

بررسی تأثیر تنظیم‌کننده‌های رشد بر صفات مورفولوژیکی و ترکیبات آنتی‌اکسیدانی سوسن چلچراغ (*Lilium ledebourii* Bioss) در شرایط درون شیشه‌ای

اسماعیل چمنی*، نرگس کریمی قلعه‌تکی، مهدی محب‌الدینی و یونس پوربیرامی هیر

ایران، اردبیل، دانشگاه محقق اردبیلی، گروه علوم باغبانی

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۱۰/۰۳ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۱۱/۱۲



چکیده

سوسن چلچراغ، گیاهی زینتی، بومی کشور ایران می‌باشد که علاوه بر جنبه‌های زینتی، دارای مواد دارویی نیز می‌باشد. آزمایش حاضر به منظور بررسی تأثیر غلظت‌های مختلف بنزیل آدنین بر تولید برخی متابولیت‌های ثانویه در کشت درون شیشه‌ای سوسن چلچراغ صورت پذیرفت. برای این منظور، از محیط کشت MS حاوی یک میلی‌گرم بر لیتر NAA و غلظت‌های ۱، ۲، ۳ و ۴ میلی‌گرم بر لیتر BA مورد استفاده قرار گرفت. نتایج حاصل نشان داد که بیشترین تعداد و طول ریشه در تیمار شاهد و بیشترین شاخص‌های برگ (تعداد، سطح و طول)، ارتفاع گیاهچه، تعداد و قطر پیازچه، تعداد فلس، وزن تر، میزان کلروفیل، آنتوسیانین، فنول کل و فلاونوئیدها در محیط کشت حاوی یک میلی‌گرم بر لیتر BA به همراه یک میلی‌گرم بر لیتر NAA به دست آمد و با افزایش غلظت BA در محیط کشت، شاخص‌های مذکور کاهش یافتند. همچنین همبستگی مستقیمی بین میزان کلروفیل و تولید آنتوسیانین، فلاونوئیدها و فنول کل در سطح یک درصد مشاهده شد که نشانگر نقش فتوسنتز در تولید متابولیت‌های ثانویه در شرایط درون شیشه‌ای می‌باشد. به طور کلی، تعیین بهترین غلظت سایتوکینین و همچنین نسبت سایتوکینین به اکسین در محیط کشت، برای تولید متابولیت‌های ثانویه ضروری می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: بنزیل آدنین، سوسن چلچراغ، کشت درون شیشه‌ای، متابولیت‌های ثانویه

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۹۱۴۴۵۴۵۳۱۴، پست الکترونیکی: echamani@uma.ac.ir

مقدمه

دشوار است (۱۰). ترکیبات فنولی شامل دامنه‌ی گسترده‌ای از مواد دارای حلقه آروماتیکی با یک استخلاف هیدروکسیلی هستند. این ترکیبات توسط آنزیم‌های فنیل-آلانین و شیکیمات و از مسیر اسید شیکمیک تولید می‌گردند (۱۱). گیاهان می‌توانند از طریق القای آنزیم‌های دفاعی آنتی‌اکسیدان، به طیف وسیعی از تنش‌ها مانند نوسانات دمایی و رطوبتی، اشعه‌ی فرابنفش و حمله‌ی پاتوژن‌ها پاسخ دهند. به عنوان مثال زخمی شدن گیاه منجر به تولید گونه‌های فعال اکسیژن می‌گردد که توسط ترکیبات فنلی خنثی می‌شوند (۱۰).

تغییر یافتن شرایط محیطی به وسیله تنش منجر به فعال شدن آنزیم‌هایی می‌شود که تا قبل از آن فعال نبودند. این آنزیم‌ها مسیرهای متابولیسمی خاصی را راه‌اندازی می‌کنند که متابولیسم ثانویه نامیده می‌شود (۱۶). از گسترده‌ترین متابولیت‌های ثانویه می‌توان به فلاون‌ها و مشتقات آن‌ها (فلاونوئید) اشاره داشت، که در بسیاری از گیاهان به صورت آزاد و یا به صورت ترکیب با سایر گلیکوزیدها وجود دارند. فلاون‌ها و آنتوسیانین‌ها در شیره سلول‌های گیاهی به صورت محلول می‌باشند. یکی از دلایل انجام نشدن مطالعات کافی در این زمینه اینست که فلاون‌ها قابلیت انحلال در مواد مختلف را ندارند و استخراج آن‌ها

سلولی درخت صنوبر بازدارنده‌ی سنتز آنتوسیانین بود. به طور کلی واکنش گیاهان به تنظیم‌کننده‌های رشد به منظور تولید متابولیت‌ثانویه بسته به گونه گیاهی و نوع و غلظت هورمون به کار رفته دارد (۳۶). باتوجه به افزایش تقاضا برای استفاده از ترکیبات دارویی با منشأ گیاهی، شناسایی گیاهان حاوی ترکیبات دارویی و یافتن روش مناسب تولید این ترکیبات از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. از این‌رو پژوهش حاضر در راستای بررسی تولید متابولیت‌های ثانویه گل سوسن چلچراغ تحت تأثیر هورمون بنزیل آدنین و نفتالین استیک اسید در شرایط درون شیشه‌ای انجام شد، که می‌تواند به حذف مشکل مربوط به فصل رشد و زمان‌بر بودن تکثیر کمک کرده و از سوئی گامی در جهت جلوگیری از انقراض این گیاه با ارزش به منظور بررسی متابولیت‌های ثانویه آن، برداشته شود.

مواد و روشها

پیازهای سوسن چلچراغ بعد از خشک شدن بخش‌های هوایی، از روی‌شگاه طبیعی آن، واقع در منطقه خانقاه اردبیل جمع‌آوری و سپس بخش‌های آلوده و صدمه دیده جدا شد. برای ضدعفونی کردن ابتدا لایه‌های خارجی پیاز که قهوه‌ای رنگ و ناسالم بودند در زیر جریان آب حذف شدند. پس از رسیدن به قسمت‌های داخلی و فلس‌های سالم و آبدار، فلس‌ها یکی یکی از طبق پیاز جدا شدند (شکل ۱) و در داخل بشر حاوی توری قرار داده شده و به مدت یک ساعت زیر آب جاری همراه با چند قطره مایع ظرفشویی شسته شدند. سپس جهت از بین بردن آلودگی‌های میکروارگانیزی (قارچ و باکتری) از اتانول ۷۰ درصد به مدت ۳۰ ثانیه و محلول هیپوکلریت سدیم ۲ درصد به مدت ۲۰ دقیقه استفاده شد. پس از ضدعفونی کردن ریزنمونه‌ها در سه نوبت به مدت ۲، ۵ و ۱۵ دقیقه با آب مقطر ۲ بار استریل شسته شده و تا زمان کشت در آب مقطر دوبار استریل نگهداری شدند (شکل ۲).

سوسن چلچراغ با نام علمی *Lilium ledebourii* Biosس گیاهی تک‌لپه‌ای، دائمی، پیازی، علفی و از تیره سوسن-سانان و جنس سوسن بوده و در مناطقی از ایران نظیر خانقاه اردبیل و کلاردشت مازندران پراکنش داشته (۵ و ۱۵). تحقیقات روی گیاهان خانواده‌ی سوسن‌سانان نشان داده است که حاوی ترکیباتی مانند آلکالوئید، ترکیبات فنولی، ساپونین، استروئید، ویتامین و اسیدچرب می‌باشند (۲۵). این گیاه دارای متابولیت‌های ثانویه با ارزشی است که در صنعت دارویی، بهداشتی و غذایی مورد استفاده قرار می‌گیرد. سوسن چلچراغ حاوی فلاونوئید، اسیدهای چرب، ترکیبات آروماتیک فرار، اسید لینولئیک، اسیداولئیک، آلکالوئیدها، ساپونین و روغن‌های ضروری (ایزوپولگونول، پنتاکسن، ۳-متیل پنتاکسن، لینالول اکساید) می‌باشد (۲۲). می‌توان از روش‌های نوین تولید متابولیت‌های ثانویه از قبیل راهکارهای فناوری زیستی (بهره‌گیری از علوم مختلف مانند بیوشیمی، ژنتیک، بیوتکنولوژی و غیره) جهت افزایش تولید و بهره‌وری از گیاهان دارویی استفاده کرد (۳۸ و ۱). هر ماده‌ای که به عنوان آغازکننده یا ماده حد واسط در مسیر سنتز متابولیت‌های ثانویه نقش داشته باشد و به عنوان یک عامل مناسب برای افزایش عملکرد تولید متابولیت ثانویه استفاده گردد تحت عنوان محرک نام برده می‌شود (۳۶)، که می‌توان به تنظیم‌کننده‌های رشد مانند جاسمونات‌ها، اتیلن، اسیدنیتریک، سالیسیلیک‌اسید و موادی مانند هیدروپراکسیدها، Ca^{2+} (۳۷) و غیره اشاره داشت. تنظیم‌کننده‌های رشد اغلب یک فاکتور تعیین‌کننده در جهت تولید و تجمع متابولیت‌های ثانویه گیاهی در شرایط درون شیشه‌ای محسوب می‌شوند. نوع و غلظت اکسین (NAA) و سایتوکینین (BA) و یا نسبت بین این دو ماده تأثیر شگفت‌انگیزی روی رشد و تولید متابولیت‌های ثانویه گیاهی دارد. IAA و NAA باعث تسریع تولید بتاسیانین در هویج و همچنین تولید نیکوتین در کشت سوسپانسیون تنباکو شده است. کیتین نیز تولید آنتوسیانین را در *Haplopappus gracilus* تحریک کرد اما در کشت



شکل ۴- باززایی فلس‌های کشت شده



شکل ۱- جداسازی فلس‌های پیاز

سپس ریزنمونه‌های کشت شده در اتاقک رشد با دمای ۲۳± درجه سانتی‌گراد و مجهز به لامپ‌های فلورسنت با شدت نور ۲۰۰۰ لوکس (۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی) قرارگرفتند تا باززایی در آنها انجام گیرد. ۷۰ روز بعد از کشت از فلس‌های باززایی شده به منظور اعمال تیمار BA استفاده گردید (شکل ۵).



