اثر هورمون‌های BA و NAA بر کشت نوساقه و میزان فنول و فلاونوئید کل در گیاه چای کوهی (*Stachys lavandulifolia* Vahi.) در شرایط درون شیشه‌ای

Effect of BA and NAA Hormones on Shoot Regeneration and Total Phenol and Flavonoied Compounds of Chaei Koohi (*Stachys lavandulifolia* Vahi.) *in Vitro* Culture

بیلال مهربانی[۱]، سنبل ناظری[۲*] و خسرو پیری[۳]

تاریخ دریافت: ۹۰/۱۲/۰۱ تاریخ پذیرش: ۹۱/۱۰/۱۶

چکیده

تولید متابولیت‌های ثانویه با استفاده از روش‌های کشت بافت از جمله کشت سلول و اندام‌های گیاهی یک روش جایگزین مناسب برای بهره‌برداری از ترکیبات گیاهی است. با تغییر غلظت هورمونی در محیط‌های کشت بافت گیاهی می‌توان تولید متابولیت‌های ثانویه را از نظر کمی یا کیفی بهبود بخشید. چای کوهی با نام علمی *Stachys lavandulifulia*، یک گیاه دارویی مهم و بومی ایران است که در مناطق مختلف پراکندگی دارد. در این مطالعه، اثر سطوح مختلف هورمون BA به‌تنهایی یا در ترکیب با NAA در شرایط درون شیشه بر نوساقه‌زائی، میزان فنول و فلاونوئید کل در کشت شاخه بررسی گردید. نتایج حاصل از نوساقه‌زائی نشان داد که تفاوت معنی-داری بین محیط دارای BA به‌تنهایی و محیط BA+NAA وجود دارد. بیشترین میزان نوساقه در هر ریزنمونه در تیمار ۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر NAA به‌همراه ۰/۶ میلی‌گرم بر لیتر BA، برابر با میانگین ۱۱ عدد نوساقه در هر ریز نمونه، به‌دست آمد. اثر عامل NAA و اثر متقابل NAA و BA بر میزان فنول کل در سطح ۱ درصد معنی‌دار بود. بیشترین میزان فنول کل در تیمار ۰/۹ میلی‌گرم بر لیترBA و برابر با ۱/۰۴ میلی‌گرم گالیک‌اسید بر گرم وزن تر به‌دست آمد. در بررسی میانگین میزان فلاونوئید کل، تفاوت معنی‌دار بین محیط دارای BA به‌تنهایی و محیط BA+NAA در کشت شاخه مشاهده شد، در محیط بدون NAA میزان فلاونوئید بیشتری برابر با ۱/۶۶ میلی‌گرم کوئرستین بر گرم وزن تر به‌دست آمد. برای صفت میزان فلاونوئید کل، بهترین پاسخ از محیط‌کشت دارای BA به‌تنهایی به-دست آمد، در این محیط میزان فلاونوئید کل برابر با ۱/۶۶ میلی‌گرم کوئرستین بر گرم وزن تر بود.

واژه‌های کلیدی: چای کوهی، کشت درون شیشه‌ای، فنول و فلاونوئیدکل

۱. فارغ التحصیل کارشناسی ارشد گروه بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه بوعلی‌سینا، همدان
۲. استادیار گروه بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه بوعلی‌سینا، همدان
۳. دانشیار گروه بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه بوعلی‌سینا، همدان
*: نویسنده مسوول Email: Snblnazeri@ yahoo.com

مقدمه

خانواده نعنائیان با ۲۲۰ جنس و ۴۰۰ گونه در دنیا تقریباً دارای پراکنش جهانی هســـتند و یکی از بزرگ‌ترین و مهم‌ترین خانواده‌های گیاهی محسوب می‌شود. در ایران ۴۶ جنس و۴۱۰ گونه و زیرگونه از این خانواده گزارش شده است. تعداد ۲۷۰ گونه از جنس Stachys متعلق به خانواده نعنائیان گزارش شده است که در ایران ۳۴ گونه از آن وجود دارد که از این تعداد ۱۳ گونه بومی هستند *مظفریان* Mozaffarian, (1996). گونه‌های این جنس در طب سنتی قدیم در درمان تومورهای جنسی، تصلب شرائین، التهاب و سرطان معده مورد استفاده قرار گرفته است. این جنس اثر آرام‌بخشی داشته و دارای خواص ضد باکتری، ضدالتهاب، ضداسترس و اضطراب می‌باشد *جاویدنیا* و همکاران (Javidnia *et al*. 2004). فلاونوئیدها، کوئینون‌ها، اسیدهای فنولیک و دی‌ترپن‌ها متابولیت‌های ثانویه موجود در گونه‌های مختلف این جنس هستند. چای کوهی یکی از گیاهان مهم این خانواده است که بومی ایران می‌باشد و در بسیاری از مناطق مانند همدان، کردستان، لرستان و ... دیده می‌شود *باباخانلو و سفیدکن* - (Babakhanlo and SefidKon, 1998). این گیاه در ایران با نام‌های چای کوهی، گل کفته، کرک خرگوش و توکلیجه و در زبان انگلیسی به نام Betony معروف است *کلوندی* (Kalvandi, 2003). از دم‌کرده بخش‌های هوایی این گیاه در ناراحتی‌های معدی و همچنین به‌عنوان آرام‌بخش، رفع بی‌خوابی و اضطراب استفاده می‌گردد. اثرات درمانی، آرام‌بخشی، ضداسترس و ضدالتهاب این گیاه به ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی آن که بخشی از متابولیت‌های ثانویه با فعالیت آنتی‌اکسیدانی هستند نسبت داده می‌شود *ربانی* و همکاران (Rabbani, *et al*. 2005). تولید متابولیت‌های ثانویه ارزشمند با استفاده از تکنیک‌های بیوتکنولوژی در کشت سلول و اندام‌های گیاهی یک روش جایگزین مناسب برای بهره‌برداری از ترکیبات گیاهی است. ازکشت‌بافت گیاهی (اندام) به‌منظور اصلاح و یا تغییر کمی و کیفی تولید متابولیت‌های ثانویه (با تغییر در مواد مغذی و شرایط هورمونی در محیط‌کشت) با هدف بررسی میزان ترکیبات مؤثر درگیاه استفاده می‌شود *آفونسو* و همکاران (Affonso *et al*. 2009).

