مقاله پژوهشی

مقایسه تأثیر الیسیتورهای عصاره میوه عناب (*Ziziphus jujube*) و اسید سالیسیلیک بر تولید رنگیزه زرد در کشت ریشه گیاه گلرنگ (*Carthamus tinctorius* L.)

راحله گرزی، فرانسواز برنارد* و محمدرضا قلمبران

گروه علوم گیاهی، دانشکده علوم و فناوری زیستی، دانشگاه شهید بهشتی، تهران، ایران

(تاریخ دریافت:۱۴۰۰/۰۴/۲۵، تاریخ پذیرش نهایی:۱۴۰۱/۰۵/۰۵)

چکیده

گیاه گلرنگ (*Carthamus tinctorius* L.) متعلق به خانواده Asteraceae دارای ترکیبات فلاونوئیدی مانند رنگیزه‌های کینوشالکونی است که خاصیت دارویی دارند. این رنگیزه‌ها در گل این گیاه فراوان هستند ولی دیده شده که ریشه این گیاه در شرایط *in vitro* توان تولید بالای این رنگیزه‌ها را دارد. یکی از راه‌های افزایش تولید ترکیبات ثانویه در کشت‌بافت استفاده از الیسیتورهای متفاوت است. در این مطالعه از عصاره میوه عناب و اسید سالیسیلیک (SA) به‌عنوان الیسیتور استفاده شد. ریشه‌های رشد کرده ابتدا در محیط‌کشت پایه موراشینگ و اسکوگ (MS) مایع برای تولید انبوه به‌صورت استاتیک کشت داده شدند. سپس ریشه‌ها همراه با عصاره میوه عناب (صفر، ۰/۰۱، ۰/۰۵، ۰/۱، ۰/۵ و ۱ درصد) و اسید سالیسیلیک (صفر، ۵۰۰ میکرومولار) واکشت داده شدند. بعد از ۲۰ روز رنگیزه‌های فلاونوئیدی زرد محیط و ریشه با روش اسپکتروفتومتری اندازه‌گیری شد و نتایج نشان داد که عصاره آبی میوه عناب از بافت ریشه در برابر پراکسیداسیون لیپید محافظت کرده و این امر سبب افزایش رشد ریشه‌ها و نیز افزایش رنگیزه زرد A و B در بافت ریشه شد اما این رنگیزه‌ها در محیط‌کشت آزاد نشدند. اما تیمار اسید سالیسیلیک، بر پراکسیداسیون لیپید اثر گذاشته که منجر به کاهش رشد و افزایش نشت رنگیزه‌های A و B در محیط‌کشت شد. بنابراین می‌توان نتیجه گرفت تیمار اسید سالیسیلیک برای افزایش مقدار رنگیزه‌های زرد رنگ نوع A و B بهتر از تیمار عصاره میوه عناب است.

کلمات کلیدی: الیسیتور، رنگیزه، اسید سالیسیلیک، عصاره میوه عناب، کشت درون شیشه‌ای و محیط MS

مقدمه

گیاه گلرنگ (*Carthamus tinctorius* L.) متعلق به خانواده Asteraceae و به‌دلیل وجود ترکیبات ثانویه فراوان، دارای خواص دارویی بسیاری از جمله درمان بیماری‌های عروق قلبی، عفونت میوکارد و تشکیل لخته خون در عروق مغزی، کاهش سطح کلسترول و ضد التهاب است (Wakayama *et al*., 1994; Kulkarni *et al*., 1997; Han *et al*., 2009). برخی از ترکیبات ثانویه گیاه گلرنگ شامل فلاونوئیدها، پلی‌استیلن‌ها، مشتقات سروتونین، استروئید، الکل‌های دو عاملی هستند (Gao *et al*., 2013). گلرنگ دارای ترکیبات فلاونوئیدی مانند کوئینوشالکونی است، از جمله ترکیبات رنگی فلاونوئیدی گلرنگ می‌توان رنگیزه‌های زرد و قرمز نام برد. رنگیزه‌های زرد که به کارتامیدین مشهورند، شامل:

