Archive of SID

نشریه پژوهش‌های تولید گیاهی
جلد بیست و هفتم، شماره دوم، ۱۳۹۹
۵۹-۷۲
http://jopp.gau.ac.ir
DOI: 10.22069/jopp.2020.16159.2461

اثر نوع ریزنمونه و تنظیم‌کننده‌های رشد بر کالوس‌زایی و متابولیت‌های ثانویه کاسنی (*Cichorium intybus* L.)

افسانه کوهساری[۱]، *ویدا چالوی[۲] و وحید اکبرپور[۳]

[۱]دانشجوی کارشناسی‌ارشد گروه باغبانی، دانشکده علوم زراعی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ساری، ایران،
[۲]دانشیار گروه باغبانی، دانشکده علوم زراعی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ایران،
[۳]استادیار گروه باغبانی، دانشکده علوم زراعی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۱۰/۲۲؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۱۲/۱۹

چکیده

سابقه و هدف: گیاه کاسنی (*Cichorium intybus* L.) یک گیاه دارویی مهم دارای متابولیت‌های با ارزش است. کالوس کاسنی می‌تواند منبع خوبی برای تولید و استخراج متابولیت‌های ثانویه این گیاه باشد و غلظت تنظیم‌کننده‌های رشد و نوع ریزنمونه از عوامل اصلی اثرگذار در تولید کالوس کاسنی می‌باشند. هدف این پژوهش، بهینه‌سازی کالوس‌زایی و تولید متابولیت‌های ثانویه در گیاه کاسنی با استفاده از غلظت تنظیم‌کننده‌های رشد و نوع ریزنمونه است.

مواد و روش‌ها: اثر غلظت تنظیم‌کننده‌های رشد بنزیل آدنین (BA) (۰، ۰/۵، ۱ و ۲ میلی‌گرم بر لیتر) و اسید نفتالین استیک (NAA) (۰، ۰/۵ و ۱ میلی‌گرم بر لیتر) و نوع ریزنمونه (دمبرگ، ساقه و برگ) بر کالوس‌زایی و میزان تولید فنل و فلاونوئید کاسنی در آزمایشی به‌صورت فاکتوریل و در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار مورد بررسی قرار گرفت. نخست سطح بذرها سترون گردید و سپس در محیط MS به‌منظور تهیه گیاهچه سترون کشت شدند. از این گیاهچه‌ها، پس از ٤ تا ٥ هفته، ریزنمونه‌های برگ، دمبرگ و ساقه در شرایط سترون تهیه شد. ریزنمونه‌ها در محیط کشت بافت گیاهی حاوی غلظت‌های مختلف BA و NAA کشت شدند. پس از ٤ هفته، کالوس‌های به‌دست آمده از ریزنمونه‌های استریل برای اندازه‌گیری صفات درصد کالوس‌زایی، وزن تر، وزن خشک، درصد ماده خشک، محتوای آب نسبی کالوس، میزان فنل، فلاونوئید و فعالیت آنتی‌اکسیدانی مورد استفاده قرار گرفتند.

یافته‌ها: بر اساس نتایج به‌دست آمده از تجزیه واریانس، اثر متقابل همه تیمارها اختلاف معنی‌داری را در سطح یک درصد نشان دادند. مقایسه میانگین‌های اثر متقابل تیمارها نشان داد که ریزنمونه دمبرگ در تیمار ۲ میلی‌گرم بر لیتر BA همراه با ۱ میلی‌گرم بر لیتر NAA بیش‌ترین میزان کالوس‌زایی را داشت. از طرف دیگر، بیش‌ترین وزن تر کالوس در ریزنمونه برگ در محیط کشت حاوی ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر BA و ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر NAA به‌دست آمد. هم‌چنین بیش‌ترین وزن خشک کالوس در ریزنمونه‌های دمبرگ و ساقه در غلظت‌های ۱ و ۲ میلی‌گرم بر لیتر BA و ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر NAA به‌دست آمد. بیش‌ترین درصد ماده خشک کالوس در ریزنمونه دمبرگ در غلظت ۱ میلی‌گرم بر لیتر BA و ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر NAA مشاهده شد. بیش‌ترین میزان فنل و فلاونوئید در ریزنمونه دمبرگ و غلظت ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر BA به‌تنهایی مشاهده گردید. کالوس

* مسئول مکاتبه: v.chalavi@sanru.ac.ir

www.SID.ir

Archive of SID

تولیدشده از ریزنمونه ساقه بیش‌ترین خاصیت آنتی‌اکسیدانی را در محیط کشت حاوی ۱ میلی‌گرم بر لیتر BA و ۱ میلی‌گرم بر لیتر NAA، نشان داد.

نتیجه‌گیری: در مجموع، دمبرگ بهترین ریزنمونه برای تولید کالوس در ترکیب با تیمارهای ۲ میلی‌گرم بر لیتر BA و ۱ میلی‌گرم بر لیتر NAA و یا محیط حاوی ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر BA و بدون NAA بود. افزون بر این، تیمارهای فوق، بیش‌ترین میزان فنل و فلاونوئید را تولید نمودند که دارای بیش‌ترین فعالیت آنتی‌اکسیدانی هم بودند.

واژه‌های کلیدی: اسید نفتالین استیک، بنزیل آدنین، فلاونوئید، فنل، کالوس

مقدمه

گیاه کاسنی (*Cichorium intybus* L.) گیاهی علفی و پایا از خانواده آستراسه[1] می‌باشد. ریشه، برگ و بذر آن حاوی متابولیت‌های ثانویه مهمی مانند اینولین، کومارین، سزکوئی‌ترپن، لاکتون‌های تلخ (لاکتوکسین)، فنل‌ها و فلاونوئید است که در صنایع غذایی و دارویی استفاده می‌شوند (۲۳). فلاونوئیدها و اسیدهای فنولی متابولیت‌های ثانویه هستند که به‌علت دارا بودن گروه هیدروکسیل در ساختار خود و کمک به سیستم دفاعی در مقابله با آسیب‌های اکسیداتیو ناشی از رادیکال‌های آزاد اکسیژن، بسیار مهم می‌باشد و به این دلیل این گیاه دارای خاصیت پاداکسایندگی است.

یکی از روش‌های تولید متابولیت‌های ثانویه، بهره‌گیری از سیستم کشت بافت گیاهی و تولید کالوس می‌باشد که تحت‌تأثیر عوامل محیطی قرار نمی‌گیرد. کالوس یک بافت از سلول‌های پارانشیمی بی‌شکل در حال تقسیم است که در کشت‌های درون‌شیشه‌ای از ریزنمونه‌های زخمی شروع می‌شود. در اغلب موارد، فرآیندی که در ناحیه سطح زخم رخ می‌دهد، ترکیبی از تقسیم سلولی و تقویت دیواره سلولی است که اکثر فعالیت‌های زیست-شیمیایی برای درمان این زخم، تولید ترکیب‌های فنلی است که دیواره سلولی را از طریق القای مسیر فنیل پروپانوئیدی تقویت می‌کند (۱۸). کشت کالوس می‌تواند به‌طور یک منبع غنی از ترکیب‌های فنولی دارای فعالیت آنتی‌اکسیدانی طبیعی باشد، دستکاری محیط کشت بافت گیاهی با افزودن تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی می‌تواند تولید فنل را در کشت کالوس افزایش دهد (۱۱).