شکل ۲- ریزنمونه‌های ضدعفونی شده



شکل ۵- استفاده از پیازچه باززایی شده جهت اعمال تیمار

ریز نمونه‌های فلس برش داده شده (شکل ۳) در محیط کشت MS فاقد هورمون جهت باززایی کشت گردید (۳۲). (شکل ۴). لازم به ذکر است محیط کشت در ظروف آزمایشگاهی مورد نظر توزیع و با استفاده از اتوکلاو به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد استریل شد. مراحل کشت در زیر هود لامینار صورت گرفت.



شکل ۳- برش ریزنمونه‌ها

ریزنمونه‌های فلس حاصل از مرحله تکثیر ریزنمونه‌ها، در محیط کشت MS حاوی تیمار BA با غلظت‌های صفر، ۱، ۲، ۳ و ۴ میلی‌گرم بر لیتر و NAA با غلظت ۱ میلی‌گرم بر لیتر کشت گردید. بعد از گذشت ۳-۴ هفته، واکشت گیاه-چه‌های باززایی شده (شکل ۶)، انجام گردید. به منظور تهیه گیاهچه‌های مورد نیاز در راستای اندازه‌گیری متابولیت ثانویه، ۶ مرحله واکشت انجام شد. سپس گیاهچه‌ها به منظور اندازه‌گیری صفات مورفولوژیکی شامل تعداد، طول،

از کاغذ صافی واتمن شماره یک عبور داده شد و به مدت ۱۰ دقیقه در حمام آب گرم (مدل SD16) ۸۰ درجه سانتی-گراد قرار گرفت. بعد از سرد شدن عصاره‌ها، میزان جذب رنگ در سه طول موج ۲۷۰، ۳۰۰ و ۳۳۰ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر قرائت گردید. برای محاسبه غلظت فلاونوئید در هر طول موج به صورت مجزا از فرمول ضریب‌خاموشی استفاده شد (۹).

$$A = \epsilon bc$$

ϵ : ضریب خاموشی (۳۳۰۰۰ cmM)، b : عرض کووت (cm)، c : غلظت فلاونوئید (mol/l)، A : میزان جذب قرائت شده برای اندازه‌گیری میزان آنتوسیانین نیز ۰/۲ گرم از نمونه گیاهی وزن شده و درون هاون چینی قرار داده شده داخل ظرف حاوی یخ، سائیده شد و کم‌کم ۳ ml از متانول اسیدی (متانول/اسید کلریدریک: ۱/۹۹) به محتویات هاون چینی افزوده شد. بعد از سائیدن نمونه گیاهی و تهیه محلول یکنواخت از محتویات هاون، به مدت ۱۵ دقیقه و ۱۲۰۰۰ دور سانتریفیوژ گردید. سپس عصاره سانتریفیوژ شده از کاغذ صافی واتمن شماره یک عبور داده شد و به مدت ۲۴ ساعت در تاریکی و در دمای اتاق قرار گرفت. میزان جذب رنگ در طول موج ۵۵۰ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر قرائت گردید. برای محاسبه غلظت آنتوسیانین از فرمول بالا استفاده شد (۹). تجزیه واریانس داده‌ها با استفاده از نرم افزار آماری SPSS16 و در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۴ تکرار برای صفات کمی و ۶ تکرار برای ترکیبات آنتی‌اکسیدانی انجام گردید. مقایسه میانگین داده‌ها نیز با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ۵ درصد انجام شد.

نتایج

در کل نمودارهای این پژوهش غلظت‌های صفر، ۱، ۲، ۳ و ۴ میلی‌گرم در لیتر بنزیل آدینین به ترتیب با حروف اختصاری Control، BA1، BA2، BA3، BA4 و غلظت

سطح و کلروفیل برگ (از هر تکرار ۲ برگ و در هر برگ شاخص کلروفیل قسمت انتهایی، وسط و قسمت ابتدایی برگ با استفاده از دستگاه کلروفیل سنج (Spad-502) اندازه‌گیری شد)، تعداد و طول ریشه، تعداد و قطر پیاز، تعداد فلس، وزن تر، ارتفاع گیاهچه و ترکیبات آنتی‌اکسیدان (فنول، فلاونوئید و آنتوسیانین) مورد ارزیابی قرار گرفتند.



شکل ۶- باززایی گیاهچه‌های تیمار شده

اندازه‌گیری محتوای فنول موجود در عصاره گیاه براساس روش ابراهیم‌زاده و همکاران (۲۱)، با کمی تغییر صورت گرفت. برای این منظور معرف فولین سیوکالتیو ده برابر رقیق شده به ۰/۱ ml از عصاره گیاهی سانتریفیوژ شده همراه با ۱/۴ ml کربنات سدیم ۷ درصد اضافه گردید. محلول حاصل بعد از همزدن، به مدت نیم ساعت در تاریکی و در دمای اتاق نگهداری شد. سپس میزان جذب در طول موج ۷۶۵ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر قرائت شد. نمونه شاهد نیز با جایگزین کردن ۰/۱ ml آب مقطر به جای عصاره گیاهی تهیه گردید. به منظور رسم منحنی استاندارد و معادله رگرسیون ترکیب فنولی اسیدگالیک استفاده گردید. به منظور اندازه‌گیری میزان فلاونوئید ۰/۲ گرم از نمونه گیاهی وزن شده و درون هاون چینی روی ظرف حاوی یخ، له گردید و کم‌کم ۳ ml از اتانول اسیدی (اتانول/اسید استیک: ۱/۹۹) به محتویات هاون چینی اضافه شد بعد از سائیدن نمونه گیاهی و تهیه محلول یکنواخت از محتویات هاون، به مدت ۱۵ دقیقه و ۱۲۰۰۰ دور سانتریفیوژ شد. سپس عصاره سانتریفیوژ شده

۱ میلی‌گرم در لیتر نفتالین استیک اسید با حرف اختصاری NAA نشان داده شده است. نتایج حاصل از تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد بین غلظت‌های مختلف بنزیل آدنین، از نظر صفات تعداد ریشه، طول ریشه، تعداد برگ، طول برگ، شاخص کلروفیل، سطح برگ و ارتفاع گیاهچه، تعداد پیاز، قطر پیاز، تعداد فلس و وزن تر گیاهچه‌های باززایی شده سوسن چلچراغ، اختلاف معنی‌داری وجود داشت (جدول ۱ و ۲).

جدول ۱- تجزیه واریانس تأثیر تیمار بنزیل آدنین بر صفات مورفولوژیکی سوسن چلچراغ

میانگین مربعات						
منابع تغییرات	درجه آزادی	تعداد ریشه	طول ریشه	تعداد برگ	طول برگ	تعداد پیاز
بنزیل آدنین	۴	۷۷/۲۴**	۴۹۲/۳۴۶**	۳۶/۲۴۸**	۹۷/۴۱۰**	۱/۹۰۹*
خطا	۱۵	۰/۷۱۲	۱۳/۱۵۷	۱/۱۲۲	۵/۲۲	۰/۶۷۵
ضرب تغییرات	۷/۹۹	۲۷/۹۰	۱۳/۶۵	۷/۲۰	۱۳/۴۸	۲۶/۵

* و ** به ترتیب معنی‌دار در سطح احتمال ۵ و ۱ درصد

جدول ۲- ادامه تجزیه واریانس تأثیر تیمار بنزیل آدنین بر صفات مورفولوژیکی سوسن چلچراغ

میانگین مربعات						
منابع تغییرات	درجه آزادی	تعداد فلس	شاخص کلروفیل	سطح برگ	وزن تر	ارتفاع گیاهچه
بنزیل آدنین	۴	۱۸/۶۹۷*	۱/۸۸۶**	۹/۳۰۴**	۵/۱۸۵*	۳۰۹/۰۵**
خطا	۱۵	۳/۵۹۶	۰/۲۴۷	۱/۰۴۴	۱/۲۵۷	۸/۵۸
ضرب تغییرات	۸/۹۱	۳/۲۹	۱۴/۵۷	۶/۵۱	۸/۶۲	