*نویسنده مسؤل، نشانی پست الکترونیکی: F_bernard256@yahoo.fr

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2025-04-03]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1402.12.53.7.5]

hydroxysafflor ،hydroxysafflor yellow A ،Cartormin precarthamin tinctormin C ،safflor yellow B ،yellow B Meselhy) safflor yellow A و safflominC ،safflomin A .(*et al.*, 1993; Kazuma *et al.*, 2000; Yine *et al.*, 2000 رنگیزه قرمز کارتامین نام دارد. این رنگیزه‌ها ساختار –C–D–β– گلوکوپیرانوزیل کوئینوشالکون دارند و جز خانواده C–گلوکوزیل کوئینوشالکون فلاونوئیدها هستند (Tu *et al.*, 2016).

از رنگیزه‌های زرد رنگ که از عصاره آبی گلبرگ‌های گیاه گلرنگ به‌دست می‌آید می‌توان به Hydroxysafflor yellow A اشاره کرد. این رنگیزه به راحتی در آب حل می‌گردد و فرمول مولکولی آن $C_{27}H_{32}O_{16}$ بوده و دارای جرم مولکولی ۶۱۲/۵۳ g/mol است (Yoon, 2003).

یکی از رنگیزه‌های زرد رنگ که از عصاره آبی گلبرگ‌های گیاه گلرنگ بدست می‌آید رنگیزه Safflor yellow B است این رنگیزه که توسط کربن فعال جذب شده و سپس توسط پیریدین از کربن واجذب شده و حاصل پودر زرد رنگی است. این رنگیزه یک کینون شالکون است که از دو جز شالکون و سه واحد کربوهیدراتی تشکیل شده که همه از طریق کربن به صورت گلیکوزید درآمده‌اند این ترکیب دارای جرم مولکولی ۱۰۶۲ g/mol است (Takahshi *et al.*, 1984). تولید ترکیبات ثانویه در شیشه از طریق کشت‌بافت‌های گیاهی امکان‌پذیر است. استقرار موفّق لاین‌های سلولی منتهی به تولید درصد بالایی از ترکیبات ثانویه درکشت‌های سوسپانسیون سلولی شده به‌وسیله تعداد زیادی ازمحققین گزارش شده است (Tripathi and Tripathi, 2003). مواردی وجود دارد که مقدار ترکیبات موجود در سلول‌های کشت‌بافت شده خیلی بیشتر از مقدار آن در گیاه کامل است و یا حتی سلول‌های کشت‌بافت شده، ترکیباتی تولید می‌کنند که در گیاه اولیه تولید نمی‌شود. با توجه به سرعت تولید آهسته ترکیبات ثانویه در طبیعت و زمانبر بودن آن، ضروری به نظر می‌رسد که برای تولید سریع و انبوه ترکیبات ثانویه و مواد دارویی، از فنون کشت‌بافت گیاهی به‌طور بهینه استفاده شود. کشت‌بافت گیاهی یکی از مهم‌ترین تکنیک‌ها در راستای تولید صنعتی ترکیبات ثانویه در گیاهان دارویی است. برخی مزیت‌های تولید ترکیبات ثانویه از طریق کشت‌بافت شامل کنترل بهینه شرایط کشت، افزودن پیش‌سازهای موردنیاز برای افزایش بازده و تولید ترکیبات ثانویه خاص است. کشت‌بافت یکی از بخش‌های مورد توجه در بیوتکنولوژی است. تلاش‌های زیادی برای کشت سلول و کالوس گلرنگ به‌منظور تولید رنگیزه‌های زرد و قرمز صورت گرفته است (Gao *et al.*, 2000; Hanagata *et al.*, 1992; Hanagata and Karabe, 1994). تاکنون تمامی تحقیقات کشت بافت بر روی قسمت‌های هوایی گیاه گلرنگ انجام شده است. Bernard و همکاران در سال (۲۰۱۰) برای اولین بار موفق به افزایش تولید رنگیزه زرد از طریق کشت ریشه و خروج مقدار زیادی از آن به محیط‌کشت شده اند (Bernard *et al.*, 2010). یکی از زمینه‌های مورد توجه در کشت‌بافت استفاده از الیسیتور است که با تغییر متابولیسم گیاه می تواند منجر به تولید ترکیبات مورد نظر شود (Namdeo, 2007).