مطالعات بسیاری از طریق کشت بافت برای تولید متابولیت‌های ثانویه انجام شده است. آزمایش‌های گیاه-شیمیایی روی عصاره‌ی هیدروالکلی برگ کاسنی نشان داد که برگ‌ها دارای مقادیر بالای فلانوئید کل و اسید فنولیک هستند. عصاره کاسنی خسارت ناشی از پراکسید هیدروژن را کاهش می‌دهد و از تنش اکسیداتیو جلوگیری می‌کند (۳). مقایسه ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی برگ و کالوس استویا نشان داد که محتوای کل ترکیبات فنلی و فلاونوئید در کالوس بیش‌تر از برگ‌ها است هم‌چنین عصاره متانولی کالوس درصد مهار رادیکال آزاد بالایی را نشان داد (۱ و ۳۱).

استفاده از تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی نقش مهمی در رشد و توسعه سیستم‌های گیاهی دارد. هم‌چنین تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی مسئول تولید متابولیت‌های ثانویه در سلول‌های گیاهی و کشت بافت هستند. در حقیقت، نوع و نسبت اکسین‌ها و سیتوکینین‌ها نقش مهمی در رشد و تشکیل متابولیت‌های گیاهان دارد. به‌نظر می‌رسد اکسین‌ها

1- Asteraceae

www.SID.ir

Archive of SID

عامل اصلی کنترل رشد بافت‌های کشت شده است، در حالی‌که اثر سیتوکینین‌ها بسته به شکل‌گیری متابولیسم ثانویه و گونه‌های گیاهی مربوطه متفاوت است (۲٤).

مطالعات متعددی در زمینه کشت‌های درون‌شیشه‌ای و بهینه‌سازی تنظیم‌کننده‌های مختلف رشد اکسین و سیتوکینین در القای کالوس در گیاه کاسنی انجام گرفته است. برای نمونه استفاده NAA[1]، KIN[2] و BA[3] در ریزنمونه‌های برگ و دمبرگ (۹) و هم‌چنین ریزنمونه‌های برگ، کوتیلیدون، هیپوکوتیل و ریشه روی محیط‌های حاوی IAA[4]، IBA[5]، NAA[6]، 2,4-D[7] و BAP[8] (۳۲) به‌علاوه استفاده از IAA، BA و KIN (۲٦)،BA و NAA (۲ و ۲۵) با استفاده از ریزنمونه برگ نمونه‌ای از کاربرد تنظیم‌کننده‌های رشد در محیط کشت درون‌شیشه‌ای صورت گرفته است. نتایج این پژوهش‌ها نشان داد که میزان کالوس‌دهی متفاوت است. این تفاوت در القای کالوس در ریزنمونه‌های مختلف ممکن است به‌علت ژنوتیپ، نوع و منبع تهیه ریزنمونه و غلظت بهینه ترکیب‌ها و تنظیم‌کننده‌ها مورد استفاده، هم‌چنین تأثیر تنظیم‌کننده‌های رشد خارجی بر غلظت هورمون‌های درونی و برهمکنش آن‌ها باشد (۱۷ و ۲۸).

به‌دلیل اهمیت ترکیبات ثانویه گیاهان و کاربرد این ترکیبات در صنایع مختلف استفاده از روش‌های جدید برای تولید اقتصادی این ترکیبات دارای اهمیت است. کشت درون‌شیشه‌ای یک روش مناسب و مهم برای تولید متابولیت‌های ثانویه با ارزش در اکثر گیاهان تحت شرایط کنترل‌شده فیزیکی و شیمیایی است. هدف از پژوهش حاضر بهینه‌سازی کالوس‌زایی و تولید متابولیت‌های ثانویه در گیاه دارویی کاسنی تحت‌تأثیر تنظیم‌کننده‌های رشد (BA و NAA) و ریزنمونه‌های برگ، دمبرگ و ساقه در محیط موراشیک و اسکوک (۲۱) می‌باشد.

مواد و روش‌ها

تهیه و استریل مواد گیاهی: بذر گیاه کاسنی از شرکت پاکان بذر اصفهان تهیه گردید. به‌منظور تهیه گیاهچه استریل، بذرهای کاسنی جهت ضدعفونی، نخست به‌مدت ۱۲ ساعت در آب خیسانده شدند و سپس زیر آب جاری شسته و در شرایط استریل به‌مدت ۹۰ ثانیه در الکل ۷۰ درصد قرار گرفت و پس از شستشو با آب مقطر استریل با هیپوکلرید سدیم ۵ درصد به‌مدت ۳۰ دقیقه ضدعفونی گردیدند. در پایان چند مرتبه با آب مقطر استریل شستشو شدند.

کشت بذر: بذرهای ضدعفونی شده در محیط کشت MS[9] ۱/۲ حاوی ۳ درصد ساکارز و ۰/۸ درصد آگار به اضافه ۰/۱ گرم اینوزیتول کشت شده و pH محیط کشت بین ۵/۸–۵/٦ با استفاده از سدیم هیدروکسید و اسید کلریدریک ۱ نرمال تنظیم شد. محیط‌های کشت برای استریل شدن به‌مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد اتوکلاو شدند. محیط‌های کشت‌شده در دمای ۲±۲۵ درجه سانتی‌گراد و شرایط نوری ۱٦ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی نگهداری شدند.

القای کالوس در گیاه کاسنی: پس از گذشت ۵±۳۰ روز که گیاهچه‌ها به حد کافی رشد کردند، از آن‌ها ریزنمونه‌های برگ، دمبرگ و ساقه تهیه شد (شکل ۱). ریزنمونه‌ها به اندازه یک سانتی‌متر برش داده شدند و برای بهینه‌سازی محیط کالوس‌زایی در محیط کشت MS حاوی ترکیب غلظت‌های مختلف تیماری بنزیل آدنین (BA) با غلظت‌های (۰، ۰/۵، ۱ و ۲ میلی‌گرم

1- 1-Naphthaleneacetic acid
2- Kinetin
3- 6-benzyladenine
4- Indole-3-acetic acid
5- Indole-3-butyric acid
6- 1-naphthaleneacetic acid
7- 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid
8- 6-Benzylaminopurine
9- Murashige and Skoog

www.SID.ir

Archive of SID

بر لیتر) و اسید نفتالین استیک (NAA) با غلظت‌های (۰، ۰/۵ و ۱ میلی‌گرم بر لیتر) با سه تکرار و در هر تکرار ٦ ریزنمونه کشت گردید. و در دمای ۲±۲۵ درجه سانتی‌گراد و شرایط ١٦ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی قرار داده شدند. صفات درصد کالوس‌زایی، وزن تر، وزن خشک، درصد ماده خشک، محتوای آب نسبی کالوس، میزان فنل، فلاونوئید و فعالیت آنتی‌اکسیدانی اندازه‌گیری شدند. آزمایش به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی اجرا گردید. داده‌ها توسط نرم‌افزار SAS مورد تجزیه تحلیل قرار گرفت و برای انجام آزمون مقایسه میانگین‌ها از آزمون چنددامنه‌ای دانکن با سطح احتمال پنج درصد استفاده شد. همبستگی داده‌ها با نرم‌افزار SPSS انجام شد، هم‌چنین نمودار مقایسه میانگین با نرم‌افزار اکسل رسم شد.