عوامل مختلفی بر تولید و انباشته شدن متابولیت‌های ثانویه از طریق کشت بافت مؤثر هستند که برخی از آنها عبارتند از: هورمون‌های گیاهی، لاین‌های سلولی پرمحصول، میزان مواد غذایی، افزودن پیش ماده، محرک‌ها، بهینه‌سازی شرایط محیطی و عوامل داخلی محیط کشت *نامادئو* و همکاران (Namadeo *et al*. 2007). به‌عنوان مثال *چن* و همکاران (Chen *et al*. 2003) با تغییر نوع و غلظت هورمون، تولیدکروسین را در گیاه زعفران افزایش دادند. *حنفی* و همکاران (Hanafi *et al*. 2007) نیز مشاهده کردند که در کشت کالوس و نوساقه گیاه *Gypsophila Paniculata* نوع هورمون و غلظت به کار رفته بر میزان تولید ساپونین مؤثر بوده است. همچنین *رادی و نزیف* (Rady and Nazief, 2005) اثر مثبت نوع و غلظت‌های هورمونی را بر تولید رزمارینیک اسید در گیاه *Ocimum americanum* مشاهده نمودند.

به‌علت اینکه کشت درون شیشه‌ای یک روش مناسب و مهم برای تولید متابولیت‌های ثانویه با ارزش در اکثر گیاهان است *راویشاندرا* و همکاران (Ravishandra *et al*, 1999) در این تحقیق به بررسی نوساقه‌زایی، میزان فنول و فلاونوئید موجود در گیاه چای کوهی و اثر غلظت هورمونی بر این ترکیبات پرداخته شده است.

مواد وروش‌ها

مواد گیاهی

در پاییز ۱۳۸۸، ریزوم و بخش‌های هوایی گیاه چای کوهی، از باغ گیاهان دارویی دانشگاه بوعلی‌سینا همدان جمع‌آوری و در داخل گلدان در گلخانه کشت گردیدند. آبیاری گلدان‌ها دو روز یک بار انجام شد و پس از حدود یک ماه، ساقه‌های دارای جوانه جانبی با طول ۱/۵-۱ سانتی‌متر به‌عنوان ماده گیاهی مورد استفاده قرار گرفتند. ریزنمونه‌ها پس از انتقال به آزمایشگاه ابتدا با آب معمولی شستشو و سپس به‌مدت یک دقیقه با اتانول ۷۰٪ ضدعفونی شدند. ریزنمونه‌ها سپس با آب مقطر استریل شستشو و برای ادامه ضدعفونی در دو تیمار محلول هیپوکلرید سدیم ۱ یا ۲ درصد (کلر فعال حداقل ۵ درصد(v/v))، که محتوی سه قطره توین ۲۰ بود، به‌مدت ۱۰ دقیقه قرار گرفتند. در پایان جهت حذف کامل مواد ضدعفونی‌کننده، شستشوی نمونه‌ها سه نوبت با آب مقطر استریل انجام شد.

تهیه ریزنمونه و محیط‌کشت جهت القاء ساقه‌زایی

به‌منظور القاء ساقه‌زایی، ریزنمونه‌های محتوی دو جوانه جانبی، بر روی محیط‌کشت جامد با پایه ۱/۲MS *موراشیگ و اسکوگ* (Murashig and Skoog, 1962) حاوی غلظت‌های مختلف هورمون BA و NAA (۰/۱ میلی‌گرم در لیتر)، که به آن ۵۰ میلی‌گرم در لیتر میواینوزیتول، ۱۵ گرم در لیتر ساکارز و ۸