الیسیتورها ترکیباتی با منشا زیستی و یا غیرزیستی هستند که از طریق القای پاسخ‌های دفاعی در گیاه باعث بیوسنتز و انباشت ترکیبات ثانوی می‌شوند (Zhao *et al.*, 2005). الیسیتورها ممکن است ژن‌های جدیدی را فعال کنند که آنزیم‌ها و درنهایت مسیرهای بیوسنتزی مختلفی را راه‌اندازی کنند و باعث تشکیل ترکیبات ثانوی شوند. شروع پاسخ‌های دفاعی در گیاه شبکه‌ای از ترارسانی علامت را القاء می‌کند که با تشخیص مولکول‌های الیسیتور توسط پذیرنده‌ها شروع می‌شود. اسید سالیسیلیک متعلق به گروهی از ترکیبات فنلی است که به‌طور وسیعی در گیاهان وجود دارد و امروزه به‌عنوان ماده شبه‌هورمونی محسوب می‌گردد. این اسید نقش مهمی در رشدونمو گیاهان دارد و نیز یکی از مولکول‌های محرک مهم است. اسید سالیسیلیک سیستم دفاعی گیاه را از طریق فعال‌سازی گروه مشخصی از ژن‌های مرتبط با دفاع و توسعه مقاومت سیستمیک تحریک می‌کند. این اسید در تولید اسید رزمارینیک در کشت ریشه موئین گیاه . *Ocimum basilicum* L و کورکومین در کشت سلولی *roseus*

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2025-04-03]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1402.12.53.7.5]

Catharanthus مورد استفاده قرار گرفته است (Matkowaski, 2008). اسید سالیسیلیک تولیدی نقش محوری در تنظیم فرآیندهای فیزیولوژیکی مختلف مثل رشد، تکامل گیاه، جذب یون، فتوسنتز و جوانه‌زنی ایفا می‌کند (Tayeb, 2005; Popova *et al*., 2003)، اسید سالیسیلیک باعث تجمع آبسیزیک اسید و ایندول استیک اسید نیز می‌شود ولی بر روی سیتوکینین تأثیری ندارد. اسید سالیسیلیک گسترش، تقسیم و مرگ سلولی را تنظیم کرده، و در واقع بین رشد و پیری تعادل ایجاد می‌نماید (Popova *et al*., 1997). سالیسیلیک اسید به‌دلیل داشتن گروه o- هیدوکسیل‌آزاد روی حلقه بنزوئیک اسید، با شلاته‌کردن آهن موجود در آنزیم ACC اکسیداز موجب بلوکه‌کردن این آنزیم و درنهایت مهار بیوسنتز اتیلن می‌شود (Raskin, 1992). اثر اسید سالیسیلیک بر تنش وابسته به آن در مهار اتیلن است (Zhang *et al*., 2002).