شکل ۱- گیاهچه‌های بذری تولیدشده کاسنی در شرایط درون‌شیشه‌ای در محیط MS پس از گذشت ۵±۳۰ روز.

Fig. 1. Seedlings of chicory produced at in vitro conditions in MS medium after 30 ± 5 days.

وزن تر کالوس‌ها با ترازوی دیجیتال با دقت ۰/۰۱ گرم اندازه‌گیری شد. برای اندازه‌گیری وزن خشک کالوس‌ها به‌مدت ٢٤ ساعت در آون با دمای ٦٠ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند و سپس با ترازوی ۰/۰۱ گرم اندازه‌گیری شدند.

اندازه‌گیری محتوای آب نسبی (۳۰)

$$\text{اندازه‌گیری محتوای آب نسبی} = \frac{\text{وزن خشک} - \text{وزن تر}}{\text{وزن خشک}} \times ۱۰۰ \quad (۱)$$

درصد ماده خشک

$$\text{درصد ماده خشک} = \frac{\text{وزن خشک}}{\text{وزن تر}} \times ۱۰۰ \quad (۲)$$

تهیه عصاره متانولی: ۰/۵ گرم کالوس تر با ۵ میلی‌لیتر متانول ۸۰ درصد در داخل هاون کوبیده شده، پس از آن به‌مدت ٢٤ ساعت روی شیکر شرکت فن آزما گستر مدل (TM52E) در شرایط تاریکی قرار گرفت. سپس در ۳۵۰۰ دور به‌مدت ۱۵ دقیقه سانتریفوژ شد و از محلول رویی برای اندازه‌گیری میزان فنل، فلاونوئید و فعالیت آنتی‌اکسیدانی استفاده شد.

اندازه‌گیری محتوای فلاونوئید: اندازه‌گیری فلاونوئید به روش آلومینیوم کلراید (۵) انجام شد. ۰/۵ سی‌سی از عصاره متانولی، ۱/۵ سی‌سی متانول، ۰/۱ سی‌سی آلومینیوم کلراید ۱۰ درصد، ۰/۱ سی‌سی استات پتاسیم یک مولار و ۲/۸ سی‌سی آب مقطر مخلوط شدند. محلول حاصل نیم ساعت در تاریکی قرار گرفته و در طول موج ٤١٥ نانومتر توسط

www.SID.ir

Archive of SID

دستگاه اسپکتروفتومتر Analytic Jena مدل (SPEKOL 2000) خوانده شد. غلظت نمونه‌ها با استفاده از منحنی استاندارد کوئرسیتین به‌دست آمد.

اندازه‌گیری فنل: جهت اندازه‌گیری فنل کل از روش فولین سیوکالتیو استفاده شد (٦). ٠/٥ سی‌سی عصاره به‌دست آمده با ٥ سی‌سی فولین سیوکالتیو (١ به ١٠ رقیق شده با آب مقطر) مخلوط گردید و ٤ سی‌سی کربنات سدیم یک مولار اضافه شد. محلول حاصل ١٥ دقیقه در تاریکی قرار داده شد. سپس میزان فنل کل از جذب نمونه‌ها در طول موج ٧٦٥ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر Analytic Jena مدل (SPEKOL 2000) و استاندارد اسید گالیک به‌دست آمد.

اندازه‌گیری درصد مهار رادیکال آزاد (٦): ١ سی‌سی از عصاره متانولی را به ١ سی‌سی DPPH اضافه کرده و سپس نمونه‌ها به‌مدت ٣٠ دقیقه در محیط تاریک نگهداری شدند. میزان جذب در طول موج ٥١٧ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر Analytic Jena مدل (SPEKOL 2000) خوانده شد.

(٣) درصد مهار رادیکال آزاد = AC- AS/AC * 100

نتایج و بحث

نتایج حاصل از تجزیه و تحلیل آماری نشان داد که اثر غلظت‌های مختلف ترکیب‌های NAA و BA و نوع ریزنمونه مورد استفاده (برگ، دمبرگ و ساقه) و اثر متقابل بین آن‌ها بر صفات درصد کالوس‌زایی، وزن تر، وزن خشک، درصد ماده خشک کالوس، محتوای آب نسبی کالوس، فنل، فلاونوئید و فعالیت آنتی‌اکسیدانی در سطح احتمال ١ درصد معنی‌دار شد (جدول ١).

جدول ١- نتایج آنالیز واریانس اثر نوع تنظیم‌کننده و ریزنمونه بر برخی صفات کالوس گیاه کاسنی.

Table 1. Analysis of variance of the effect of type of regulator and explant on some of the chicory's callus traits.

منابع تغییرات Source of variations	درجه آزادی df	میانگین مربعات Means of square							
		درصد کالوس‌دهی Percent of callus formation	وزن تر Fresh weight	وزن خشک Dry weight	درصد ماده خشک Percent of dry matter	محتوای آب نسبی Relative water content	فنل Phenol	فلاونوئید Flavonoid	فعالیت آنتی‌اکسیدانی Antioxidant activity
ریزنمونه Explant	2	4628.8**	7.22**	0.015**	0.14ns	1392844.33**	1.5**	0.1**	4702.52**
تنظیم‌کننده رشد Regulator	11	12993.73**	29.5**	0.108**	97.85**	3244704.4**	2.53**	0.2**	8214.58**
ریزنمونه × تنظیم‌کننده رشد Regulator × Explant	22	750.37**	8.71**	0.027**	30.47**	1032669.37**	0.37**	0.029**	1268.34**
خطا Error	72	1.07	0.036	0.00007	0.12	2.35	0.028	0.0006	78.96
ضریب تغییرات (٪) CV (%)		1.92	8.44	5.78	8.30	0.19	18/14	9.19	16.57

ns و ** به‌ترتیب غیرمعنی‌داری و معنی‌داری در سطح یک درصد.

ns, ** non-significant and significant at 1% level.

www.SID.ir

Archive of SID

اثر نسبت‌های متفاوت NAA و BA و ریزنمونه بر تولید کالوس: مقایسه میانگین اثر متقابل تنظیم‌کننده‌های رشد و نوع ریزنمونه در تمامی ریزنمونه‌های برگ، دمبرگ و ساقه در محیط کشت حاوی تیمار ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر BA همراه با ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر NAA ۱۰۰ درصد کالوس‌دهی را نشان دادند (شکل ۳). هم‌چنین در محیط کشت حاوی تیمار ۱ میلی‌گرم بر لیتر BA همراه با ۱ میلی‌گرم بر لیتر NAA و ۲ میلی‌گرم بر لیتر BA همراه با ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر NAA در ریزنمونه‌های ساقه و دمبرگ میزان کالوس‌دهی ۱۰۰ درصد بود. به‌علاوه ۱۰۰ درصد کالوس‌دهی در محیط کشت حاوی ۲ میلی‌گرم بر لیتر BA همراه با ۱ میلی‌گرم بر لیتر NAA و ۱ میلی‌گرم بر لیتر BA همراه با ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر NAA در ریزنمونه دمبرگ مشاهده شد که از نظر آماری در یک گروه قرار گرفتند و با هم اختلافی نداشتند. با توجه به نتایج مقایسه میانگین‌ها وجود هر دو NAA و BA در تشکیل کالوس مؤثر است، اضافه کردن NAA در کنار BA باعث افزایش کالوس‌زایی می‌شود. در تیمارهای بدون تنظیم‌کننده رشد برای هر سه ریزنمونه هیچ القای کالوسی دیده نشد. این نشان می‌دهد که داشتن تنظیم‌کننده‌های رشد در محیط کشت بافت برای فراهم نمودن شرایط مناسب جهت تحریک و تسریع تقسیم سلولی ضروری است.

