوکز باعث افزایش فنل شده است و با افزایش غلظت ساکارز میزان فنل روند افزایشی داشته است (شکل ۵) که با پژوهش‌های مختلف [۳۰,۷] همخوانی دارد. بیشترین میزان فنل در ساکارز ۳ درصد مشاهده شد (شکل ۴) که با پژوهش Dantas و همکاران [۱۴] همخوانی دارد. وجود ساکارز در محیط‌کشت گیاهی آن چنان دارای اهمیت است که ساکارز ۳ درصد به‌عنوان استاندارد محیط کشت MS تعریف شد [۱۹]. همچنین وجود تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی به‌ویژه BAP و NAA در محیط کشت با تأثیر بر مسیر فعالیت فنیل‌پروپانوئید [۳۱] به‌عنوان عامل تأثیرگذار بر افزایش فنل کل گزارش شده است [۱۸].

وجود گلوکز و ساکارز با غلظت‌های بالا در محیط کشت در تجمع زی‌توده کالوس و متابولیت‌های ثانویه بسیار مؤثر است. در پژوهشی غلظت بالاتر کربوهیدرات‌هایی مانند ساکارز و گلوکز در محیط کشت را باعث افزایش ترکیبات فنلی و فعالیت آنتی‌اکسیدان بیان کردند [۷]. نتایج پژوهش نشان داد که در ساکارز و گلوکز با غلظت‌های ۱ و ۲ درصد، بیشترین فعالیت آنتی‌کسیدانی وجود داشته است (شکل ۴). رابطه معنی‌داری بین کربوهیدرات و فعالیت آنتی‌اکسیدان گیاهان وجود دارد [۱۲]. در بیشتر پژوهش‌ها رابطه مستقیم بین غلظت کربوهیدرات‌ها و فعالیت آنتی‌اکسیدان گیاهان گزارش کردند [۱۲] اما در این پژوهش بیشترین فعالیت آنتی‌اکسیدان در غلظت‌های پایین ساکارز و گلوکز مشاهده شد (شکل ۳). البته در پژوهشی گزارش شده است که با افزایش غلظت گلوکز فعالیت آنتی‌اکسیدانی گیاه کاهش می‌یابد [۷].

در ارتباط با آنتوسیانین، نتایج نشان داد با افزایش غلظت کربوهیدارت‌های مورد مطالعه فعالیت آنتوسیانین نیز افزایش یافته است به‌طوری‌که بیشترین میزان آنتوسیانین در غلظت‌های ۵ درصد از ساکارز و گلوکز مشاهده شد (شکل ۶). رابطه

معنی‌داری بین غلظت کربوهیدرات‌های مورد مطالعه و آنتوسیانین مشاهده شد (جدول ۳) که در پژوهشی از اصطلاح رابطه درجه ۲ معنی‌دار (significant quadratic relationship) [۳۳] برای این منظور استفاده شده است. در پژوهش‌های گذشته تعداد محدودی از کربوهیدرات‌ها گزارش شده‌اند که بر تولید آنتوسیانین تأثیرگذار باشند [۳۴] و حتی در مطالعه‌ای اثر کربوهیدارت‌هایی مانند گلوکز، مالتوز و فروکتوز را بر تولید آنتوسیانین ضعیف دانستند [۱۷]. اما پژوهش‌های فراوانی بر اثر معنی‌دار و رابطه قوی بین ساکارز و تولید آنتوسیانین تأکید داشتند. در پژوهشی بیشترین مقدار آنتوسیانین میوه سیب در غلظت ۶ درصد ساکارز و گلوکز ۳ درصد مشاهده شد [۳۲].

به‌طور کلی نتایج نشان داد که اثر تنظیم‌کننده‌های رشد بر درصد کالوس‌زایی و وزن توده کالوس اثر معنی‌دار داشت. بیشترین وزن توده کالوس و درصد کالوس‌زایی در محیط‌کشت MS حاوی BAP و NAA هر دو با غلظت ۱ میلی‌گرم در لیتر مشاهده شد. نتایج نشان داد که کربوهیدرات‌های مورد مطالعه اثر معنی‌دار بر غلظت ترکیبات بیوشیمیایی کالوس‌های کاسنی داشت. همچنین با افزایش غلظت ساکارز و گلوکز تولید و فعالیت بیشتر ترکیبات بیوشیمیایی افزایش یافت. پیشنهاد می‌شود که اثر متقابل کربوهیدرات‌ها و ترکیب هم‌زمان آنها نیز بر فعالیت بیوشیمیایی کالوس‌های حاصل از برگ و ریشه کاسنی مورد مطالعه قرار گیرد.

منابع

[1] Norbak, R., Nielsen, K. and Kondo, T., 2002. Anthocyanins from flowers of Cichorium intybus. Phytochemistry, 60(4), pp.357-359.

[2] Mozaffarian V. Recognition of medicinal and aromatic plants of Iran. Tehran: Farhang Mo'aser. 2012.

[3] Al-Snafi AE. Medical importance of Cichorium intybus–A review. IOSR Journal of Pharmacy. 2016;6(3):41-56.