گونه‌های Ziziphus خانواده Rhamnacae در نواحی وسیعی از آسیا، آفریقا و آمریکای جنوبی یافت می‌شود. گونه خاصی از آن با نام عناب (*Ziziphus jujuba*) در مناطق زیادی از ایران برای استفاده از میوه آن کشت می‌شود (Pawlowska *et al*., 2009; Al-Reza *et al*., 2009). از میوه گیاه عناب ترکیب‌های تری‌ترپنوئیدی، فلاونوئیدی و آلکالوئیدی تخلیص شده است، همچنین نوعی ترکیب فنیل گلیکوزیدی با عنوان ژوژوفنوزید نیز از میوه عناب به‌دست می‌آید (Cheng, 2000). بررسی‌ها نشان داده است که این گیاه دارای ترکیب‌های فعال بوده که اثر مهاری بر آزادسازی هیستامین، فعال‌شدن و فعال‌سازی کولین استراز II و I سیکلواکسیژنازهای دارند. علاوه بر این دارای اثرات سیتوتوکسیتی و فعال‌کردن سازگاری بیولوژیکی است. دانه عناب دارای مقادیر زیادی موسیلاژ، اسید مالیک، اسید سیتریک، مواد قندی، مواد پروتئینی، املاح آلی و ویتامین C است (Tavakoli and sedaghat, 1992; Cheng, 2000; Zhao, 2006). علاوه بر این تجزیه کیفی ترکیبات نشان داده است که در میوه Ziziphus جوجوبا (عناب) مقدار بالایی از ترکیبات آنتی‌اکسیدان مانند پلی‌فنل‌ها از قبیل تانن‌ها و فلاونوئیدها وجود دارد (Pawlowska *et al*., 2009; Al-Reza *et al*., 2009)، همچنین نقش کلیدی ترکیبات فنولیک در پاکسازی رادیکال‌های آزاد به اثبات رسیده است (Adzu *et al*., 2001; Guil-Guerreo *et al*., 2004; Pawlowska *et al*., 2009).

تاکنون مطالعه‌ای روی تأثیر عصاره عناب بر سلول‌های گیاهی و استفاده از آن به‌عنوان یک الیسیتور جهت افزایش تولید ترکیبات ثانویه، صورت نگرفته است. در این پژوهش برای اولین بار از عصاره میوه عناب جهت افزایش رشد ریشه‌های گلرنگ و نیز تولید رنگیزه‌ها، استفاده شد. هدف از این تحقیق، کشت ریشه گیاه گلرنگ در شرایط کشت درون شیشه‌ای در راستای افزایش تولید و خروج رنگیزه زرد به محیط‌کشت است. تأثیر الیسیتورهای عصاره میوه عناب و اسید سالیسیلیک به‌منظور افزایش تولید و خروج رنگیزه زرد که با کاهش کمتری در میزان رشد ریشه همراه باشد، در این تحقیق مورد مطالعه قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

پس از تهیه بذر گیاه گلرنگ (واریته گلدشت)، از مؤسسه اصلاح و تهیه نهال و بذر وزارت جهاد کشاورزی کرج، در زیر هود لامینار مدل JTLVC2، بذرها با کلرید جیوه ($HgCl_2$) ۰/۱ درصد (W/V) به‌مدت ۱۰- ۸ دقیقه ضدعفونی شدند، سپس با آب‌مقطر استریل سه بار شستشو داده شدند و برای کشت آماده شدند (Mandal *et al*., 2001). بذرهای استریل‌شده در محیط‌کشت پایه (MS) (Murashige and Skoog, 1962) جامد حاوی ۳۰ گرم بر لیتر ساکاروز و آگار ۰/۸ درصد با pH=۵/۸-۵/۷، به تعداد پنج عدد در یک شیشه و با فاصله کشت گردید (Carola *et al*., 1997). سپس شیشه‌ها به اتاق کشت با شرایط نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی، شدت نوری ۲۲۰۰ لوکس و دمای ۵ ±۲۵ درجه سانتی‌گراد منتقل شدند. تکثیر و انبوه‌سازی ریشه بر این اساس انجام شد، به این ترتیب که بعد از گذشت سه هفته از کشت بذر، ساقه‌های جوان از قسمت ریشه جدا شده و از آنها به‌عنوان منبع جدا کشت استفاده شد. ریشه‌های این گیاهچه‌های سه

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2025-04-03]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1402.12.53.7.5]