گرم در لیتر آگار اضافه شده بود، کشت شدند. از آنجا که در آزمایشات اولیه غلظت‌های بالاتر از یک میلی‌گرم در لیتر هورمون BA سبب از بین رفتن بافت‌های گیاهی می‌گردید، غلظت‌های ۰/۳، ۰/۶ و ۰/۹ میلی‌گرم در لیتر این هورمون جهت القا ساقه‌زایی مورد استفاده قرار گرفت. آزمایشات در قالب فاکتوریل با طرح پایه کاملاً تصادفی به‌منظور بررسی نوساقه‌زایی، میزان فنول و فلاونوئید کل انجام گرفت. سه نمونه در هر ظرف (حاوی ۳۰ میلی‌لیتر محیط) قرار گرفته و تیمارها در ۳ تکرار کشت شدند. سپس شیشه‌های حاوی نمونه به اتاق رشد (دمای ۲۴ درجه سانتی‌گراد و شرایط ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی) منتقل گردیدند. پس از بیست روز، پارامترهای تعداد نوساقه در هر نمونه و طول نوساقه اندازه‌گیری شدند. پس از بیست روز، ریزنوساقه‌ها به‌صورت تکی و یا چندتایی ظاهر شدند. نوساقه‌هایی که جوانه جانبی آن‌ها به‌راحتی قابل جداسازی بودند، به دو قسمت تقسیم و جهت تکثیر بیشتر مجدداً واکشت شدند. نوساقه‌های چندتایی به‌علت اینکه رشد کافی نداشتند، به همان صورت مجدداً به محیط‌های کشت قبلی منتقل می‌شدند تا به اندازه کافی رشد یابند. تجزیه آماری با استفاده از نرم‌افزار SAS و از آزمون چند دامنه دانکن برای مقایسه میانگین‌ها استفاده شد.

تهیه عصاره متانولی از نوساقه‌ها

ریزنمونه‌های نوساقه (پس از ۲ بار واکشت) جهت بررسی میزان فنول کل مورد بررسی قرار گرفتند. عصاره متانولی با استفاده از روش *اسلینکارد و سینگلتون* Slinkard and (Singleton, 1977) تهیه گردید. به این صورت که، ۵۰ میلی‌گرم از بافت تر (نوساقه) در ۲/۵ میلی‌لیتر متانول در داخل هاون له شد و به‌مدت ۲۴ ساعت در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد در حمام آب گرم به‌طور مداوم تکان داده شد و سپس در دور ۱۳۰۰۰ به‌مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفوژ گردید. محلول رویی حاوی عصاره متانولی در فریزر در دمای ۲۲- درجه سانتی‌گراد تا زمان استفاده، نگهداری شد.

تعیین میزان فنول کل عصاره‌های حاصل از نوساقه

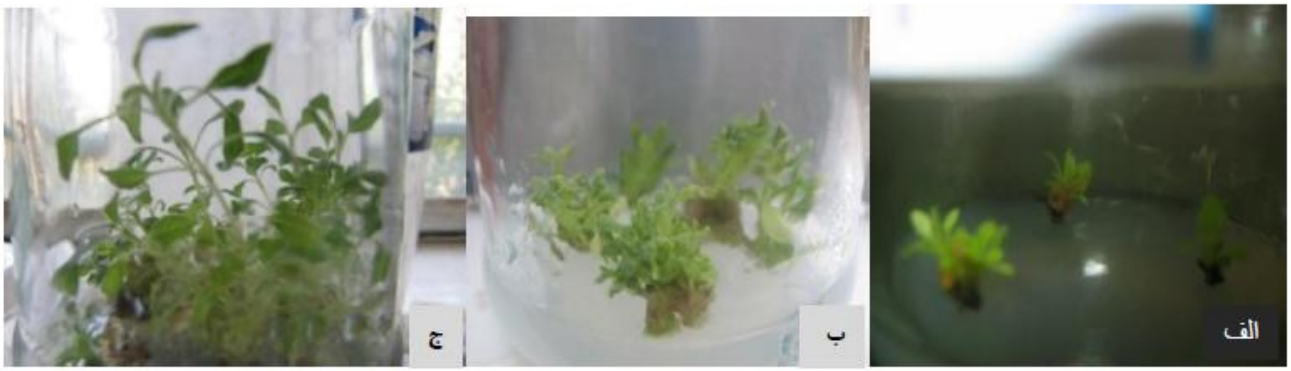
فنول کل توسط شناساگر فولین سیوکالتو و با استفاده از روش اسلینکارد و سینگلتون (۱۹۷۷) مشخص گردید. بدین‌منظور یک میلی‌لیتر متانول به یک میلی‌لیتر از عصاره‌ها اضافه شد. سپس مخلوط فوق با ۵ میلی‌لیتر آب مقطر و ۱ میلی‌لیتر شناساگر فولین مخلوط گردید. بعد از ۳ دقیقه، ۳ میلی‌لیتر کربنات سدیم ۲ درصد به آن اضافه شد و این مخلوط به‌مدت ۲ ساعت بر روی شیکر قرار گرفت. سپس میزان جذب در طول موج ۷۶۰ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر مدل *کاری- ۱۰۰ کونز* (Cary-100cons) اندازه‌گیری شد. منحنی استاندارد توسط غلظت‌های صفر، ۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰، ۲۰۰، ۲۵۰ میلی‌گرم بر لیتر از محلول اسیدگالیک تهیه گردید ($y=۰/۰۰۵X + ۰/۰۰۷$، $R^2 = ۰/۹۷۷$). مقدار فنول کل معادل با میلی‌گرم اسیدگالیک بر گرم وزن تر بیان شد.