[4] Sigaroudi, F, Jaroudi, S, Taqizadeh, M. Therapeutic applications of medicinal plants. Arjmand Press. 2017.

[5] Mulabagal V, Tsay HS. Plant cell cultures-an alternative and efficient source for the production of biologically important secondary metabolites. International journal of applied science and engineering. 2004 Mar;2(1):29-48.

[6] Ebrahimi MA, Payan A. Induction of callus and somatic embryogenesis from cotyledon explants of Fagonia indica Burm. Journal of Medicinal Plants and By-Products. 2013 Jan 1;2(2):209-14.

[7] Khan T, Abbasi BH, Zeb A, Ali GS. Carbohydrate-induced biomass accumulation and elicitation of secondary metabolites in callus cultures of Fagonia indica. Industrial Crops and Products. 2018 Dec 15;126:168-76.

[8] Ghasemzadeh A, Ghasemzadeh N. Flavonoids and phenolic acids: Role and biochemical activity in plants and human. Journal of medicinal plants research. 2011 Dec 16;5(31):6697-703.

[9] Morkunas I, Ratajczak L. The role of sugar signaling in plant defense responses against fungal pathogens. Acta Physiologiae Plantarum. 2014 Jul;36(7):1607-19.

[10] Giri A, Narasu ML. Transgenic hairy roots: recent trends and applications. Biotechnology advances. 2000 Mar 1;18(1):1-22.

[11] Bellettre A, Couillerot JP, Vasseur J. Effects of glycerol on somatic embryogenesis in Cichorium leaves. Plant cell reports. 1999 Nov;19(1):26-31.

[12] Bolouri-Moghaddam MR, Le Roy K, Xiang L, Rolland F, Van den Ende W. Sugar signalling and antioxidant network connections in plant cells. The FEBS journal. 2010 May;277(9):2022-37.

[13] Amir M, Aqil M, Ismail MV, Akhtar M, Khan AH, Mujeeb M. Effect of carbon source and inubation temperature on total content of secondary metabolites of callus culture of Solanum nigrum. World Journal of Pharmaceutical Research. 2017 May 25;6(8):905-22.

[14] Dantas LA, Faria PS, Dário BM, Arantes AL, Silva FG, Avila RG, Pereira PS, Neto AR. The impact of carbon source on cell growth and the production of bioactive compounds in cell suspensions of Hancornia speciosa Gomes. Scientific Reports. 2021 Dec 21;11(1):1-4.

[15] Vermeulen A, Desprez B, Lenoir P, Chupeau MC, Chupeau Y. Isolation and culture of mesophyll protoplasts from two cytoplasmic albino mutants of Cichorium intybus L. Journal of plant physiology. 1993 Sep 1;142(3):377-80.

[16] Eskandari, H. Optimization of regeneration of chicory plant (Cichorium intybus L.) under the influence of different hormonal timers in MS and B5 cultures. Master Thesis, Faculty of Basic Sciences, Shahed University. 2010.
[17] Velayutham P, Ranjithakumari BD, Baskaran P. An efficient in vitro plant regeneration system for Cichorium intybus L.–an important medicinal plant. Organogenesis. 2003;2000(2001).
[18] Sagharyan M, Ganjeali A, Cheniany M, Kouhi SM. Optimization of callus induction with enhancing production of phenolic compounds production and antioxidants activity in callus cultures of Nepeta binaloudensis Jamzad (Lamiaceae). Iranian Journal of Biotechnology. 2020 Oct;18(4):e2621.
[19] Murashige T, Skoog F. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. Physiologia plantarum. 1962 Jul;15(3):473-97.
[20] McCready RM, Guggolz J, Silviera V, Owens HS. Determination of starch and amylose in vegetables. Analytical chemistry. 1950 Sep 1;22(9):1156-8.
[21] Wagner GJ. Content and vacuole/extravacuole distribution of neutral sugars, free amino acids, and anthocyanin in protoplasts. Plant physiology. 1979 Jul;64(1):88-93.
[22] Slinkard K, Singleton VL. Total phenol analysis: automation and comparison with manual methods. American journal of enology and viticulture. 1977 Jan 1;28(1):49-55.
[23] Chang CC, Yang MH, Wen HM, Chern JC. Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. Journal of food and drug analysis. 2002 Jul 1;10(3).
[24] Ebrahimzadeh MA, Pourmorad F, Hafezi S. Antioxidant activities of Iranian corn silk. Turkish Journal of biology. 2008 Feb 19;32(1):43-9.
[25] Mix-Wagner G, Gailung O. The influence of different carbon sources on callus formation and shoot proliferation of chicory (Cichorium intybus L. var. sativum). Landbauforschung Volkenrode. 1996 Jan 1;46(1):1-4.
[26] Rehman RU, Israr M, Srivastava PS, Bansal KC, Abdin MZ. In vitro regeneration of witloof chicory (Cichorium intybus L.) from leaf explants and accumulation of esculin. In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant. 2003 Mar;39(2):142-6.
[27] Nikolaeva TN, Zagoskina NV, Zaprometov MN. Production of phenolic compounds in callus cultures of tea plant under the effect of 2, 4-D and NAA. Russian Journal of Plant Physiology. 2009 Jan;56(1):45-9.
[28] Amir M, Aqil M, Ismail MV, Akhtar M, Khan AH, Mujeeb M. Effect of carbon source and inubation temperature on total content of secondary metabolites of callus culture of Solanum nigrum. World Journal of Pharmaceutical Research. 2017 May 25;6(8):905-22.
[29] Baque MD, Elgirban A, Lee EJ, Paek KY. Sucrose regulated enhanced induction of anthraquinone, phenolics, flavonoids biosynthesis and activities of antioxidant enzymes in adventitious root suspension cultures of Morinda citrifolia (L.). Acta Physiologiae Plantarum. 2012 Mar;34(2):405-15.
[30] Amorim HV, Dougall DK, Sharp WR. The effect of carbohydrate and nitrogen concentration on phenol synthesis in Paul's Scarlet Rose cells grown in tissue culture. Physiologia Plantarum. 1977 Jan;39(1):91-5.
[31] Khan T, Abbasi BH, Khan MA, Shinwari ZK. Differential effects of thidiazuron on production of anticancer phenolic compounds in callus cultures of Fagonia indica. Applied biochemistry and biotechnology. 2016 Apr;179(1):46-58.
[32] Zahedzadeh F, Kakavand F, Mahna N. Effects of carbohydrate, light, nitrogen and magnesium on in vitro production of anthocyanin in apple. Int J Biosci. 2015;6(5):250-60.
[33] Rajendran L, Ravishankar GA, Venkataraman LV, Prathiba KR. Anthocyanin production in callus cultures ofDaucus carota as influenced by nutrient stress and osmoticum. Biotechnology letters. 1992 Aug;14(8):707-12.
[34] Mizukami H, Tomita K, Ohashi H. Anthocyanin accumulation and changes in activities of phenylalanine ammonia-lyase and chalcone synthase in roselle (Hibiscus sabdariffa L.) callus cultures. Plant cell reports. 1989 Dec;8(8):467-70.