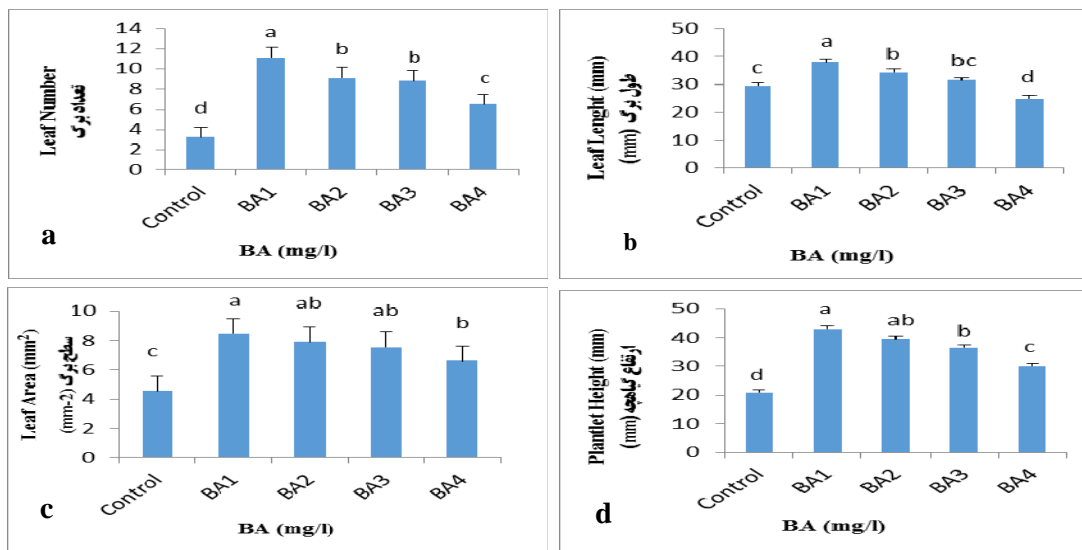
* و ** به ترتیب معنی‌دار در سطح احتمال ۵ و ۱ درصد

از تیمار $1 \text{ NAAmg l}^{-1} + 4 \text{ mg l}^{-1} \text{ BA}$ به دست آمد (نمودار ۱- b). براساس مقایسه میانگین داده‌ها بیشترین تعداد پیاز از غلظت $1 \text{ NAAmg l}^{-1} + 1 \text{ mg l}^{-1} \text{ BA}$ به دست آمد (نمودار ۳- b). مقایسه میانگین داده‌ها نشان داد. بیشترین قطر پیاز از غلظت $1 \text{ NAAmg l}^{-1} + 1 \text{ mg l}^{-1} \text{ BA}$ به دست آمد (نمودار ۳- a). براساس مقایسه میانگین داده‌ها بیشترین تعداد فلس از غلظت $1 \text{ NAAmg l}^{-1} + 1 \text{ mg l}^{-1} \text{ BA}$ حاصل گردید و اختلاف معنی‌داری با شاهد نداشت. سایر غلظت‌های بنزیل آدنین باعث کاهش تعداد فلس شد (نمودار ۳- d). مقایسه میانگین داده‌ها نشان داد بیشترین سطح برگ مربوط به غلظت $1 \text{ NAAmg l}^{-1} + 1 \text{ mg l}^{-1} \text{ BA}$ می‌باشد. سایر غلظت‌های بنزیل آدنین اختلاف معنی‌داری با شاهد داشتند (نمودار ۱- c). همچنین بیشترین شاخص کلروفیل را غلظت $1 \text{ NAAmg l}^{-1} + 1 \text{ mg l}^{-1} \text{ BA}$ به خود اختصاص داد و سایر غلظت‌های بنزیل آدنین اختلاف معنی‌داری با شاهد نداشتند و کمترین محتوای کلروفیل، از غلظت 1 NAAmg l^{-1}

مقایسه میانگین داده‌ها نشان داد بیشترین تعداد ریشه را تیمار شاهد حاوی 1 NAAmg l^{-1} به خود اختصاص داد. کمترین تعداد ریشه نیز از غلظت $1 \text{ NAAmg l}^{-1} + 1 \text{ mg l}^{-1} \text{ BA}$ حاصل گردید (نمودار ۲- a). بیشترین طول ریشه نیز از تیمار شاهد به دست آمد. کمترین طول ریشه از غلظت $1 \text{ NAAmg l}^{-1} + 1 \text{ mg l}^{-1} \text{ BA}$ حاصل شد (نمودار ۲- b). بر اساس مقایسه میانگین داده‌ها غلظت 1 mg l^{-1} بنزیل آدنین بیشترین تعداد برگ را به خود اختصاص داد. غلظت‌های 1 mg l^{-1} ، 2 mg l^{-1} و 3 mg l^{-1} و $4 \text{ mg l}^{-1} \text{ BA} + 1 \text{ NAAmg l}^{-1}$ نیز باعث افزایش تعداد برگ شد و از این لحاظ اختلاف معنی‌داری با شاهد داشتند. کمترین تعداد برگ از تیمار شاهد حاصل گردید (نمودار ۱- a). براساس مقایسه میانگین داده‌ها بیشترین طول برگ را تیمار $1 \text{ NAAmg l}^{-1} + 1 \text{ mg l}^{-1} \text{ BA}$ به خود اختصاص داد. $1 \text{ NAAmg l}^{-1} + 2 \text{ mg l}^{-1} \text{ BA}$ نیز باعث افزایش طول برگ شد و از این نظر اختلاف معنی‌داری با شاهد داشت. کمترین طول برگ

میانگین داده‌ها بیشترین ارتفاع گیاهچه را غلظت 1 mg l^{-1} NAAmg داد. همچنین سایر غلظت‌های بنزیل‌آدنین باعث افزایش ارتفاع گیاهچه شدند و از این لحاظ اختلاف معنی‌داری با شاهد داشتند (نمودار ۱- d).

1 mg l^{-1} BA حاصل شد (نمودار ۴- b). مقایسه میانگین داده‌ها نشان داد بیشترین وزن‌تر را غلظت 1 mg l^{-1} NAAmg به خود اختصاص داد و نسبت به شاهد اختلاف معنی‌داری نداشت. سایر غلظت‌های بنزیل‌آدنین باعث کاهش وزن‌تر شدند (نمودار ۳- c). براساس مقایسه



نمودار ۱ - تأثیر غلظت‌های مختلف BA بر تعداد برگ (a)، طول برگ (b)، سطح برگ (c) و ارتفاع گیاهچه (d)

داشتند. کمترین میزان فنول از تیمار شاهد به دست آمد (نمودار ۴- a). نتایج حاصل از تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد بین غلظت‌های مختلف بنزیل‌آدنین برای صفت غلظت آنتوسیانین گیاهچه‌های باززایی شده سوسن چلچراغ، اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال ۱ درصد وجود داشت (جدول ۳).

نتایج حاصل از تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد بین غلظت‌های مختلف بنزیل‌آدنین در صفت محتوای فنول کل گیاهچه‌های باززایی شده سوسن چلچراغ، اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال ۱ درصد وجود دارد (جدول ۳). بیشترین محتوای فنول از غلظت 1 mg l^{-1} بنزیل‌آدنین حاصل شد و از این لحاظ اختلاف معنی‌داری با شاهد

جدول ۳- تجزیه واریانس تأثیر بنزیل‌آدنین بر ترکیبات آنتی‌اکسیدانی سوسن چلچراغ

میانگین مربعات					منابع تغییرات
فلاونوئید ۳۳۰	فلاونوئید ۳۰۰	فلاونوئید ۲۷۰	آنتوسیانین	فنول	
۲۶/۲۶۷**	۱۱/۱۱۵*	۱/۴۸۲**	۲/۹۲۵**	۳۲۶۰/۲۴۳**	۴
۰/۴۴۵	۳/۰۴۷	۰/۰۸۸	۰/۰۸۶	۳۵/۱۱۴	۲۵
۱۷/۰۶	۲۱/۴۷	۲۲/۹۲	۲۷/۶۶	۲۶/۱۸	ضریب تغییرات (%)

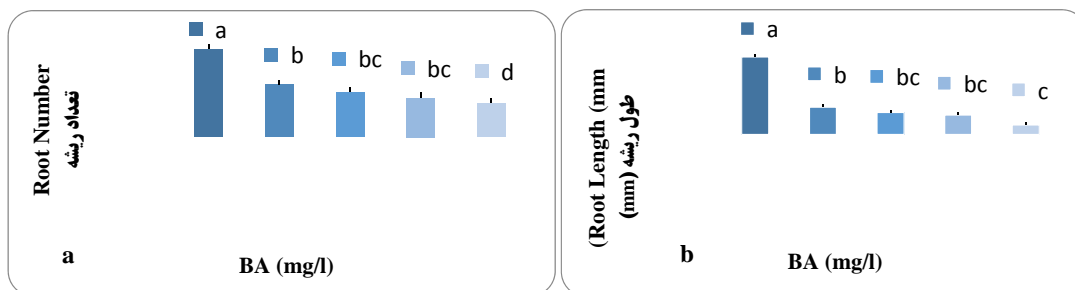
* و ** به ترتیب معنی‌دار در سطح احتمال ۵ و ۱ درصد

آنتوسیان کمتری نسبت به شاهد داشتند (نمودار ۵- a). براساس نتایج حاصل از تجزیه واریانس داده‌ها، تأثیر غلظت‌های مختلف بنزیل‌آدنین بر غلظت‌های فلاونوئید در