هفته‌ای نیز در محیط‌کشت MS مایع ساکن فاقد هورمون واکشت داده شد. ریشه‌های حاصل، جهت تیمار با الیسیتور مورد استفاده قرار گرفت (Waraporn *et al.*, 2007). بعد از آنکه رشد ریشه‌ها به حداکثر رسید و به‌طور یکنواخت در محیط‌کشت پخش شدند، در شرایط کاملاً استریل در زیر هود لامینار مقدار مشخصی از ریشه‌ها با وزن تر (g ۰/۵) به ۴ میلی-لیتر، محیط‌های MS مایع حاوی تیمارهای زیر منتقل شدند. برای هر غلظت چهار تکرار در نظر گرفته شد. تمامی تیمارها با شرایط یکسان در شیشه‌های حاوی ریشه‌های کشت‌شده در اتاق کشت با دمای ۲ ± ۲۵ درجه سانتی‌گراد و شرایط نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی زیر نور لامپ‌های فلوئورسنت (۲۲۰۰ لوکس) به‌مدت ۲۰ روز نگهداری شد.

تیمار اسید سالیسیلیک (SA): اسیدسالیسیلیک ($C_7H_6O_3$) با جرم مولی g/mol ۱۳۸/۱۲ از شرکت سیگما آلدریچ تهیه شد. جهت تهیه محلول استوک mM ۱۰ مقدار ۰/۰۲۷۶ گرم از اسید سالیسیلیک وزن شد و در بشر ۵۰ میلی‌لیتری که حاوی ۱۰ میلی‌لیتر آب‌مقطر بود ریخته شد. سپس محلول بدست آمده تقریبا به‌مدت نیم ساعت روی هیتر قرار داده شد. بعد از حل‌شدن اسید سالیسیلیک، محلول بدست آمده به حجم ۲۰ میلی‌لیتر رسانده شد. جهت تهیه غلظت ۵۰۰ میکرومولار SA، ۱/۵ میلی‌لیتر از محلول استوک برداشته و به حجم ۳۰ میلی‌لیتر با محیط MS رسانده شد. سپس غلظت‌های صفر، ۵۰۰ میکرومولار SA، از محلول استوک تهیه شدند و پس از انتقال ۴ میلی‌لیتر از غلظت‌های ساخته شده به شیشه‌های مخصوص کشت، با دستگاه اتوکلاو به‌مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد استریل شدند. به‌منظور بررسی اثر سید سالیسیلیک بر مقدار رنگیزه‌ها و پراکسیداسیون لیپید، در زیر هود لامینار، ۰/۵ گرم از ریشه‌ها به ۴ میلی‌لیتر محیط‌کشت MS مایع حاوی غلظت‌های صفر، ۵۰۰ میکرومولار SA منتقل شدند.

تیمار عصاره میوه عناب: ابتدا میوه خشک‌شده عناب، توسط آسیاب پودر شد. سپس ۲۰۰ گرم از پودر در ۵۰۰ میلی‌لیتر آب‌مقطر حل گردید. محلول بدست آمده از کاغذ صافی عبور داده شد. جهت تهیه محلول استوک ۱٪ در زیر هود لامینار، محلول بدست آمده توسط فیلتر با سایز ۰/۲۲ میکرومتر فیلتر شد. سپس ۱ میلی‌لیتر از محلول فیلترشده با محیط MS به حجم ۱۰۰ میلی‌لیتر رسانده شد که محلول استوک بدست آمد. با استفاده از محلول استوک، عصاره عناب با غلظت‌های صفر، ۰/۰۱، ۰/۰۵، ۰/۱، ۰/۵ و ۱ درصد تهیه شدند. ۰/۵ گرم از ریشه به‌منظور بررسی اثر عصاره میوه عناب بر مقدار رنگیزه‌ها و پراکسیداسیون لیپید در زیر هود لامینار به ۴ میلی‌لیتر محیط‌کشت MS مایع حاوی غلظت‌های صفر، ۰/۰۱، ۰/۰۵، ۰/۱، ۰/۵ و ۱ درصد عصاره میوه عناب، منتقل شدند.