The Effect of Some Plant Growth Regulators on the Induction of Calluses and Carbohydrates on the Biochemical Composition of Chicory (*Cichorium intybus* L.) In Vitro

Beikmahdavi L.[1], Bishehkolaei R.[2*], Dehpour A. A.[2], Soltani S.[2]

[1] Department of Biology, Qaemshahr Branch, Islamic Azad University, Mazandaran, Qaemshahr, Iran
[2] Department of biology,Qaemshahr branch,Islamic azad university,Qaemshahr .Iran
[3] Department of biology,Qaemshahr branch,Islamic azad university,Qaemshahr .Iran
[4] Plant Physiology, Biology, Basic Sciences, Ghaemshahr Islamic Azad University,Qaemshahr .Iran

* (Corresponding author): rbishe@gmail.com

DOI: 10.30495/jdb.2023.1959436.1306 https://dorl.net/dor/20.1001.1.2008692.1402.15.3.2.4

Received: May 2022 Accepted: November 2022

Abstract

Cichorium intybus L. is a medicinal plant belonging to the Asteraceae genus that all parts of this plant (roots, leaves, seeds) are used medicinally that its mass production on in vitro conditions is important. The aim of this study was to investigate the effect of growth regulators on the induction of calluses from chicory leaves and petioles and to investigate the effect of carbohydrates (sucrose and glucose) on the biochemical composition (flavonoid, Antioxidant activity, phenol, sugar, anthocyanin) of the produced Calli. For this purpose, BAP and KIN cytokinins at three levels (0.5, 1 and 1.5 mg/l) and NAA auxin at three levels (0.2, 0.5 and 1 mg/l) in MS medium were used to induction callus. Also, the effect of different levels of sucrose and glucose was investigated on five levels (1, 2, 3, 4, 5%) with control treatment ½ MS medium. The highest percentage of callus formation and callus weight was observed in culture medium containing 1 mg / l of BAP and NAA. The results showed that the studied carbohydrates had a significant effect on the biochemical composition of chicory ($P<0.01$). The highest amount of phenol (0.28 mg gallic acid / g fresh weight) was observed in the treatment of 3% glucose and the highest amount of flavonoids (0.29 mg quercetin/gr fresh weight) was observed in the concentration of 4% glucose. Also, the highest amount of antioxidant and sugar activities were observed in glucose concentration of 1% (89.51%) and glucose 4% (86.97 µg), respectively. The highest amount of anthocyanin (7.1 µM per gram of fresh weight) was observed in 5% glucose treatment. Comparing the control treatment and sucrose and glucose concentration levels, it was concluded that above mention biochemical compounds were higher in the presence of glucose. According to the results of this research, the use of appropriate concentration of carbohydrates and growth regulators can be the optimal protocol to increase the concentration of biochemical compounds of chicory plant, which is valuable in using this medicinal plant for medicinal purposes..

Keywords: Antioxidants, anthocyanins, flavonoid, phenol.