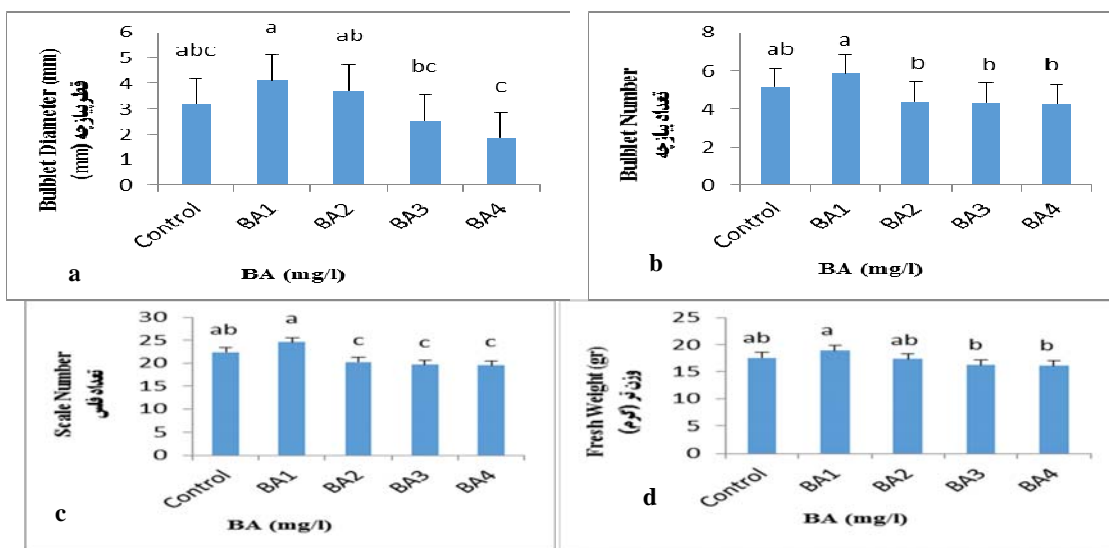
براساس مقایسه میانگین داده‌ها بیشترین غلظت آنتوسیانین از غلظت یک میلی‌گرم در لیتر بنزیل‌آدنین حاصل شد و سایر غلظت‌های بنزیل‌آدنین به‌طور معنی‌داری محتوی

فلاونوئید در هر سه طول موج به کار رفته از محیط حاوی 1 mg l^{-1} بنزیل آدنین حاصل گردید. همچنین کمترین غلظت فلاونوئید در هر سه طول موج به کار رفته، از تیمار شاهد حاصل گردید (نمودار ۵- b, c and d).

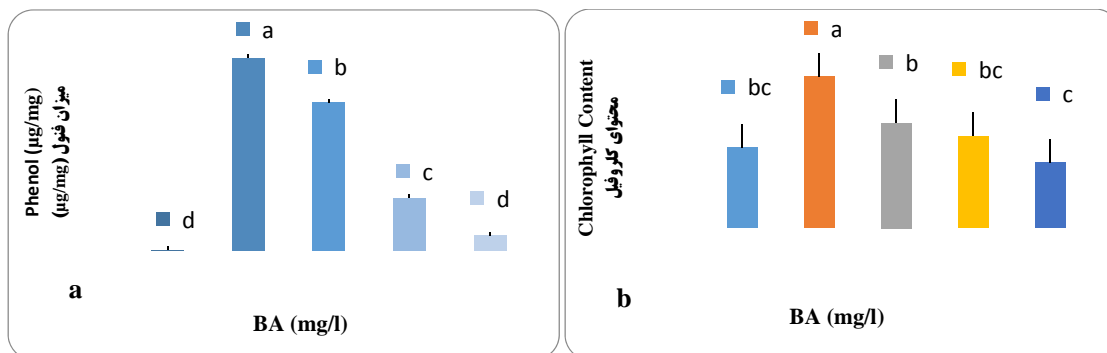
طول موج ۲۷۰، ۳۳۰ و ۳۰۰ نانومتر به ترتیب اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال ۱ درصد و ۵ درصد و ۱ درصد وجود داشت (جدول ۳). بیشترین میزان فلاونوئید در طول موج ۳۰۰ نانومتر قرائت گردید و بیشترین غلظت



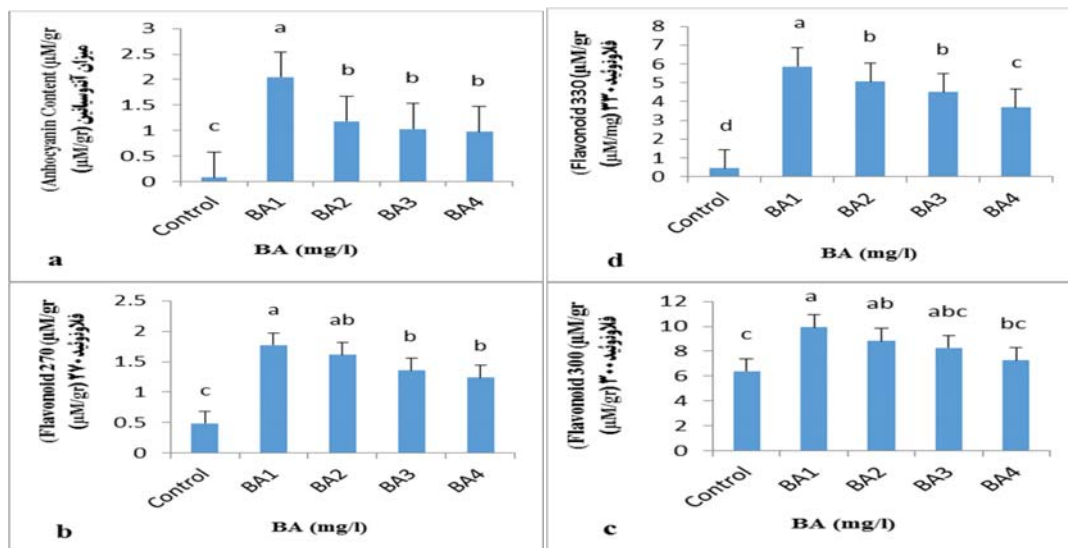
نمودار ۲- تأثیر غلظت‌های مختلف BA بر صفات تعداد ریشه (a) و طول ریشه (b)



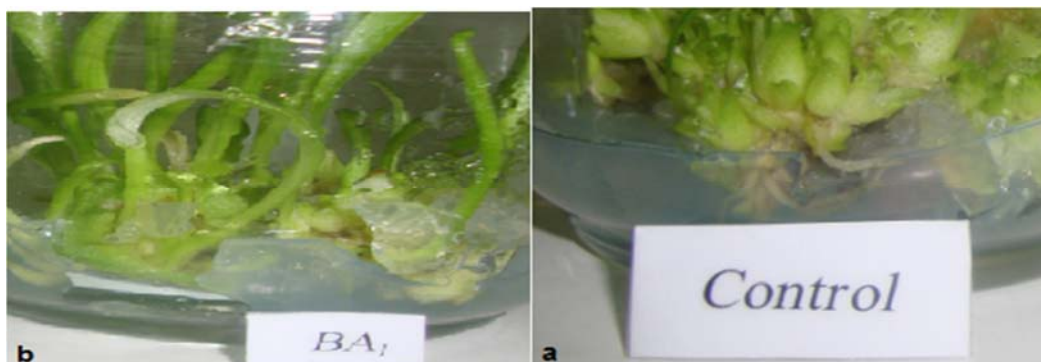
نمودار ۳- تأثیر غلظت‌های مختلف BA بر قطر پیازچه (a)، تعداد پیازچه (b)، وزن تر (c) و تعداد فلس (d) گیاهان باززایی شده



نمودار ۴- تأثیر غلظت‌های مختلف BA بر میزان فنول کل (a) و محتوای کلروفیل کل (b) در گیاهچه‌های باززایی شده



نمودار ۵- تأثیر BA بر میزان آنتوسیانین (a) و فلاونوئید در طول موج‌های ۲۷۰ (b)، ۳۰۰ (c) و ۳۳۰ (d) نانومتر



شکل ۷- گیاهچه‌های به دست آمده از تیمار شاهد (a) و تیمار با یک میلی‌گرم بر لیتر بنزیل آدنین (b)

صفات مورد مطالعه نشان داد بالاترین همبستگی ($P < 0.0001$) را صفات تعداد برگ و ارتفاع گیاهچه با غلظت فلاونوئید اندازه‌گیری شده در طول موج ۳۳۰ نانومتر به خود اختصاص دادند. طبق نتایج بررسی همبستگی بین ترکیبات آنتی‌اکسیدان، همبستگی مثبت و معنی‌داری بین غلظت فلاونوئید در سه طول موج مورد بررسی با غلظت آنتوسیانین وجود داشت. همچنین همبستگی مثبت و معنی‌داری ($P < 0.0001$) بین محتوای فنول، آنتوسیانین و غلظت فلاونوئید (در طول موج‌های ۳۰۰ و ۳۳۰ نانومتر) مشاهده شد. باتوجه به این که ترکیبات آنتی‌اکسیدانی مورد ارزیابی از خانواده فنولیک‌ها (فلاوون‌ها، فنول، فلاونوئید) می‌باشند (۱۵) قابل توجه است که همبستگی مثبتی با یکدیگر