گزارش‌هایی مبنی بر کالوس‌زایی گیاه کاسنی در حضور اکسین و سیتوکینین‌ها وجود دارد. کالوس‌زایی گیاه کاسنی در غلظت‌های مختلف تنظیم‌کننده‌های رشد NAA، BA و Kin (کینیتین) با دو ریزنمونه برگ و دمبرگ مورد بررسی قرار گرفت، نتایج آن‌ها نشان داد همه محیط‌های کشت با ترکیب‌های مختلف BA و NAA در هر دو ریزنمونه برگ و دمبرگ موجب کالوس‌زایی ۱۰۰ درصد شدند (۹). براساس نتایج به‌دست آمده در پژوهش حاضر و کارهای مشابه می‌توان به این نتیجه رسید که گیاه کاسنی به تیمارهای ترکیب‌های مختلف BA و NAA به خوبی پاسخ می‌دهد. گفته شده است که NAA بهترین اکسین برای القای کالوس در ترکیب با BA در گیاه کاسنی است و غلظت‌های بالاتر NAA (بیش از ۱ میلی‌گرم بر لیتر) در ترکیب با BA باعث افزایش میزان کالوس‌دهی در کاسنی می‌شود (۳۲). ساخت DNA در حضور اکسین انجام می‌شود غلظت سیتوکینین درونی قبل از میتوز به اوج قابل‌توجهی می‌رسد که نقش مهم آن را در چرخه سلولی و میتوز نشان می‌دهد (۲۲). هم‌چنین اکسین موجب تجمع پروتئین کیناز در چرخه سلولی می‌شود و برای فعال‌سازی این پروتئین سیتوکینین لازم است که باعث فعال شدن چرخه سلولی و تحریک تقسیم سلولی پینه می‌شوند (۲۰ و ۲۷).

درصد کالوس‌زایی در ریزنمونه دمبرگ بیش‌تر از ریزنمونه‌های ساقه و برگ بود (شکل ۳). در این پژوهش ریزنمونه‌ها از گیاهچه‌های درون‌شیشه‌ای تهیه شدند و درصد بالای کالوس‌دهی را نشان دادند. پژوهش‌هایی روی ریزنمونه‌های مختلف گیاهان *Echinacea purpurea* L. (۳۳) و *Arctium lappa* L. (۱٤) از خانواده کاسنی مبنی بر انتخاب ریزنمونه مناسب جهت کالوس‌زایی انجام شده این پژوهش‌ها نشان دادند که نوع ریزنمونه در میزان القای کالوس مؤثر است. بافت‌های گیاهی در غشا یا درون سیتوپلاسم دارای گیرنده‌های مخصوص برای هورمون‌ها هستند (۲۰) و سطح هورمون‌های درونی در ریزنمونه‌ها متفاوت است (۱۲). به همین دلیل ریزنمونه‌های مختلف کالوس‌دهی متفاوتی را نشان دادند.

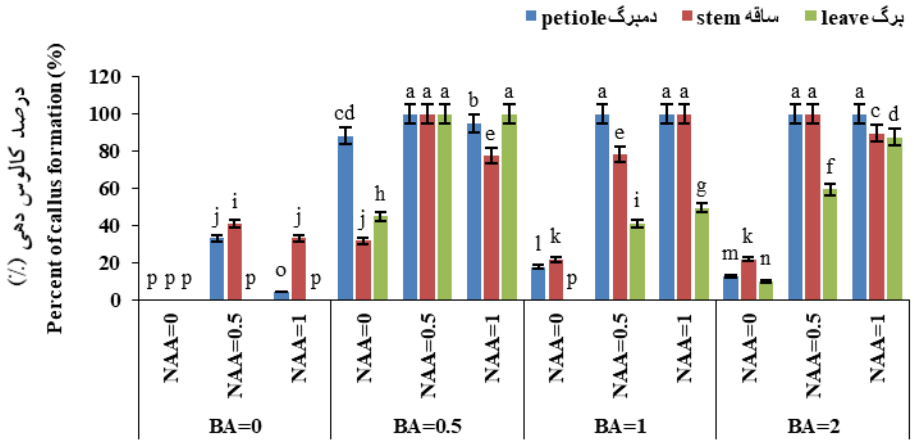
www.SID.ir

Archive of SID

از بین تیمارها که صد در صد کالوس‌دهی را نشان دادند غلظت ۲ میلی‌گرم بر لیتر BA در ترکیب با ۱ میلی‌گرم بر لیتر NAA را می‌توان ترکیب مناسب برای کالوس‌دهی معرفی کرد (شکل ۲) و در سایر ترکیب‌های تیماری که کالوس‌زایی صد درصد بود، باززایی و ریشه‌زایی دیده شد است و با توجه به این‌که هدف ما تعیین تیمار مناسب کالوس‌دهی بود این ترکیب تیماری می‌تواند بهترین ترکیب برای کالوس‌دهی در ریزنمونه‌ی دمبرگ کاسنی باشد (شکل ۳).

شکل ۲- کالوس‌های حاصل از ریزنمونه‌های گیاه کاسنی (۲ میلی‌گرم بر لیتر BA + ۱ میلی‌گرم بر لیتر NAA).

Fig. 2. Calluses derived from chicory explants (2 mg/l BA + 1 mg/l NAA).



شکل ۳- مقایسه میانگین اثر متقابل بنزیل آدنین و اسید نفتالین استیک بر درصد کالوس‌دهی ریزنمونه‌های دمبرگ، ساقه و برگ گیاه کاسنی.

Fig. 3. Mean comparison of BA and NAA interaction on percent of callus formation of explants petiole, stem and leave of chicory.