تعیین میزان فلاونوئید کل از ریزنمونه‌های نوساقه

روش کلریدآلومینیوم برای مشخص کردن فلاونوئیدها استفاده شد *پورمراد* و همکاران (Pourmorad *et al*, 2006). بدین‌صورت که ۰/۵ میلی‌لیتر از عصاره گیاه با ۱/۵ میلی‌لیتر متانول، ۰/۱ میلی‌لیتر کلریدآلومینیوم ۱۰ درصد، ۰/۱ میلی‌لیتر استات‌پتاسیم ۱ مولار و ۲/۸ میلی‌لیتر آب مقطر مخلوط گردید. مخلوط‌ها به‌مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق قرار داده شدند. جذب مخلوط واکنش در ۴۱۵ نانومتر توسط اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری شد. محلول کوئرستین با غلظت‌های ۱۲/۵، ۲۵، ۵۰، ۷۵ و ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر متانول جهت تهیه منحنی استاندارد تهیه گردید ($y=۰/۰۱x- ۰/۰۳۹$، $R^2 = ۰/۹۹۲$). مقدار فلاونوئید کل نمونه‌ها معادل با میلی‌گرم کوئرستین بر گرم وزن تر بررسی شد.

نتایج

ضدعفونی نمونه‌ها در محلول ۲ درصد هیپوکلریت‌سدیم سبب تغییر رنگ بافت‌ها از سبز به سبز روشن و سپس بی‌رنگ گردید و در نهایت منجر به مرگ بافت‌ها شد. رنگ ظاهری بافت در نمونه‌هایی که در هیپوکلریت‌سدیم ۱ درصد ضدعفونی شدند تغییری پیدا نکرد و نوساقه‌ها ۶ روز بعد از انتقال جوانه‌های جانبی به محیط کشت حاوی غلظت‌های مختلف هورمونی ظاهر شدند (شکل ۱).



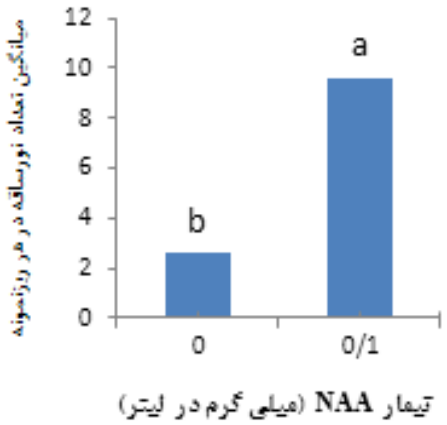
شکل۱: القاء نوساقه در الف) ۶ ، ب) ۱۰ و ج) ۲۰ روز پس از کشت جوانه جانبی در محیط‌کشت
Fig. 1: Microshooting at a) 6, b) 10 and c) 20 days after axillary shoot culture

بررسی اثر هورمون بر نوساقه‌زایی

نتایج نوساقه‌زایی به‌صورت آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی مورد بررسی قرار گرفت (جدول ۱). میزان نوساقه‌زایی در اثر عامل هورمون BA معنی‌دار نبود، با این حال، بیشترین تعداد نوساقه در غلظت ۰/۶ میلی‌گرم در لیتر BA با میانگین تعداد ۶/۶۶ نوساقه در هر ریزنمونه به‌دست آمد و با افزایش غلظت هورمون به ۰/۹ میلی‌گرم در لیتر، میانگین تعداد نوساقه در هر ریزنمونه از۶/۶۶ به ۵/۸ کاهش پیدا کرد. اثر عامل هورمونی NAA در میزان تولید نوساقه در سطح ۵ درصد معنی‌دار بود (شکل ۲). در بررسی اثر متقابل BA و NAA اختلاف معنی‌داری بین تیمارها مشاهده نگردید (جدول ۱). بیشترین تعداد نوساقه در تیمار (BA ۰/۶+۰/۱NAA میلی‌گرم در لیتر) با میانگین ۱۱ عدد نوساقه در هر ریزنمونه به‌دست آمد.

در بررسی اثر عوامل هورمونی BA و NAA، تفاوت معنی-دار در سطح ۵ درصد، در طول نوساقه مشاهده گردید، با این وجود اثر متقابل آنها معنی‌دار نبود (جدول ۱). در حضور BA متوسط طول نوساقه در غلظت ۰/۳ میلی‌گرم در لیتر برابر ۲/۶ سانتی‌متر به‌دست آمد، اما با افزایش غلظت هورمون BA از ۰/۳ به ۰/۹ میلی‌گرم در لیتر طول نوساقه به ۱/۷۵ سانتی‌متر کاهش پیدا کرد (شکل ۳).

در بررسی اثر محیط حاوی هورمون BA به تنهایی در مقایسه با محیط حاوی هر دو هورمون (BA+NAA) در طول نوساقه، تفاوت معنی‌دار مشاهده گردید (شکل ۴). میانگین طول نوساقه در محیط‌های BA به‌تنهایی۲/۷۲ سانتی‌متر بود، در حالی‌که در محیط حاوی هر دو هورمون (BA+NAA) به ۲ سانتی‌متر رسید.