ضرایب همبستگی صفات مورد مطالعه (جدول ۴) نشان داد که بین آنتوسیانین و فلاونوئید اندازه‌گیری شده در طول موج‌های مختلف با تعداد پیاز، قطر پیاز و تعداد فلس همبستگی معنی‌داری وجود نداشت. لازم به ذکر است ضرایب همبستگی مثبت و معنی‌داری ($P < 0.0001$) بین سطح برگ و ارتفاع گیاهچه با ترکیبات آنتی‌اکسیدانی مشاهده شد. بین صفات تعداد و طول ریشه با تعداد برگ، تعداد و قطر پیاز، تعداد فلس، محتوای فنول و فلاونوئید در طول موج ۳۳۰ نانومتر همبستگی معنی‌داری وجود نداشت. بین صفات تعداد و طول ریشه و محتوای فنول و فلاونوئید در طول موج‌های ۲۷۰ و ۳۰۰ نانومتر همبستگی منفی و معنی‌داری ($P < 0.0001$) مشاهده شد. ضرایب همبستگی

داشته باشند، بین غلظت فلاونوئید در طول موج ۲۷۰ نانومتر با محتوای فنول، آنتوسیانین و غلظت فلاونوئید (در طول موج‌های ۳۰۰ و ۳۳۰ نانومتر) نیز همبستگی وجود دارد که می‌تواند ناشی از خطای آزمایشی باشد. بین

جدول ۴- ضرایب همبستگی صفات مورد مطالعه

صفت	تعداد ریشه	طول ریشه	تعداد برگ	طول برگ	تعداد پیاز	قطر پیاز	تعداد فلس	سطح برگ
تعداد ریشه	۱							
طول ریشه	۰/۹۲۹**	۱						
تعداد برگ	-۰/۵۸۶**	-۰/۵۷۷**	۱					
طول برگ	۰/۰۶۲ ^{ns}	-۰/۱۲ ^{ns}	۰/۶۶۱**	۱				
تعداد پیاز	۰/۳۸۲ ^{ns}	۰/۳۲۰ ^{ns}	۰/۰۹۶ ^{ns}	۰/۴۳۶ ^{ns}	۱			
قطر پیاز	۰/۲۷۵ ^{ns}	۰/۲۵۹ ^{ns}	۰/۴۵۶*	۰/۶۴۸**	۰/۲۳۰	۱		
تعداد فلس	۰/۳۸۳ ^{ns}	۰/۳۲۱ ^{ns}	۰/۱۸۸ ^{ns}	۰/۵۸۱**	۰/۶۳۷**	۰/۵۳۰*	۱	
سطح برگ	-۰/۵۷۴**	-۰/۵۸۳**	۰/۷۵۹**	۰/۳۸۳ ^{ns}	۰/۰۷۷ ^{ns}	۰/۱۴۵ ^{ns}	۰/۰۴۲ ^{ns}	۱
مقدار کلروفیل	۰/۰۵۲ ^{ns}	-۰/۰۵۸ ^{ns}	۰/۵۹۹**	۰/۷۳۵**	۰/۴۱۴ ^{ns}	۰/۴۷۴*	۰/۴۵۸*	۰/۴۷۹*
وزن تر	۰/۳۲۵ ^{ns}	۰/۲۳۴ ^{ns}	۰/۲۴۹ ^{ns}	۰/۵۱۳*	۰/۶۰۵**	۰/۵۰۶*	۰/۶۶۰**	۰/۰۸۹ ^{ns}
ارتفاع گیاه	-۰/۵۸**	-۰/۶۰۶**	۰/۹۱۵**	۰/۶۶۳**	۰/۰۶۲ ^{ns}	۰/۳۴۲ ^{ns}	۰/۰۲۰ ^{ns}	۰/۷۴۶**
فنول	-۰/۲۳ ^{ns}	-۰/۳۴۶ ^{ns}	۰/۷۷۵**	۰/۷۸۶**	۰/۳۲۹ ^{ns}	۰/۶۰۳**	۰/۳۴۳ ^{ns}	۰/۶۵۷**
آنتوسیانین	-۰/۵۶۱*	-۰/۶۱۷**	۰/۸۱۵**	۰/۵۴۹*	۰/۲۴۱ ^{ns}	۰/۲۷۵ ^{ns}	۰/۲۸۶ ^{ns}	۰/۷۹۶**
فلاونوئید ۲۷۰	-۰/۹۱۰**	-۰/۸۷۶**	۰/۶۱۴**	-۰/۰۴۹ ^{ns}	-۰/۲۵۱ ^{ns}	-۰/۲۵۳ ^{ns}	۰/۲۸۳ ^{ns}	۰/۶۶۳**
فلاونوئید ۳۰۰	-۰/۳۳۳ ^{ns}	-۰/۴۰۴ ^{ns}	۰/۵۵۲*	۰/۳۱۸	۰/۱۲۳ ^{ns}	۰/۱۹۷ ^{ns}	۰/۱۲۰ ^{ns}	۰/۴۶۷*
فلاونوئید ۳۳۰	-۰/۷۴۳**	-۰/۷۵۸**	۰/۸۹۷**	۰/۴۹۲*	۰/۰۱۹ ^{ns}	۰/۱۶۸ ^{ns}	۰/۰۳۶ ^{ns}	۸۶۰**

ns، * و ** به ترتیب غیرمعنی دار و معنی دار در سطح احتمال ۵ و ۱ درصد

جدول ۵- ادامه ضرایب همبستگی صفات مورد مطالعه

صفت	مقدار کلروفیل	وزن تر	ارتفاع گیاه	فنول	آنتوسیانین	فلاونوئید ۲۷۰	فلاونوئید ۳۰۰	فلاونوئید ۳۳۰
مقدار کلروفیل	۱							
وزن تر	۰/۵۳۸*	۱						
ارتفاع گیاه	۰/۶۰۰**	۰/۱۳۳ ^{ns}	۱					
فنول	۰/۶۷۸**	۰/۴۴۳ ^{ns}	۰/۸۰۸**	۱				
آنتوسیانین	۰/۶۳۲**	۰/۲۵۲ ^{ns}	۰/۸۲۹**	۰/۷۷۰**	۱			
فلاونوئید ۲۷۰	۰/۰۶۷ ^{ns}	-۰/۱۹۲ ^{ns}	۰/۵۵۹*	۰/۲۵۹ ^{ns}	۰/۶۲۸**	۱		
فلاونوئید ۳۰۰	۰/۳۸۲	-۰/۰۶۳ ^{ns}	۰/۵۹۳**	۰/۵۴۴*	۰/۵۵۶*	۰/۲۶۳ ^{ns}	۱	
فلاونوئید ۳۳۰	۰/۴۹۳*	۰/۰۵۴ ^{ns}	۰/۸۹۷**	۰/۷۴۱**	۰/۸۲۵**	۰/۷۱۴**	۰/۶۰۹**	۱

ns، * و ** به ترتیب غیرمعنی دار و معنی دار در سطح احتمال ۵ و ۱ درصد

بحث و نتیجه گیری

کشت‌ها حاوی یک میلی‌گرم NAA بود) به دست آمد. در پژوهش پاداشت دهکائی و همکاران (۵) مشخص شد که با افزایش غلظت NAA در گیاهچه‌های سوسن چلچراغ،

در پژوهش حاضر بیشترین تعداد و طول ریشه در گیاهچه‌های باززایی شده از تیمار شاهد (کلیه محیط

گسترده‌ای در کشت درون شیشه‌ای گونه‌های جنس سوسن استفاده شده است که به خاطر تأثیرات آشکار آن بر تشکیل شاخساره‌های نابجا در این گیاه می‌باشد. بیشترین میزان تولید شاخساره از ریزنمونه‌های *L. pumilum* در محیط کشت حاوی NAA و BA به دست آمده است (۲۶). هی-هان و همکاران (۲۴) گزارش کردند غلظت ۲/۲ میکرومولار بنزیل آدنین به منظور شاخه‌زایی هیبریدهای شرقی سوسن مطلوب بود. این گزارش با نتایج حاصل از پژوهش حاضر هم‌خوانی ندارد که احتمالاً به دلیل تفاوت ژنتیکی و میزان هورمون‌های درون‌زای این دو گیاه می‌باشد و یا این‌که در پژوهش حاضر تمامی تیمارها همراه با یک میلی‌گرم NAA اعمال گردیده است. در بررسی ریز ازدیادی *L. longiflorum* در محیط مایع مشخص شد که با افزایش غلظت BA، میزان تولید شاخساره افزایش می‌یابد، اما طول شاخساره و وزن تر در هر پیازچه کاهش می‌یابد (۲۳) که با نتایج پژوهش حاضر مطابقت دارد.