بررسی وزن تر، خشک، درصد ماده خشک و درصد آب نسبی کالوس: نتایج مقایسه میانگین اثر متقابل تنظیم‌کننده‌های رشد و نوع ریزنمونه نشان داد که بیش‌ترین وزن تر کالوس در محیط کشت MS حاوی ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر BA به همراه ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر NAA و ۲ میلی‌گرم بر لیتر BA همراه با ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر NAA و هم‌چنین در غلظت ۱ میلی‌گرم بر لیتر BA و ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر

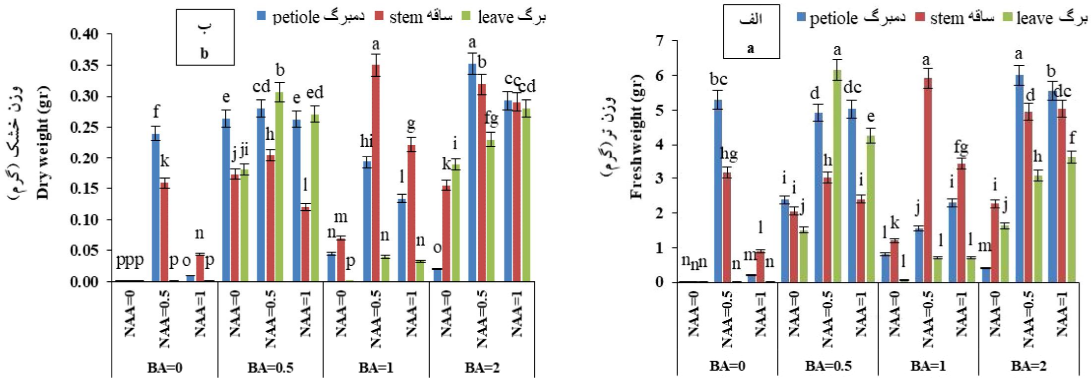
www.SID.ir

Archive of SID

NAA به‌ترتیب در ریزنمونه‌های برگ، دمبرگ و ساقه بود که از نظر آماری در یک گروه آماری قرار گرفتند و تفاوت معنی‌داری را نشان ندادند (شکل ٤، الف). در غلظت‌های BA تنها بدون کاربرد NAA میزان وزن تر و خشک در هر سه ریزنمونه پایین بود که با افزایش مقدار BA در ترکیب با NAA مقدار آن‌ها افزایش پیدا کرد. بیش‌ترین مقدار وزن خشک کالوس در تیمارهای ۲ و ۱ میلی‌گرم بر لیتر BA و ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر NAA در ریزنمونه‌های دمبرگ و ساقه مشاهده شد (شکل ٤، ب)، که با هم در یک گروه آماری قرار دارند و اختلاف معنی‌داری در آن‌ها مشاهده نشد.

وزن تر و خشک کالوس به‌طور گسترده به‌عنوان معیاری از رشد کالوس‌ها مورد اندازه‌گیری قرار می‌گیرد (١٦). بالاترین میزان رشد کالوس در غلظت‌های ۱ و ۲ میلی‌گرم بر لیتر BA و ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر NAA در ریزنمونه‌های دمبرگ و ساقه می‌باشد این غلظت‌ها دارای بیش‌ترین میزان وزن تر و خشک کالوس هستند.

نتایج مقایسه میانگین اثر متقابل تنظیم‌کننده‌های رشد و نوع ریزنمونه بیانگر این است که بیش‌ترین درصد ماده خشک کالوس مربوط به تیمارهای ۱ میلی‌گرم بر لیتر BA و ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر NAA در ریزنمونه دمبرگ و ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر BA و بدون کاربرد NAA در ریزنمونه برگ می‌باشد که در یک گروه آماری قرار داشتند (شکل ۵، الف). به‌علاوه نتایج نشان داد که ریزنمونه دمبرگ در محیط کشت حاوی تیمار ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر NAA و غلظت صفر BA بیش‌ترین درصد آب نسبی کالوس را دارد (شکل ۵، ب).

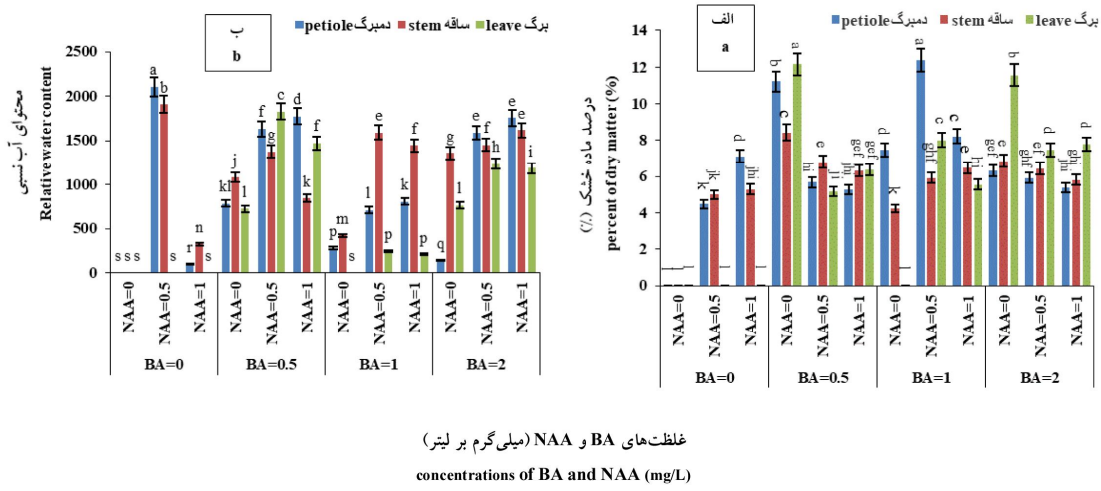


شکل ٤- مقایسه میانگین اثر بنزیل آدنین و اسید نفتالین استیک بر وزن تر (الف) و وزن خشک (ب) ریزنمونه‌های دمبرگ، ساقه و برگ کاسنی.

Fig. 4. Mean comparison of BA and NAA effect on fresh weight (a) and dry weight (b) explants petiole, stem and leave of chicory.

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۵- مقایسه میانگین اثر بنزیل آدنین و اسید نفتالین استیک بر درصد ماده خشک (الف) و محتوای آب نسبی (ب) ریزنمونه‌های دمبرگ، ساقه و برگ کاسنی.

Fig. 5. Mean comparison of BA and NAA effect on percent of dry matter (a) and relative water content (b) explants petiole, stem and leave of chicor.

بررسی میزان فنل، فلاونوئید و فعالیت آنتی‌اکسیدانی کالوس: نتایج مقایسه میانگین اثرات متقابل تنظیم‌کننده‌های رشد و نوع ریزنمونه نشان می‌دهد که ترکیبات تیماری مختلف اثرات متفاوتی بر میزان فنل کالوس داشتند، به‌طوری‌که بیش‌ترین میزان فنل کالوس ۱/۹۷ میلی‌گرم بر گرم وزن تر در محیط کشت MS حاوی ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر BA و بدون NAA در ریزنمونه دمبرگ به‌دست آمد (شکل ٦، الف). کاربرد غلظت‌های مختلف ترکیب‌های تیماری اثرات مختلفی روی تولید ترکیب‌های فنلی می‌گذارد. در پژوهش حاضر ترکیب‌های فنلی در ریزنمونه دمبرگ بیش‌تر از سایر ریزنمونه‌ها ساخته شده است. بهترین میزان تولید ترکیب‌های فنلی و فلاونوئید را در چای کوهی (*Stachys lavandulifolia*)، در محیط حاوی BA به‌تنهایی و بدون حضور NAA اعلام کردند که با نتایج حاضر در یک راستا هستند (۱۹).

به‌علاوه نتایج اثر متقابل تنظیم‌کننده‌های رشد و نوع ریزنمونه بیش‌ترین مقدار فلاونوئید کالوس در محیط حاوی ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر BA و بدون حضور NAA، در ریزنمونه دمبرگ مشاهده شد (شکل ٦، ب).