شکل ۲: اثر حضور هورمون NAA (۰/۱ میلی‌گرم در لیتر) در محیط حاوی BA بر تعداد نو ساقه در هر ریز نمونه
حروف متفاوت در سطح ۵٪ دارای تفاوت معنی‌دار هستند
Fig. 2: Effect of NAA (0.1 mg/lit) along with BA on number of micro shoot
The different letters are significantly different (p< 0/5)

جدول ۱: تجزیه واریانس نوساقه‌زایی و طول نوساقه در قالب آزمایش فاکتوریل با طرح پایه کاملاً تصادفی. غلظت‌های هورمونی مورد استفاده شامل: ۰/۳، ۰/۶ و ۰/۹ میلی‌گرم در لیتر، BA؛ صفر و ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر NAA

Table 1: Analytical variance of micro propagation and length of micro shoots in the experimental factorial based on randomized complete design. Hormonal concentration consisted of: 0.3, 0.6, 0.9 mg/lit BA ; 0 and 0.1 mg/lit NAA.

ارزش F F value		میانگین مربعات Mean of squares		درجه آزادی	منبع تغییرات
صفت b	صفت a	صفت b	صفت a	df	Source of variation
4.17^{*}	0.19^{ns}	1.8	1.6	2	عامل هورمونیBA
5.83^{*}	08.39^{**}	2.34	22.5	1	عامل هورمونی NAA
1.69^{ns}	1.66^{ns}	0.68	10.16	2	اثر متقابل BA*NAA
	.....	0.402	6.11	12	خطا

**: در سطح ۱٪ تفاوت معنی‌دار است (Significant p< 0.1) *: در سطح ۵٪ تفاوت معنی‌دار است (Significant p< 0.5) ns: تفاوت معنی‌دار نیست (Non-significant). صفت a : تعداد نوساقه در هر نمونه، صفت b: طول نوساقه بر حسب سانتی‌متر

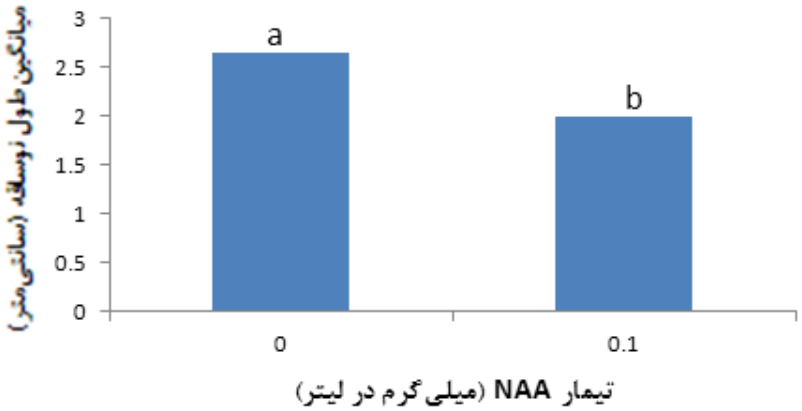
**:significantly different at 1%, *: significantly different at 5%. ، ns:non-significantly different. a: number of micro shoot in each sample, b : microshoot length in centimeter

شکل ۳: اثر عامل هورمونی BA بر طول نوساقه (بر حسب سانتی‌متر)

حروف متفاوت در سطح ۵٪ دارای تفاوت معنی‌دار هستند

Fig. 3: Effect of BA on length of micro shoot

The different letters are significantly different(p< 0.5)



شکل ۴: اثر عامل هورمون NAA (۰/۱ میلی‌گرم در لیتر) در محیط حاوی BA بر طول نوساقه (سانتی‌متر)
حروف متفاوت در سطح ۵٪ دارای تفاوت معنی‌دار هستند
Fig. 4: Effect of NAA (0.1 mg/lit) along with BA on length of micro shoot (centimeter)
The different letters are significantly different($p< 0.5$)

بررسی اثر هورمون بر میزان فنول وفلاونوئید کل در اندام (نوساقه)

میزان فنول کل

نتایج به‌دست آمده از عصاره متانولی نوساقه به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی تجزیه شد. در تجزیه واریانس صورت گرفته، اثر عامل NAA و اثر متقابل NAA و BA بر میزان فنول کل در سطح ۱ درصد معنی‌دار بود (جدول ۲). با توجه به معنی‌دار بودن اثرات متقابل، مقایسه میانگین صورت گرفت. در محیط حاوی هورمون BA، با افزایش غلظت BA از ۰/۳به ۰/۹ میلی‌گرم در لیتر میانگین میزان فنول کل از ۰/۸۶ به ۱/۰۴ میلی‌گرم گالیک‌اسید بر گرم از بافت تر افزایش پیدا کرد. اما زمانی کهBA همراه با NAAبه کاربرده شد، با افزایش غلظت BA از ۰/۳ به ۰/۹ میلی‌گرم در لیتر، میزان فنول کل از ۰/۶۹ به ۰/۴ کاهش پیدا کرد. بررسی اثرات متقابل هورمون‌های BA و NAA نشان داد، بیشترین میزان میانگین فنول مربوط به تیمار BA با ۰/۹ میلی‌گرم بر لیتر و کمترین مقدار آن مربوط به تیمارBA۰/۹+NAA۰/۱(میلی‌گرم بر لیتر) بود، که به‌ترتیب برابر ۱/۰۴ و ۰/۴ بر حسب میلی‌گرم گالیک‌اسید بر گرم وزن تر بود (شکل ۵). میزان فنول در محیط بدون هورمون در تجزیه آماری استفاده نشد، میانگین میزان فنول کل در این تیمار برابر ۰/۹۱ میلی‌گرم گالیک‌اسید بر گرم وزن تر به‌دست آمد.