براساس یافته‌های این پژوهش تعداد و قطر پیازچه و همچنین تعداد فلس در هر پیازچه تنها در محیط کشت حاوی یک میلی‌گرم بر لیتر BA از تیمار شاهد بیشتر بود ولی تفاوت معنی‌داری نداشت و در سایر تیمارها، از تیمار شاهد کم‌تر می‌باشند. در پژوهش معمار مشرقی و همکاران (۱۲)، بیشترین تعداد پیازچه و ریشه‌زایی در تیمار شاهد (بدون تنظیم‌کننده رشد) به دست آمد و با افزایش غلظت BAP شاخص‌های مذکور کاهش یافت. همچنین بیشترین میزان وزن پیازچه در تیمار ۰/۱ میلی‌گرم BAP به همراه ۰/۰۱ میلی‌گرم NAA به دست آمد. در تحقیق دیگری، بیشترین تعداد پیازچه و وزن پیازچه در محیط کشت فاقد تنظیم‌کننده رشد به دست آمد و افزایش غلظت BA، سبب کاهش این شاخص‌ها شد (۶). آزادی و مجتهدی (۲)، بهترین محیط کشت برای دست‌یابی به حداکثر قطر پیازچه، وزن پیازچه، تعداد فلس در هر پیازچه، تعداد و طول ریشه را محیط کشت حاوی ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر BA به همراه ۰/۰۱ میلی‌گرم NAA گزارش کردند. گزارش‌های

میزان ریشه‌زایی افزایش یافت و بیشترین تعداد ریشه در تیمار ۱ میلی‌گرم بر لیتر NAA به دست آمد. تاتاری و ونوسفادرانی و همکاران (۶) بیان کردند بیشترین تعداد ریشه در سوسن چلچراغ، از محیط حاوی ۰/۱ میلی‌گرم NAA حاصل گردید. گزارش‌های اخیر با نتایج به دست آمده در این تحقیق مطابقت دارند. نات (۳۳) گزارش کرد که ریشه‌زایی شاخساره‌های سوسن عید پاک در شرایط درون شیشه‌ای بدون حضور NAA نیز صورت می‌گیرد، ولی با افزایش غلظت NAA، میزان ریشه‌زایی افزایش می‌یابد. با افزایش غلظت BA، تعداد و طول ریشه در سوسن چلچراغ کاهش می‌یابد. کاربرد سایتوکینین سبب کاهش در اندازه مریستم ریشه به خاطر کاهش تصاعدی در تعداد سلول‌های مریستمی می‌گردد و در نتیجه میزان ریشه‌زایی کاهش می‌یابد (۳۱). آزادی و خوشخوی (۱۵) گزارش کردند که طویل‌ترین ریشه از کشت فلس سوسن چلچراغ جمع‌آوری شده از منطقه داماش گیلان در محیط کشت حاوی ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر NAA و ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر BA به دست آمد. نتایج پژوهش حاضر با گزارش ذکر شده مغایر بود که می‌تواند به دلیل سن، موقعیت فلس و محل جمع‌آوری گیاه باشد، زیرا سن فلس و ژنوتیپ نیز، می‌تواند از عوامل تأثیرگذار بر میزان هورمون‌های درون‌زا باشد (۲۸ و ۶).

براساس یافته‌های تحقیق حاضر بیشترین تعداد برگ و طول برگ در محیط کشت حاوی یک میلی‌گرم BA به همراه یک میلی‌گرم NAA حاصل شد که می‌تواند به دلیل تأثیر سایتوکینین‌ها در حذف غالبیت انتهایی و تسهیل پرآوری شاخساره باشد (۲۶). وجود سایتوکینین‌ها برای شاخساره‌زایی در محیط کشت ضروری است و در میخک مشخص شده است که BA نسبت به سایر سایتوکینین‌ها تأثیر بهتری در این زمینه دارد، چون گیاه BA را نسبت به سایر سایتوکینین‌ها راحت‌تر مصرف می‌کند و همچنین BA در تحریک تولید هورمون‌های درونی مانند زآتین نقش دارد (۳۹). در بین انواع سایتوکینین‌ها، بنزیل آدنین به طور

کلروفیل می‌گردند (۱۸). سایتوکینین‌ها در حضور نور سبب افزایش بیوسنتز ۵-آمینو لولینیک اسید (ALA) می‌شوند و از آنجایی که ALA پیش ماده تولید تتراپیرول است، افزایش ALA سبب افزایش تولید کلروفیل می‌گردد (۳۵). احتمالاً افزایش محتوای کلروفیل در محیط‌های حاوی BA، نسبت به تیمار شاهد که فاقد سایتوکینین است، به همین دلیل می‌باشد. هرچند از طرفی کاهش محتوای کلروفیل با افزایش غلظت سایتوکینین را می‌توان به ایجاد سمیت در غلظت‌های بالا نسبت داد (۸). کاراليجا و همکاران (۲۷)، کاهش محتوای کلروفیل a، b و کل را در گیاهچه‌های باززایی شده از فلس‌های *L. bosniacum* و *L. cattaniae* در محیط کشت‌های حاوی BA و 2، 4-D نسبت به تیمار شاهد گزارش کردند. کاهش شاخص کلروفیل در گیاهچه‌های باززایی شده موز در محیط کشت حاوی BA نسبت به تیمار بدون هورمون نیز گزارش شده است (۱۴). این گزارش‌ها، با نتایج پژوهش حاضر مطابقت دارد. هر چند در نتایج مربوط به مطالعه جمشیدی و همکاران (۷) استفاده از تنظیم‌کننده‌های رشد سایتوکینین و اکسین در جلبک *Chlorella sorokiniana* منجر به افزایش رنگیزه-های فتوسنتزی شده و میزان کلروفیل را افزایش داده است. براساس نمودارهای ۴ و ۵، کاربرد BA در تمامی غلظت‌ها سبب افزایش میزان فلاونوئید، فنول کل و آنتوسیانین در گیاهچه‌های باززایی شده نسبت به تیمار شاهد گشته است و با افزایش غلظت BA، میزان این ترکیبات کاهش می‌یابد. در مطالعه کومار و همکاران (۲۹) بر تولید متابولیت‌های ثانویه در کشت کالوس *Heliotropium indicum* مشخص شد که بیشترین میزان فنول کل و فلاونوئید در محیط کشت حاوی ۲ میلی‌گرم برلیتر NAA به همراه ۰/۵ میلی‌گرم BA حاصل می‌شود و محیط کشت‌هایی که تنها حاوی اکسین (NAA یا 2، 4-D) می‌باشند کم‌ترین میزان این ترکیبات را تولید می‌کنند. بیشترین میزان ترکیبات فنولی سالیسیلیک اسید و هیدروکسی بنزوئیک اسید در کشت درون شیشه‌ای *Aronia melanocarpa* در محیط

آخرین با نتایج این پژوهش مطابقت دارد. پاداشت دهکائی و همکاران (۴) دریافتند که غلظت‌های مختلف BA بر تعداد سوخک و ریشه تشکیل شده در سوسن چلچراغ تأثیر ندارد که با نتایج این پژوهش همخوانی ندارد، اما با افزایش غلظت NAA، این شاخص‌ها افزایش می‌یابد. همچنین در بررسی تأثیر توأم IAA و BA بر باززایی درون شیشه‌ای *L. longiflorum* مشخص شد که با افزایش غلظت BA در محیط‌های با میزان IAA یکسان، قطر پیازچه و وزن تر افزایش می‌یابد که با نتایج این پژوهش در تضاد است (۲۳). اما لیان و همکاران (۳۰) در سوسن شرقی رقم کازابلانکا و آزادی و خوشخوی (۱۵) در سوسن چلچراغ، اثر متقابل NAA و BA را بر تعداد پیازچه و وزن تر پیازچه معنی‌دار گزارش کردند، به طوری که بیشترین شاخص‌ها در محیط حاوی ۰/۱ میلی‌گرم NAA و ۰/۱ میلی‌گرم BA به دست آمد. البته باید توجه داشت در تحقیق حاضر، صفات تعداد پیازچه، تعداد فلس در هر پیازچه و وزن تر تنها در غلظت یک میلی‌گرم بر لیتر BA نسبت به سایر غلظت‌ها متفاوت است و در سایر غلظت‌ها تفاوتی دیده نمی‌شود. بر این اساس به نظر می‌رسد که ریزنمونه‌های سوسن چلچراغ حاوی سایتوکینین درونی کافی می‌باشند و به سایتوکینین خارجی نیاز نداشته و یا نیاز کمی دارند و غلظت‌های بالای آن، سبب برهم خوردن تعادل هورمونی می‌گردد (۶). از طرفی اثرات متفاوت BA بر تشکیل پیازچه ممکن است به علت تفاوت‌های فیزیولوژیکی و مراحل رشدی باشد (۳۴)، بنابراین با قطعیت نمی‌توان نیاز یا عدم نیاز ریزنمونه‌های سوسن چلچراغ را به سایتوکینین تعیین نمود.

بیشترین محتوای کلروفیل کل در گیاهچه‌های باززایی شده سوسن چلچراغ در محیط کشت حاوی یک میلی‌گرم بر لیتر BA به دست آمد و با افزایش غلظت BA، شاخص کلروفیل روند کاهشی نشان داد. سایتوکینین‌ها از طریق افزایش بیان ژن‌های آنزیم‌های دخیل در بیوسنتز کلروفیل مانند پروتوکلروفیلید اکسیدوردوکتاز، سبب افزایش تولید

می‌توانند از طریق مسدود کردن انتقال نیترات از طریق تحریک بیوستتزی یا متابولیسم سایتوکینین‌های درونی، تولید متابولیت‌های ثانویه از جمله فنول‌ها را افزایش دهد (۳۵). بیان ژن‌های درگیر در مسیرهای تولید متابولیت‌های ثانویه مانند مسیر شیکیمات و فلاونوئید، می‌توانند توسط نیترات سرکوب شوند، در حالی که انتقال‌دهنده‌های برخی عناصر غذایی مانند نیترات، آمونیوم، سولفات و فسفات می‌تواند توسط سایتوکینین‌ها سرکوب گردد.