نوع و غلظت اکسین و سیتوکینین یا نسبت اکسین به سیتوکینین به‌طور چشمگیری رشد کالوس و تولید متابولیت‌های ثانویه را در کشت سلول‌های گیاهی تغییر می‌دهد (۱۵ و ۳٤). ساخت متابولیت‌های ثانویه گیاهی به شرایط محیط کشت، سن فیزیولوژیکی ریزنمونه، نوع بافت تولیدکننده، میزان تکامل و تمایز آن بستگی دارد (۳٤). سلول‌های تمایز نیافته قابلیت تولید لازم را برای ساخت و تجمع متابولیت‌های ثانویه را ندارند. هورمون‌ها از عوامل مؤثر در تمایز هستند. بنابراین تیماری که باعث تمایز سلول‌ها می‌شود در فعال کردن مسیرهای ساخت آنزیم‌های دخیل در این مسیرها بهتر عمل می‌کنند (۱۰). با توجه

www.SID.ir

Archive of SID

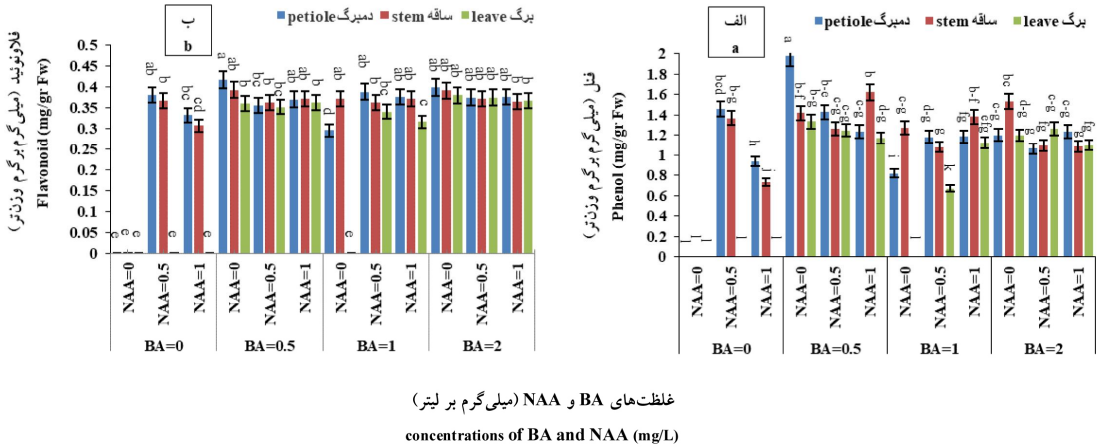
به نتایج مقایسه میانگین داده‌ها (شکل ٦) بیش‌ترین میزان فنل و فلاونوئید کالوس در محیط MS حاوی ترکیب تیماری ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر BA و بدون کاربرد NAA مشاهده گردید. بنابراین می‌توان گفت که BA در تمایزیابی سلول‌های کالوس نقش داشته است و در تولید متابولیت‌های ثانویه مؤثر بوده است. سیتوکینین به‌کار برده شده در غلظت پایین باعث فعال کردن مسیرهای ساخت و آنزیم‌های مربوط به تولید فنل و فلاونوئید شده است. احتمالاً با تغییر غلظت تنظیم‌کننده‌های رشد میزان فعالیت یا میزان تولید آنزیم‌هایی که در مسیر آنابولیسم و کاتابولیسم ترکیب‌های فنلی شرکت دارند نیز تغییر می‌کند. وجود اکسین و سیتوکینین برای تولید آرتیمیزینین در کالوس‌های درمنه مؤثر بود که در محیط حاوی ۲ میلی‌گرم بر لیتر BA و ۲ میلی‌گرم بر لیتر NAA افزایش یافت (۳٤). بیش‌ترین محتوای فنلی در کالوس‌های محیط حاوی NAA و BAP در گیاه (*Justicia gendarussa*) مشاهده شد (٤).

نوع بافت هم در تولید متابولیت‌های ثانویه نقش دارد، ریزنمونه دمبرگ دارای بیش‌ترین میزان فنل و فلاونوئید است. در بررسی شکل ۷، بیش‌ترین مقدار فعالیت آنتی‌اکسیدانی کالوس در محیط کشت MS حاوی تیمارهای ۱ میلی‌گرم بر لیتر BA به‌همراه ۱ میلی‌گرم بر لیتر NAA و ۲ میلی‌گرم بر لیتر BA به‌همراه ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر NAA به‌ترتیب در ریزنمونه‌های ساقه و دمبرگ بود که با هم از نظر آماری اختلافی نداشتند (شکل ۷). رادیکال‌های آزاد در داخل سلول به‌عنوان محصولات جانبی واکنش‌های متابولیک تولید می‌گردند، علاوه بر آن در گیاهان در پاسخ به تنش نیز تولید می‌شوند که می‌توانند با مولکول‌های زیستی مانند پروتئین‌ها، لیپیدها، کربوهیدرات‌ها و اسیدهای نوکلئیک وارد واکنش شده و سبب تخریب پروتئین‌ها، آسیب به غشاء، تجزیه پلی‌ساکاریدها و ایجاد جهش در DNA شوند (۸). اضافه کردن تنظیم‌کننده‌های رشد به محیط کشت یک نوع تنش در کالوس‌ها به وجود می‌آورد، گیاه در برابر تنش ایجاد شده از سیستم‌های آنزیمی و غیرآنزیمی برای از بین بردن تنش استفاده می‌کند. ترکیب‌های فنلی جز سیستم‌های غیرآنزیمی هستند و گونه‌های فعال اکسیژن را در گیاه از بین می‌برد (۱۳). ساخت متابولیت‌های ثانویه در پاسخ به شرایط تنش‌زا ساختار سلولی را در برابر اکسیداسیون محافظت می‌کند (۷).

درصد فعالیت آنتی‌اکسیدانی در ریزنمونه‌های مختلف متفاوت بود بیش‌ترین فعالیت آنتی‌اکسیدانی در ساقه و دمبرگ و کم‌ترین مقدار در ریزنمونه برگ مشاهده شد. نتایج این مطالعه همبستگی مثبت و معنی‌داری را بین فعالیت آنتی‌اکسیدانی و محتوای فنل و فلاونوئیدی تیمارها نشان داد (جدول ۲). نتایج بررسی همبستگی بین ترکیب‌های فنلی و فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره علف هیضه (*Pulicaria gnaphalodes*) نشان داد که بین مقدار ترکیب‌های فنلی و فعالیت آنتی‌اکسیدانی همبستگی مثبتی وجود دارد (۲۹).