جدول۲: تجزیه واریانس میزان فنول و فلاونوئید کل تحت تأثیر میزان هورمون‌های BA وNAA
Table 2: Analytical variance of total phenol and flavonoid on the effect of BA and NAA hormones

منبع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات		ارزش F	
		فنول	فلاونوئید	فنول	فلاونوئید
BA	2	0.0081	0.0094	2.35^{ns}	0.58^{ns}
NAA	1	0.82	0.8039	235.31^{**}	49.67^{**}
اثر متقابلNAA*BA	2	0.082	0.0092	23.66^{**}	0.29^{ns}
خطا	12	0.034	0.016	....	...

**: در سطح ۱٪ تفاوت معنی‌دار است (Significant at $p< 0.01$), ns: تفاوت معنی‌دار نیست (Not-Significant)

**: significantly different at 1% , ns: non-significantly different.

میزان فلاونوئید کل

نتایج حاصل از عصاره متانولی نوساقه به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی مورد ارزیابی قرار گرفت (جدول ۲). تنها میانگین میزان فلاونوئید برای عامل هورمونی NAA معنی‌دار بود. محیط‌های فاقد هورمون NAA با میزان ۱/۶۶ میلی‌گرم کوئرستین بر گرم وزن تر دارای میزان فلاونوئید بیشتری نسبت به محیط‌های حاوی۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر NAA (۱/۲۴ میلی گرم کوئرستین برگرم وزن تر) بود (شکل۶). اثر تیمار بدون هورمون در تجزیه آماری استفاده نشد. میانگین میزان فلاونوئید کل در آن برابر ۱/۲۷ میلی‌گرم کوئرستین بر گرم وزن تر به‌دست آمد.

بحث

نوساقه‌زایی

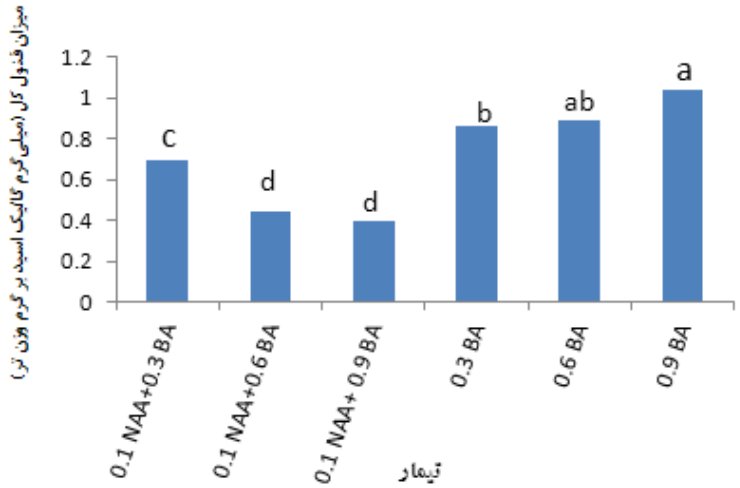
نتایج اثر هورمون بر نوساقه‌زایی در گیاه چای کوهی نشان داد که حضور سیتوکینین BA باعث افزایش نوساقه‌زایی در جوانه-های جانبی و غلبه بر غالبیت انتهایی گیاه گردید. همچنین حضور BA همراه با NAA افزایش معنی‌داری بر نوساقه‌زایی نشان داد. افزایش غلظت هورمون BA از ۰/۳ به ۰/۶ در ترکیب با NAA باعث افزایش در تعداد نوساقه شد، اما افزایش غلظت BA (بدون حضور NAA) سبب کاهش تعداد نوساقه در هر نمونه شد. با توجه به نتایج ذکر شده به نظر می‌رسد که NAA نقش مؤثری در کمک به BA در مکانیزم غالبیت انتهایی داشته باشد. *قانتی* و همکاران (Ghanti *et al*, 2004) گزارش کردند که سیتوکینین‌ها به‌ویژه BA با غلبه بر غالبیت انتهایی باعث بیدارشدن جوانه‌های جانبی از خواب می‌گردند. این گروه دریافتند که در مقایسه اثر BA به تنهایی و در ترکیب با NAA، ترکیب دو هورمون به‌طور معنی‌دار سبب افزایش تعداد نوساقه در هر نمونه شد. *اوانا* و همکاران (*Oana et al*, 2008) گزارش کردند که بیشترین میزان نوساقه‌زایی در محیط حاوی غلظت‌های کمتر از ۱ میلی‌گرم در لیتر BA همراه با ۰/۰۵ میلی‌گرم در لیتر NAA به‌دست آمد. این محققین همچنین گزارش کردند که افزایش غلظت BA باعث کاهش در تعداد نوساقه و نکروزه‌شدن گیاهچه می‌گردد. در نتایج تحقیق حاضر نیز افزایش غلظت BA کاهش در تعداد نوساقه را به‌دنبال داشت، اما علائم نکروزه‌شدن مشاهده نشد. اختلاف در نکروزه‌شدن احتمالاً ناشی از تفاوت سطح هورمونی مورد استفاده در این تحقیق است. *سونیتا* و همکاران (*Sunita et al*, 2005) میزان نوساقه‌زایی در محیط حاوی BA (۰/۵ تا ۲ میلی‌گرم در لیتر) را مورد بررسی قرار دادند. آنها مشاهده کردند که افزایش غلظت BA باعث افزایش تعداد نوساقه در هر نمونه شد. یافته‌های حاصل از این تحقیق با نتایج ما مطابقت داشت. *سانتوس گوم* و همکاران (Santos- *et al*, 2003 Gomes)، در مطالعاتی که بر روی کشت نوساقه جوانه‌های جانبی گیاه مریم گلی داشتند، دریافتند که حضور BA همراه با 2,4-D به‌عنوان اکسین به‌طور معنی‌داری سبب افزایش در تولید نوساقه می‌گردد. با توجه به نتایج تحقیق ذکر شده به-نظر می‌رسد حضور اکسین در کنار سیتوکینین برای رسیدن به حداکثر نوساقه‌زایی مؤثر است.