براساس نتایج به دست آمده از همبستگی صفات (جدول ۵)، مشخص می‌شود که شاخص کلروفیل با ارتفاع گیاهچه، میزان فنول کل، آنتوسیانین، صفات وزن تر، فلاونوئید همبستگی مستقیم دارد. با افزایش غلظت BA در محیط کشت، شاخص کلروفیل کاهش می‌یابد (نمودار b-۴) و به دنبال آن شاخص‌های مذکور نیز کاهش می‌یابد. با کاهش شاخص کلروفیل، میزان فتوستتزی و تولید قندها در گیاه کاهش می‌یابد و از آنجایی که قندها، برای فعالیت‌های گیاه به عنوان منبع انرژی ضروری می‌باشند، بنابراین کاهش میزان فتوستتزی، سبب کاهش تولید فنول، فلاونوئید، آنتوسیانین و همچنین وزن تر و ارتفاع گیاهچه می‌گردد. به طور کلی، متابولیت‌های ثانویه از قبیل فنول‌ها و فلاونوئیدها نقش‌های حیاتی در ریز ازدیادی برخی گونه‌ها ایفا می‌کنند (۱۴). بر طبق فرضیه بوئر و همکاران (۱۷)، ریشه‌زایی در حضور برخی از انواع فلاونوئیدها افزایش می‌یابد؛ اما در پژوهش حاضر شاخص‌های تعداد و طول ریشه با فلاونوئیدها همبستگی منفی دارد (جدول ۴). این بدان معنی است که با افزایش غلظت فلاونوئیدها، میزان ریشه‌زایی کاهش می‌یابد و این در تضاد با نظریه بوئر و همکاران (۱۷) می‌باشد.

باتوجه به نتایج این پژوهش، می‌توان چنین عنوان کرد که بهترین غلظت BA برای دست‌یابی به بهترین شاخص‌های مورفولوژیکی و حداکثر میزان تولید متابولیت‌های ثانویه در کشت درون شیشه‌ای سوسن چلچراغ، غلظت یک

کشت MS حاوی یک میلی‌گرم BA و ۰/۵ میلی‌گرم NAA به دست آمده است (۳۷). بیدشکی و همکاران (۳) در پژوهشی به این نتیجه رسیدند که استفاده از ایندول بوتیریک اسید در محیط کشت بافت اسطوخودوس باعث کاهش مقدار اسانس و ماده مؤثره گلابدولار شد، در حالی که استفاده از این اکسین همراه با بنزیل آدنین باعث افزایش میزان اسانس گردید. در بررسی تأثیر انواع سایتوکینین بر تولید هایپرسیسین و شبه هایپرسیسین در گل راعی، مشخص شد که BA نسبت به سایر سایتوکینین‌ها (Kin و TDZ، 2ip) در ترکیب با NAA، به میزان بیشتری تولید این مواد را افزایش می‌دهد (۱۹). گزارش‌های مذکور، با نتایج این پژوهش هم‌خوانی دارند. در مطالعه پور عباد و همکاران (۳۵) بر تولید متابولیت‌های ثانویه در *Lallemantia iberica* مشاهده شد که تولید متابولیت‌های ثانویه در محیط کشت حاوی NAA به تنهایی بیشتر از محیط کشت حاوی NAA و BA است که با نتایج پژوهش کنونی مطابقت ندارد.

تغییر در تولید متابولیت‌های ثانویه در کشت درون شیشه‌ای از طریق تغییر محیط کشت، از جمله تنظیم‌کننده‌های رشد امکان‌پذیر است. نوع و غلظت اکسین و سایتوکینین و نسبت اکسین به سایتوکینین در میزان تولید متابولیت‌های ثانویه تأثیرگذار است (۳۶). مشخص شده است که سایتوکینین‌ها تولید متابولیت‌های ثانویه را در بسیاری از گیاهان، از طریق تحریک مسیرهای بیوستتزی، تحریک می‌کنند (۱۳). به عنوان مثال، نشان داده شده است که کاربرد BA خارجی در علف گوش موشی، سبب القای بیان آنزیم فنیل آلانین آمونیا لیاز که آنزیم کلیدی در بیوستتزی سینامات است می‌گردد و منجر به تجمع آنتوسیانین در این گیاه می‌شود (۲۰). همچنین کاربرد انواع دیگر از سایتوکینین‌ها مانند 2ip و متاتوپولین نیز سبب تجمع ترکیبات فنولی مانند کافئیک اسید، وانیلیک اسید و پروتوکاتکونیک در گیاه *Merwillia plumbea* در شرایط درون شیشه‌ای می‌گردد (۱۳). از طرفی سایتوکینین‌ها

محتوای کلروفیل در شرایط درون شیشه‌ای، ارتباط مستقیمی با تولید متابولیت‌های ثانویه دارد.

میلی‌گرم بر لیتر می‌باشد و با افزایش غلظت این تنظیم‌کننده رشدی، شاخص‌های مذکور کاهش می‌یابد. همچنین نتایج همبستگی صفات نشان می‌دهد که میزان فتوسنتز و

منابع

- ۱- امیدی، م.، و فرزین، ن.، ۱۳۹۰. راهکارهای بیوتکنولوژی در افزایش کارایی گیاهان دارویی، ژنتیک نوین، ۷ (۳)، صفحات ۲۲۰-۲۰۹.
- ۲- آزادی، پ.، و مجتهدی، ن.، ۱۳۸۷. اثر تنظیم‌کننده‌های رشد، غلظت ساکارز و قطعات فلس بر ریز ازدیادی پیازهای سوسن چلچراغ برداشت شده در فصل زمستان، مجله پژوهش و سازندگی در زراعت و باغبانی، ۸۱، صفحات ۱۵۴-۱۵۹.
- ۳- بیدشکی، آ.، آروین، م. ج.، و مقصودی، ک.، ۱۳۹۱. تأثیر ایندول بوتیریک اسید (IBA) بر رشد، عملکرد و میزان ماده مؤثره آلیسین در پیاز گیاه سیر (*Alium sativum* L.)، فصل‌نامه علمی پژوهشی تحقیقات گیاهان دارویی و معطر ایران، ۲۸ (۳)، صفحات ۵۷۷-۵۶۷.
- ۴- پاداشت دهکائی، م. ن.، خلیقی، آ.، نادری، ر.، و موسوی، آ.، ۱۳۸۵. اثر دما، بستر ازدیاد و موقعیت فلس بر باززایی سوخک در سوسن چلچراغ (*Lilium ledebourii* Bioss) با شیوه فلس برداری، مجله نهال و بذر، ۲۲ (۳)، صفحات ۳۸۳-۳۹۸.
- ۵- پاداشت دهکائی، م. ن.، خلیقی، آ.، نادری، ر.، و موسوی، آ.، ۱۳۸۷. تأثیر غلظت‌های مختلف بنزیل آدنین (BA) و نفتالین استیک اسید (NAA) بر باززایی سوخک در سوسن چلچراغ (*Lilium ledebourii* Bioss) با استفاده از ریز فلس‌های سوخ، مجله نهال و بذر، ۲۴ (۲)، صفحات ۳۳۵-۳۲۱.
- ۶- تاتاری ورنوسفادرانی، م.، فتوحی قزوینی، ر.، حمید اوغلی، ی.، و حاتم زاده، ع.، ۱۳۸۳. تأثیر تنظیم‌کننده‌های رشد و نوع ریزنمونه در کشت درون شیشه‌ای فلس‌های سوسن چلچراغ (*Lilium ledebourii* Bioss)، پژوهشنامه علوم کشاورزی، ۱ (۲)، صفحات ۳۰-۲۰.
- ۷- جمشیدی، آ.، ابراهیمی، م. ع.، رجبیان، ط.، بخشی خانیکی، غ. ر.، و مظفری، ش.، ۱۳۹۷. بررسی اثر هورمون‌های اکسین و سیتوکینین بر رشد و محتوای رنگیزه‌ها و پروتئین جلبک *Chlorella sorokiniana*. مجله پژوهش‌های گیاهی (مجله زیست‌شناسی ایران)، ۳۱ (۲)، صفحات ۴۰۹-۴۲۱.
- ۸- شبانی، ل.، و احسان‌پور، ع. ا.، ۱۳۸۸. القای آنزیم آنتی‌اکسیدان، ترکیبات فنلیک و فلاونوئید در کشت در شیشه شیرین بیان (*Glycyrrhiza glabra* L.) با استفاده از متیل جاسمونات و سالیسیلیک اسید، مجله زیست‌شناسی ایران، ۲۲ (۴)، صفحات ۷۰۴-۶۹۱.
- ۹- شریفی، م.، محتشمیان، م. س.، ریاحی، ح.، آقایی، آ.، علوی، س. م.، ۱۳۸۹. اثر قارچ اندومیکوریزیایی *Glomus etunicatum* بر برخی شاخص‌های موفولوژیک و فیزیولوژیک گیاه ریحان، فصل‌نامه گیاهان دارویی، دوره دوم، صفحات ۹۵-۸۵.
- ۱۰- قناتی، ف.، بختیاران، س. س.، و عبدالمالکی، پ.، ۱۳۸۹. تأثیر متیل جاسمونات بر متابولیت‌های ثانویه گیاه همیشه بهار (*Calendula officinalis* L.)، مجله علوم و فناوری زیستی مدرس، ۱ (۱)، صفحات ۳۴-۲۱.
- ۱۱- کبیرنجاج، س.، قطبی راوندی، آ.، رضائزاد، ف.، و شاهین کلپیر، ب.، ۱۳۹۲. تأثیر سویه‌های مختلف آگروباکتریوم رایزوترنز بر میزان بیوسنتز ترکیبات فنولی و کلروژنیک اسید در ریشه‌های موئین گیاه کاسنی، مجله علمی پژوهشی زیست‌فناوری گیاهان زراعی، سال سوم، شماره چهارم، صفحات ۷۶-۶۹.
- ۱۲- معمار مشرقی، م.، معینی، آ.، و توسلیان، آ.، ۱۳۸۱. بررسی اثر تنظیم‌کننده‌های رشد BAP، NAA، ریزنمونه، موقعیت‌های مختلف فلس و دوره نوری بر کشت بافت گل سوسن چلچراغ، مجله علوم زراعی ایران، ۴ (۴)، صفحات ۲۶۴-۲۵۳.
- 13- Aremu, A. O., Gruz, J., Šubrtová, M., Szüčová, L., Doležal, K., Bairu, M. W., Finnie, J. F., and Van Staden, J., 2013. Antioxidant and phenolic acid profiles of tissue cultured and acclimatized *Merwillia plumbea* plantlets in relation to the applied cytokinins. *Journal of Plant Physiology*, 170, PP: 1303-1308.
- 14- Aremu, A., Bairu, M., Szüčová, L., Doležal, K., Finnie, J., and Van Staden, J., 2012. Assessment of the role of meta-topolins on *in vitro* produced phenolics and acclimatization competence of micropropagated 'Williams' Banana. *Acta Physiologiae Plantarum*, 34, PP: 2265-2273.