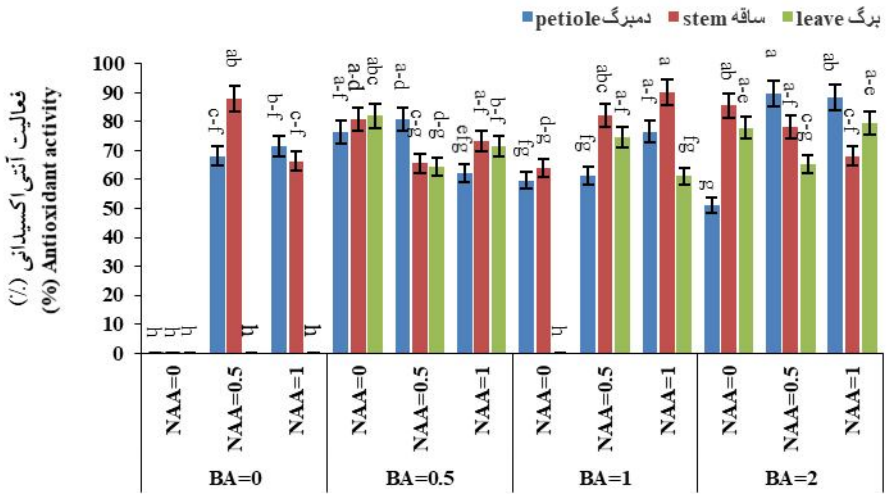
www.SID.ir

Archive of SID



شکل ٦- مقایسه میانگین اثر بنزیل آدنین و اسید نفتالین استیک بر میزان فنل (الف) و فلاونوئید (ب) ریزنمونه‌های دمبرگ، ساقه و برگ کاسنی.

Fig. 6. Mean comparison of BA and NAA effect on the amount of phenol (a) and Flavonoid (b) explants petiole, stem and leave of chicory.



شکل ٧- مقایسه میانگین اثر بنزیل آدنین و اسید نفتالین استیک بر خاصیت آنتی‌اکسیدانی ریزنمونه‌های دمبرگ، ساقه و برگ کاسنی.

Fig. 7. Mean comparison of BA and NAA effect on the Antioxidant properties of explants petiole, stem and leave of chicory.

با توجه به جدول ٢، ضریب همبستگی بین صفات در سطح یک درصد معنی‌دار شده و رابطه مثبت بین صفات را نشان می‌دهد. از این جدول می‌توان دریافت که تولید مقدار مناسب از فنل و فلاونوئید، سبب فعالیت آنتی‌اکسیدانی ریزنمونه و دفع اکسیدان‌ها گردید. در نتیجه ریزنمونه فرصتی را برای تولید کالوس و افزایش وزن تر با افزایش رطوبت نسبی و افزایش ماده خشک خود برای بالا بردن وزن خشک پیدا کرد.

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۲- ضریب همبستگی صفات کالوس گیاه کاسنی.

Table 2. Correlation coefficient of chicory callus traits.

	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	(7)	(8)
(1) درصد کالوس‌دهی Percent of callus formation	1							
(2) وزن تر Fresh weight	0.706**	1						
(3) وزن خشک Dry weight	0.736**	0.947**	1					
(4) درصد ماده خشک Percent of dry matter	0.502**	0.557**	0.766**	1				
(5) درصد آب نسبی Relative water conten	0.633**	0.945**	0.913**	0.638**	1			
(6) فنل phenol	0.619**	0.546**	0.615**	0.643**	0.612**	1		
(7) فلاونوئید Flavonoid	0.674**	0.613**	0.685**	0.668**	0.661**	0.943**	1	
(۸) آنتی‌اکسیدان Antioxidant	0.638**	0.656**	0.722**	0.675**	0.705**	0.903**	0.96**	1

** معنی‌دار در سطح احتمال یک درصد.

** significant at 1% level.

نتیجه‌گیری کلی

نتایج پژوهش حاضر به‌طورکلی نشان داد که صفات مختلف کالوس‌زایی مانند درصد القای کالوس، وزن تر کالوس، وزن خشک کالوس، درصد ماده خشک، محتوای آب نسبی کالوس، میزان فنل، فلاونوئید و فعالیت آنتی‌اکسیدانی در هر ریزنمونه به ترکیب، نسبت و غلظت تنظیم‌کننده‌های رشد پاسخ متفاوتی نشان می‌دهند. در ریزنمونه‌های ساقه و دمبرگ به‌غیر از تیمار بدون هورمون در همه غلظت‌ها کالوس‌زایی مشاهده شد. ترکیب BA و NAA می‌تواند تیمار مناسب جهت القای کالوس در ریزنمونه‌های کاسنی باشد. در کل درصد کالوس‌زایی در ریزنمونه دمبرگ بیش‌تر ریزنمونه‌های از ساقه و برگ بود.

بیش‌ترین میزان فنل و فلاونوئید در محیط حاوی ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر BA و بدون کاربرد NAA در کالوس ریزنمونه دمبرگ مشاهده شد. تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی و به‌خصوص هورمون‌های گروه اکسین و سیتوکینین نقش بسیار مهمی در کنترل تقسیم و تمایز سلول‌های گیاهی بر عهده دارند، می‌توان گفت که BA در تمایز سلول‌های کالوس مؤثر بوده است. تیمارهای حاوی تنظیم‌کننده‌های رشد به‌کار رفته در ریزنمونه دمبرگ دارای بیش‌ترین میزان فنل و فلاونوئید است و با توجه به بالا بودن فعالیت‌های آنتی‌اکسیدانی در این تیمارها و وجود همبستگی مثبت و معنی‌دار بین آن‌ها، می‌توان آن را مربوط به تولید ترکیب‌های فنلی و فلاونوئیدی در سلول‌های این گیاه دانست. ریزنمونه ساقه نشان داد که میزان فلاونوئید در غلظت‌های مختلف تفاوت معنی‌داری با هم ندارند و می‌توان دریافت که افزایش فعالیت آنتی‌اکسیدانی نتیجه افزایش میزان فنل است.