نتایج اثر هورمون بر طول نوساقه در گیاه چای کوهی نشان داد که حضور اکسین NAA در کنار BA طول نوساقه را کاهش داد. همچنین افزایش غلظت عامل هورمونی BA سبب کاهش طول نوساقه شد. *سونیتا* و همکاران (2005) طول نوساقه در گیاه *Podophyllum hexandrum* را در حضور هورمون BA (۰/۵ تا ۲ میلی‌گرم در لیتر) مورد بررسی قرار دادند. آنها مشاهده کردند که افزایش غلظت BA باعث کاهش طول نوساقه شد. نتایج این تحقیق با نتایج تحقیق حاضر مطابقت دارد. *آریکات* و همکاران (Arikat *et al*, 2004) تکثیر گیاه مریم گلی را از طریق جوانه جانبی در غلظت‌های مختلف BA مورد بررسی قرار دادند. آنها دریافتند که افزایش اولیه غلظت BA باعث افزایش رشد طول نوساقه، و افزایش بیشتر آن سبب کاهش طول نوساقه می‌گردد. *راجا* و همکاران (Raja *et al*, 2008) در کشت جوانه‌های جانبی نعناع در غلظت‌های ۴-۱ میلی‌گرم در لیتر BA دریافتند که افزایش تدریجی غلظت BA تا ۳ میلی‌گرم در لیتر سبب افزایش طول نوساقه می‌گردد و افزایش بیشتر غلظت BA سبب کاهش طول نوساقه می‌شود. همچنین *قانتی* و همکاران (۲۰۰۴) در بررسی اثر هورمون BA و NAA بر طول نوساقه در نعناع دریافتند که افزایش غلظت هورمون BA (بدون حضورNAA) سبب کاهش در طول نوساقه شد، که با نتایج ما مطابقت داشت. احتمالاً علت اثر منفی غلظت‌های بالای BA بر طول نوساقه آن است که افزایش غلظت سیتوکینین خارجی به علت اثر آنتاگونیستی که دارد از سنتز RNA وپروتئین‌ها ممانعت می‌کند، بنابراین از سنتز ایزوآنزیم‌های‌ایندول‌استیک اسیداکسیداز در سلول جلوگیری می‌کند و در نهایت منجر به کاهش سطح اکسین در سلول می‌شود که کاهش رشد و تقسیم سلولی را به‌دنبال دارد *لیم* و همکاران (Lim *et al*, 2009). همچنین *لیم* و همکاران (2009) تأکید کرده‌اند که هورمون‌های اضافه شده به محیط کشت، می‌توانند اثر

آنتاگونیست و سینرژیستی بر هورمون داخلی و در نتیجه عملکرد آنها داشته باشد.

میزان فنول کل

ترکیبات هورمونی مختلف بر تولید متابولیت‌های خاص در کشت بافت تأثیر می‌گذارند. از این هورمون‌ها می‌توان به‌منظور بررسی و تولید بیشتر ترکیبات فنولی با فعالیت آنتی‌اکسیدانی بالا استفاده کرد *تاویرا* و همکاران (Taveira *et al*, 2009). نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که در تیمار هورمونی BA (بدون NAA) میزان فنول بیشتری نسبت به کشت نوساقه در محیط حاوی هر دو هورمون (BA+NAA) تولید شد. *ساید* و همکاران(Sayd *et al*, 2010) گزارش کردند که BA در کشت نوساقه باعث افزایش میزان ترکیبات فنولی می‌گردد، نتایج فوق با نتایج تحقیق حاضر مطابقت داشت. با این حال *دانوا* و همکاران (Danova *et al*, 2010) گزارش کردند که حضور BA در کشت اندام (نوساقه) باعث کاهش میزان ترکیبات فنولی می گردد. همچنین *تاویرا* و همکاران (2009) بهترین میزان تولید ترکیبات فنولی را در *Brassica oleracea*، در محیط حاوی BA همراه با NAAگزارش کردند که نتایج این تحقیق با نتایج حاضر مطابقت نداشت. *مصطفی و ورپورت* (Mustafa and Verpoort, 2007) در بررسی انجام گرفته بر روی ترکیبات فنولی در کشت سلولی گیاه *Catharantu sroseus* این اختلاف را بدین صورت توضیح داده اند که نوع هورمون و غلظت آن، بسته به تعادل هورمونی و نوع گیاه، می‌تواند اثرات متفاوتی بر مسیرهای تولید متابولیت‌های ثانویه گذاشته و در نتیجه تجمع متفاوتی از این ترکیبات در گیاه داشته باشد.