- 15- Azadi, P., and Khosh-Khui, M., 2007, Micropropagation of *Lilium ledebourii* Bioss as affected by plant growth regulator, sucrose concentration, harvesting season and cold treatments, Electronic Journal of Biotechnology, 10, PP: 583- 591.
- 16- Bourgaund, F., Gravot, A., Milesi, S., and Gontier, E., 2010. Production of plant secondary metabolite: A historical perspective. Plant Science, 161, PP: 839- 851.
- 17- Buer, C. S., Imin, N., and Djordjevic, M. A., 2010. Flavonoids: new roles for old molecules. Journal of Integrative Plant Biology, 52, PP:98–111.
- 18- Chernyad'ev, I. I., 2009. The protective action of cytokinins on the photosynthetic machinery and productivity of plants under stress (review), Applied Biochemistry and microbiology, 45, PP: 351-362.
- 19- Coste, A., Vlase, L., Halmagyi, A., Deliu, C., and Coldea, G., 2011, Effects of plant growth regulators and elicitors on production of secondary metabolites in shoot cultures of *Hypericum hirsutum* and *Hypericum maculatum*, Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC), 106, PP: 279-288.
- 20- Deikman, J., and Hammer, P. E., 1995. Induction of Anthocyanin Accumulation by Cytokinins in *Arabidopsis thaliana*, Plant physiology, 108, PP: 47-57.
- 21- Ebrahimzadeh, M. A., Nabavi, S. M., Nabavi, S. F., Eslami, B., and Ehsanifar, S., 2009. Antioxidant activity of *Hyoscyamus squarrosus* fruits. Pharmacology online, 2, PP: 644-650.
- 22- Farsam, H., Amanlou, M., Amin, G. R., Nezamivand- Chegini, G. R., Salehi-Surmaghani, M. H., and Shafiee, A., 2003. Anatomical and phytochemical study of *Lilium ledebourii* Bioss rare endemic species in Iran, Daru, 11, PP: 164-170.
- 23- Han, B. H., Yu, H. J., Yae, B. W., and Peak, K. Y., 2004. *In vitro* micropropagation of *Lilium longiflorum* 'Georgia' by shoot formation as influenced by addition of liquid medium. Scientia Horticulturæ, 103, PP: 39-49.
- 24- He Han, B. H., Yae, B. W., Yu, H. J., and Peak, K. Y., 2005, Improvement of *in vitro* micropropagation of *Lilium* oriental hybrid, Casablanca by the formation of shoots with abnormally swollen basal plants, Scientia Horticulturæ, 103, PP: 351- 359.
- 25- Jayaraj, A., Rumbeiha, W., and Nair, M. G., 2004. Constituents in Easter lily flower with medicinal activity, Scientia Horticulturæ, 102, PP: 1- 13.
- 26- Jin, S., Wang, J., Wang, X., Sun, D., Li, G., Genovesi, A. D., and Liu, S., 2014. Direct and indirect shoot and bulblet regeneration from cultured leaf explants of *Lilium pumilum*, an endangered species, *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant*, 50, PP: 69-75.
- 27- Karalija, E., Parić, A., and Muratović, E., 2013. Biochemical status of *in vitro* regenerated *Lilium bosniacum* and *Lilium cattaniae* plantlets, Central European Journal of Biology, 8, PP: 912-920.
- 28- Kumar, M., Chaudhury, S., and Balachandran, S., 2014. *In Vitro* callus culture of *Heliotropium indicum* Linn. For assessment of total phenolic and flavonoid content and antioxidant activity, Applied Biochemistry and Biotechnology, 174, PP: 2897-2909.
- 29- Kumar, S., Awasthi, V., and Kanwar, J. K., 2007. Influence of growth regulators and nitrogenous compounds on *in vitro* bulblet formation and growth in oriental lily, Hort, Science, 34(2), PP: 77- 83.
- 30- Lian, M. L., Chakrabarty, D., and Paek, K. Y., 2003. Bulblet Formation from Bulbscale Segments of *Lilium* Using Bioreactor System, *Biologia Plantarum*, 46, PP: 199-203.
- 31- Moubayidin, L., Di Mambro, R., and Sabatini, S., 2009. Cytokinin-auxin crosstalk, Trends in Plant Science, 14, PP: 557-562.
- 32- Murashige, T., and Skoog, F., 1962. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures, *Physiologia Plantarum*, 15, PP: 473- 497.
- 33- Nhut, D. T., 1998. Micropropagation of lily (*Lilium longiflorum*) via *in vitro* stem node and pseudo-bulblet culture, *Plant Cell Reports*, 17, PP: 913-916.
- 34- Nimii, Y. 1985. Factors affecting the regeneration and growth of bulblets in bulb-scale cultures of *Lilium rubellum* Baker. *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science*, vol. 54, no. 1, PP: 82-86.
- 35- Pourebad, N., Motafakkerazad, R., Kosari-Nasab, M., Farsad Akhtar, N., and Movafeghi, A., 2015. The influence of TDZ concentrations on *in vitro* growth and production of secondary

- metabolites by the shoot and callus culture of *Lallemantia iberica*, Plant Cell. Tissue and Organ Culture (PCTOC), 122, PP: 331-339.
- 36- Ramachandra Rao, S., and Ravishankar, G. A., 2002. Plant cell cultures: Chemical factories of secondary metabolites. Biotechnology Advances, 20, PP: 101-153.
- 37- Szopa, A., and Ekiert, H., 2014. Production of biologically active phenolic acids in *Aronia melanocarpa* (Michx.) Elliott *in vitro* cultures cultivated on different variants of the Murashige and Skoog medium, Plant Growth Regulation, 72, PP: 51-58.
- 38- Vanisree, M., Lee, C.Y., Lo, S.F., Nalawade, S. M., Lin, C.Y., Tsay, H.S. 2004, Studies on the production of some important secondary metabolites from medicinal plants by plant tissue cultures. Botanical Bulletin of Academia Sinica 45:1- 25.
- 39- Varshney, A., Anis, M., and Aref, I. M., 2013. Potential role of cytokinin–auxin synergism, antioxidant enzymes activities and appraisal of genetic stability in *Dianthus caryophyllus* L.—an important cut flower crop. *In Vitro Cellular and Developmental Biology -Plant-Plant*, 49, PP: 166-174

Investigation on the effects of growth regulators on morphological characteristics and antioxidant compounds of *Lilium ledebourii* Bioss under *in vitro* conditions

Chamani E., Karimi Ghalehtaki N., Mohebodini M. and Pourbeyrami Hir Y.

Dept. of Horticulture, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, I.R. of Iran.

Abstract

Lilium ledebourii is a native ornamental plant in Iran that has medicinal properties beside ornamental aspects. In the present study, the effects of different concentrations of BA on morphologic traits and secondary metabolite production in *L. ledebourii* were evaluated. For this purpose, MS medium Supplemented with 1 mg/l NAA and 1, 2, 3 and 4 mg/l BA has been used. Results showed that maximum number and length of roots and highest indexes of leaves (number, area and length), plantlet height, number and diameter of bulblets, number of scales, chlorophyll, Anthocyanin, Total phenol and flavonoid contents were obtained in control medium and medium Contained 1 mg/ l BA, respectively. With increasing concentrations of BA in the medium, previously described indexes were enhanced. Also, direct regression observed between chlorophyll content and Anthocyanin, Flavonoids and total phenols. This indicated a key role of photosynthesis in secondary metabolite production under *in vitro* condition. Generally, it seems necessary that determined optimum Cytokinin concentration and Cytokinin/Auxin ratio in the culture medium.

Key words: Benzyladenine, Tissue Culture, *Lilium ledebourii*, Secondary Metabolite