با استفاده از ترازوی Sartorius مدل MA40, وزن تر ریشه‌های تیمار داده شده بعد از ۲۰ روز معلوم گردید و برای بررسی کاهش یا افزایش وزن تر با وزن ریشه‌های شاهد و وزن اولیه (g ۰/۵) مقایسه شد. برای اندازه‌گیری مقدار رنگیزه در ریشه‌ها، ۰/۱ گرم ریشه با ۱/۵ میلی‌لیتر متانول ۸۰٪، به‌مدت دو دقیقه در هاون چینی بر روی یخ هموژن شدند. عصاره‌های حاصل به‌مدت ۲۴ ساعت در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند و سپس با استفاده از دستگاه سانتریفوژ sigma مدل 2k25c با دور rpm ۴۰۰۰ به‌مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ گردید. سوپر ناتانت حاصل شده جدا گردید و جذب رنگیزه safflor yellow B در طول‌موج nm ۴۰۰ و رنگیزه hydroxysafflor yellow A در طول‌موج nm ۳۲۱ (دستگاه اسپکتروفتومتر مدل Specord 210) خوانده شد. ۲۰ روز پس از هر تیمار، محیط‌کشت MS مایع با سمپلر برداشته شده و برای آنالیز اسپکتروفتومتری در طول‌موج‌های ۳۲۱ و ۴۰۰ نانومتر استفاده شد. برای تهیه منحنی استاندارد ابتدا محلول‌هایی با غلظت‌های ۵، ۵۰، ۷۵، ۱۰۰، ۱۲۵ و ۱۵۰ میلی‌گرم بر لیتر برای رنگیزه ریشه و غلظت‌های ۱، ۲، ۳، ۴، ۵، ۵۰، ۷۵، ۱۰۰، ۱۲۵، ۱۵۰ میلی‌گرم با استفاده از استانداردهای خریداری‌شده از شرکت Tianjin تهیه شد. برای تهیه منحنی استاندارد رنگیزه موجود در ریشه و محیط‌کشت MS، رنگیزه استاندارد به‌ترتیب در متانول ۸۰٪ و محیط‌کشت MS حل

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2025-04-03]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1402.12.53.7.5]

گردید. سپس جذب محلول‌ها در طول‌موج‌های مربوط به هر رنگیزه خوانده شد و منحنی استاندارد با نرم‌افزار Excel 2010 رسم گردید. برای سنجش پراکسیداسیون لیپیدهای غشا، غلظت مالون دآلدئید MDA با روش Heath و Packer (۱۹۶۸) اندازه‌گیری شد. این پارامتر با توجه به تولید مالون دآلدئید و واکنش آن با تیوباربیتوریک اسید TBARS و تشکیل کمپلکس رنگی MDA-TBARS است که می‌توان با کمک اسپکتروفتومتری غلظت آن را اندازه‌گیری نمود. مطابق این روش ۱۰۰ میلی‌گرم از ریشه‌ها، در ۵ میلی‌لیتر تیوباربیتوریک اسید ۰/۱ درصد W/V هموژن شده و سپس مواد حاصله با دستگاه سانتریفیوژ در g ۱۰۰۰۰ به‌مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ گردیدند. به ۱ میلی‌لیتر از محلول رویی، ۴ میلی‌لیتر محلول ۲۰ درصد تری‌کلرو استیک اسید TCA که حاوی ۰/۵ درصد تیوباربیتوریک اسید بود اضافه شد. مخلوط حاصله به‌مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت و بلافاصله در یخ، سرد شد. سپس نمونه‌ها مجدداً در g ۱۰۰۰۰ به‌مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ و شدت جذب این محلول با استفاده از اسپکتروفتومتر در طول‌موج ۵۳۲ نانومتر خوانده شد. برای حذف اثر ترکیبات مزاحم، جذب نمونه‌ها در طول‌موج ۶۰۰ نانومتر از جذب نمونه‌ها در طول‌موج ۵۳۲ نانومتر کسر شد. غلظت کمپلکس MDA-TBARS با استفاده از معادله $A=\varepsilon bc$ محاسبه شد که در آن A جذب خوانده شده، ε ضریب خاموشی کمپلکس MDA-TBARS معادل $155\ mM^{-1}\ cm^{-1}$، b عرض کووت و c غلظت کمپلکس برحسب میلی‌مول بر گرم وزن تر گیاه است. مقدار MDA بدست آمده به‌صورت $n\ mol\ g^{-1}\ fw$ بیان گردید.