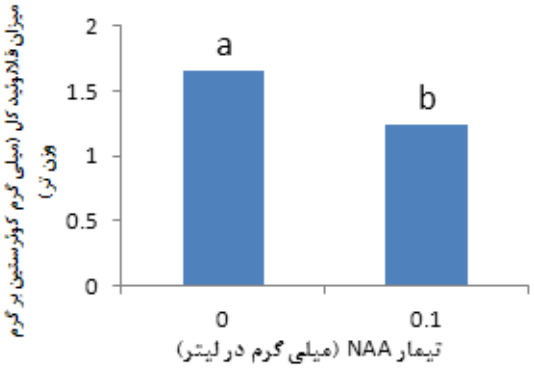
شکل ۵: نمودار مقایسه میانگین اثرات متقابل هورمون NAA و BA بر میزان فنول کل (میلی‌گرم گالیک اسید برگرم وزن تر) در ریزنمونه‌های نوساقه

حروف متفاوت دارای تفاوت معنی‌دار در سطح ۱٪ هستند

Fig. 5: Mean comparison of the interaction effects of NAA and BA on the amount of total phenol (mg Gallic acid equivalent/g fresh weight) in microshoot explants The different letters are significantly different P <0.01

میزان فلاونوئید کل

با توجه به نتایج تحقیق حاضر بیشترین میزان تولید ترکیبات فلاونوئیدی در گیاه چای‌کوهی زمانی به‌دست آمد که از BAبه‌تنهایی در محیط‌کشت استفاده شد و حضور NAA در کنارBA میزان آن را کاهش داد. *شیپاشری و راویشانکار* (Shipashree & Ravishankar, 2009) بر این عقیده هستند که تنظیم‌کننده‌های هورمونی اکسینی و سیتوکینینی، نقش مهمی در بیوسنتز ترکیبات فلاونوئیدی دارند. *ساید* و همکاران(2010) در بررسی اثر غلظت‌های مختلف BA در گیاه *Gardinia jasminiodes* بر میزان فلاونوئید، دریافتند که حضور BA باعث افزایش میزان فلاونوئید در کشت نوساقه شد. این نتایج با نتایج تحقیق حاضر مطابقت داشت. هر چند در تحقیق *چارکلوگلیان* و همکاران (Charcloglyan *et al*, 2007) بر روی اثر غلظت‌های مختلفBA همراه با NAA بر میزان هیپرفورین در کشت نوساقه، نشان داد که افزایش غلظت هر دو هورمون سبب افزایش این ترکیب، و حضور BA به‌تنهایی در کشت اندام نوساقه باعث کاهش ترکیب فلاونوئیدی گردید. مطالعات انجام گرفته در این زمینه علت را تا حد زیادی روشن کرده است به‌طور مثال *چارکلوگلیان* و همکاران (2007) به این نتیجه رسیدند که غلظت BA در داخل بافت‌های سلولی گیاه و برهم‌کنش آن با هورمون خارجی در مسیر بیوسنتز ترکیبات فلاونوئیدی مؤثر است. با توجه به تفاوت تعادل هورمونی که در گیاهان وجود دارد اثر غلظت هورمون خارجی می‌تواند اثرات متفاوتی بر تولید متابولیت‌های ثانویه داشته باشد. مطالعات *مصطفی و ورپورت* (2007) نیز نشان داد که اکسین و سایتوکینین به‌تنهایی و یا در کنار هم اثرات متفاوتی در بیوسنتز متابولیت‌های ثانویه دارند. آنها به این نتیجه رسیدند که در استفاده توام یا مجزای این هورمون‌ها احتمالاً ترکیبات سیگنال متفاوتی در مسیرهای بیوسنتزی به‌کار گرفته می‌شود. همچنین مطالعات *جئونگ* و همکاران (Jeong *et al*, 2004) تاثیر هورمون های گیاهی در رونویسی DNA، با اثر بر تولید mRNA آنزیم‌های مسیرهای بیوسنتزی این ترکیبات، در تغییر غلظت متابولیت‌های ثانویه نشان داد.



شکل ۶: مقایسه میانگین اثر NAA بر میزان فلاونوئید کل(میلی‌گرم کوئرستین بر گرم وزن تر) در ریزنمونه‌های نوساقه

حروف متفاوت دارای تفاوت معنی‌دار در سطح ۱٪ هستند

Fig. 6: Mean comparison effect of NAA on the amount of total flavonoid (mg quersitin equivalent/g fresh weight) in microshoot explants

The different letters are significantly different P <0.01

جهت مطالعه منابع به صفحه‌های ۱-۲ متن انگلیسی مراجعه شود.