www.SID.ir

Archive of SID

منابع

1. Abou-Arab, E.A. and Abu-Salem, F.M. 2010. Evaluation of bioactive compounds of *Stevia rebaudiana* leaves and callus. Afr. J. Food Sci. 4: 10. 627-634.
2. Al Khateeb, W., Hussein, E., Qouta, L., Alu'datt, M., Al-Shara, B. and Abu-Zaiton, A. 2012. In vitro propagation and characterization of phenolic content along with antioxidant and antimicrobial activities of *Cichorium pumilum* Jacq. Plant Cell, Tiss. Organ. Cult. 110: 1. 103-110.
3. Al-Snafi, A.E. 2016. Medical importance of *Cichorium intybus*–A review. IOSR J. Pharm. 6: 3. 41-56.
4. Amid, A., Johan, N.N., Jamal, P. and Zain, W.N.W.M. 2011. Observation of antioxidant activity of leaves, callus and suspension culture of *Justicia gendarusa*. Afr. J. Biotechnol. 10: 81. 18653-18656.
5. Chang, C.C., Yang, M.H., Wen, H.M. and Chern, J.C. 2002. Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. J. Food Drug Anal. 10: 3. 178-182.
6. Ebrahimzadeh, M.A., Pourmorad, F. and Hafezi, S. 2008. Antioxidant activities of Iranian corn silk. Turk. J. Biol. 32: 1.43-49.
7. Falleh, H., Ksouri, R., Chaieb, K., Karray-Bouraoui, N., Trabelsi, N., Boulaaba, M. and Abdelly, C. 2008. Phenolic composition of *Cynara cardunculus* L. organs, and their biological activities. C. R. Biol. 331: 5. 372-379.
8. Firoozie, T., Esmaeilzadeh Bahabadi, S., Fakheri, B.A. and Fahmideh, L. 2015. Increasing of flavone synthase gene expression and flavonoid compounds and antioxidant enzymes activity of *Cuminum cyminum* by salicylic acid. I. G. S. 10: 4. 497-506. (In Persian)
9. Hadizadeh, H., Mohebodini, M. and Esmaeilpoor, B. 2016. Effects of auxins on induction and establishment of adventitious and hairy roots culture of the medicinal plant chicory (*Cichorium intybus* L.). Iranian J. Med. Arom. Plant. 32: 3. 389-397. (In Persian)
10. Hasanloo, T., Rezazadeh, S. and Rahnama, H. 2009. Hairy roots as a source for production of valuable pharmaceutical materials. J. Med. Plants. 8: 29. 1-190.
11. Hegazi, G.A.E. and El-Lamey, T.M. 2011. In vitro production of some phenolic compounds from *Ephedra alata* Decne. J. Appl. Environ. Biol. Sci. 1: 8. 158-163.
12. Ji, A., Geng, X., Zhang, Y. and Wu, G. 2011. Advances in somatic embryogenesis research of horticultural plants. Am. J. Plant Sci. 2: 06.727.
13. Keramat, B. and Daneshmand, F. 2012. Dual role of methyl jasmonate in physiological responses of soybean (*Glycine max* L.) plant. J. Plant Proc. Func. 1: 1. 26-38. (In Persian)
14. Soleimani, T., Keyhanfar, M., Piri, Kh. and Hanloo, T. 2014. Callus induction in Burdock (*Arctium lappa* L.). J. Cell Mol. Med. 27: 2. 252-259. (In Persian)
15. Khan, T., Krupadanam, D. and Anwar, S.Y. 2008. The role of phytohormone on the production of berberine in the calli cultures of an endangered medicinal plant, turmeric (*Coscinium fenestratum* L.). Afr. J. Biotechnol. 7: 18. 3244-3246.
16. Koohi, L., Zare, N., Asghari-Zakaria, R. and SheikhZadeh-Mosaddegh, P. 2014. The effect of plant growth regulators and different explants on the response of tissue culture and cell suspension cultures of german chamomile (*Matricaria chamomilla* L.). Agric. Sci. 8: 2. 30. 203-214. (In Persian)
17. Mahmood, I., Razzaq, A., Khan, Z.U., Hafiz, I.A. and Kaleem, S. 2012. Evaluation of tissue culture responses of promising wheat (*Triticum aestivum* L.) cultivars and development of efficient regeneration system. Pak. J. Bot. 44: 1. 277-284.
18. Mastuti, R., Munawarti, A. and Firdiana, E.R. 2017. The combination effect of auxin and cytokinin on in vitro callus formation of *Physalis angulata* L. A medicinal plant. AIP Conf. Proc. 1908: 040007. 1-6.

www.SID.ir

Archive of SID

19. Mehrabani, B., Nazeri, S. and Piri, Kh. 2014. Effect of BA and NAA hormones on shoot regeneration and total phenol and flavonoied compounds of chaei koohi (*Stachy slavandulifolia* Vahi.) in vitro culture. Agric. Biotechnol. 4: 1. 1-9. (In Persian)
20. Mortazavi, R., Dehdari, M. and Masoumiasl, A. 2016. Study of Callus Induction of Medicinal Chavil Plant (*Ferulago angulata* B.) Using Types of Explants and Growth Regulators. Agric. Biotechnol. 6: 2. 73-80. (In Persian)
21. Murashige, T. and Skoog, F. 1962. A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. Physiol. Plant. 15: 3. 473-497.
22. Pasternak, T., Miskolczi, P., Ayaydin, F., Mészáros, T., Dudits, D. and Fehér, A. 2000. Exogenous auxin and cytokinin dependent activation of CDKs and cell division in leaf protoplast-derived cells of alfalfa. Plant Growth Regul. 32: 2-3. 129-141.
23. Ranjitha Kumari, B.D., Velayutham, P. and Anitha, S. 2007. A comparative study on inulin and esculin content of in vitro and in vivo plants of Chicory (*Cichorium intybus* L. cv. Lucknow Local). Adv. Biol. Res. 1: 1-2. 22-25.
24. Rao, S.R. and Ravishankar, G.A. 2002. Plant cell cultures: chemical factories of secondary metabolites. Biotechnol. Adv. 20: 2. 101-153.
25. Ravandi, E.G., Rezanejad, F. and Dehghan, E. 2014. In vitro regeneration ability of diploid and autotetraploid plants of *Cichorium intybus* L. Cytol. genet. 48: 3. 166-170.
26. Rehman, R.U., Israr, M., Srivastava, P.S., Bansal, K.C. and Abdin, M.Z. 2003. In vitro regeneration of witloof chicory (*Cichorium intybus* L.) from leaf explants and accumulation of esculin. In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant. 39: 2. 142-146.
27. Rostami, R., Abrishamchi, P. and Lahoti, M. 2011. Callus induction and plant regeneration from meristem culture of potato (*Solanum tuberosum* L.). Mater. Energy. 10: 4. 1011-1032. (In Persian)
28. Salaripour, S., Karimzadeh, G., Moieni, A. and Tarkesh Esfahani, S. 2016. Production of cell suspensions from oriental tobacco (*Nicotiana tabacum*) cultivars for cell line development. J. Agric. Biotechnol. 6: 2. 1-11. (In Persian)
29. Shariatifar, N., Kamkar, A., Shams Ardekani, M., Misaghi, A., Jamshidi, A.H. and Jahed Khaniki, Gh. 2012. Quantitative and qualitative study of phenolic compounds and antioxidant activity of plant *Pulicaria Gnaphalodes*. J. Gonabad Univ. Med. Sci. 18: 1. 35-42. (In Persian)
30. Sun, Y.L. and Hong, S.K. 2010. Effects of plant growth regulators and L-glutamic acid on shoot organogenesis in the halophyte *Leymus chinensis* (Trin.). Plant Cell, Tissue Organ Cult. 100: 3. 317-328.
31. Tadhani, M.B. and Subhash, R. 2006. In vitro antimicrobial activity of *Stevia rebaudiana* Bertoni leaves. Trop. J. Pharm. Res. 5: 1. 557-560.
32. Velayutham, P., Ranjithakumari, B.D. and Baskaran, P. 2006. An efficient in vitro plant regeneration system for *Cichorium intybus* L. an important medicinal plant. J. Agric. Technol. 2: 2. 287-298.
33. Zebarjadi, A.R., Motamedi, M.J., Taravat, E. and Ismaili, A. 2013. Micropropagation of medicinal purple coneflower (*Echinacea purpurea* L.) using cotyledon and hypocotyl segments. J. Plant Res. 26: 3. 311-319. (In Persian)
34. Zia, M., Mannan, A. and Chaudhary, M.F. 2007. Effect of growth regulators and amino acids on artemisinin production in the callus of *Artemisia absinthium*. Pak. J. Bot. 39: 2. 799-805.

www.SID.ir