آزمایشات در قالب طرح کاملاً تصادفی (CRD) انجام شد. برای بررسی پیروی داده‌ها از توزیع طبیعی از آزمون Shapirowilk استفاده شد. جهت مقایسه نتایج از آنالیز واریانس یک طرفه (One way ANOVA) استفاده شد. برای مقایسه دو به دو میانگین‌ها از آزمون LSD استفاده گردید. آنالیزهای آماری با کمک نرم‌افزار SPSS 19 و سطح اطمینان ۹۵٪ انجام شد و نمودارها نیز توسط Excel 2010 رسم گردید.

نتایج

ریشه‌های تیمار داده شده با اسید سالیسیلیک نسبت به وزن اولیه (۰/۵ گرم) افزایش رشد نشان دادند، ولی نسبت به شاهد رشد خوبی نداشته و ریشه‌ها قهوه‌ای شدند و از کیفیت خوبی برخوردار نبودند اما این اختلاف نسبت به شاهد معنی‌دار نبود (شکل ۱).

غلظت‌های مختلف عصاره عناب تأثیرات متفاوتی بر وزن تر ریشه‌ها داشتند (شکل ۲). با مقایسه داده‌ها توسط آزمون LSD، غلظت‌های ۰/۵، ۰/۱ و ۰/۰۵ درصد، به‌طور میانگین ۲۴/۲۲٪ باعث افزایش معنی‌دار در رشد ریشه‌ها شدند و غلظت‌های ۰/۰۱ و ۱ درصد، افزایش معنی‌داری ایجاد نکردند. همان‌طورکه تیمار اسید سالیسیلیک با غلظت ۵۰۰ میکرومولار باعث افزایش مقدار کل رنگیزه زرد نوع A شده است، تأثیر معنی‌داری بر تولید این رنگیزه در ریشه نسبت به شاهد ایجاد کرد. درواقع ۶/۷۱٪ باعث افزایش مقدار این رنگیزه در ریشه شد (شکل ۲).

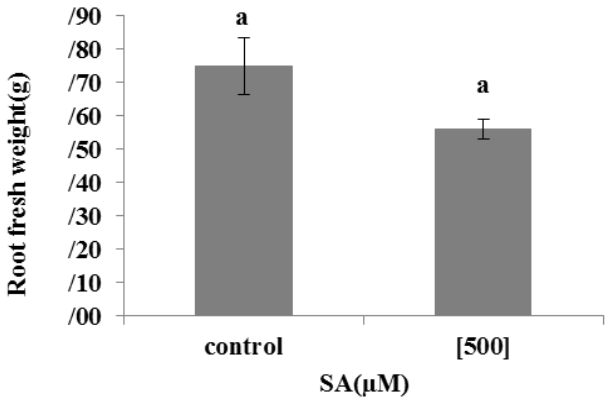
ریشه‌های تیمارشده با اسید سالیسیلیک اختلاف معنی‌داری بر مقدار رنگیزه زرد نوع A درمحیط نسبت به شاهد دارند (شکل ۳) و غلظت رنگیزه A در زیشه‌های گیاهان تیمارشده با اسید سالیسیلیک ۶/۷۱٪ درصد نسبت به تیمار شاهد بیشتر بود.

تیمار اسید سالیسیلیک ۶۷/۶۱ درصد باعث افزایش در مقدار این رنگیزه شده است. اسید سالیسیلیک سبب افزایش نشت رنگیزه نوع A در محیط و در ریشه شده است. تیمار ریشه‌ها با اسید سالیسیلیک تأثیر معنی‌داری بر تولید رنگیزه زرد نوع B در ریشه نسبت به شاهد دارد، که افزایش ۱۲/۶۹ درصدی نشان داد (شکل ۵).

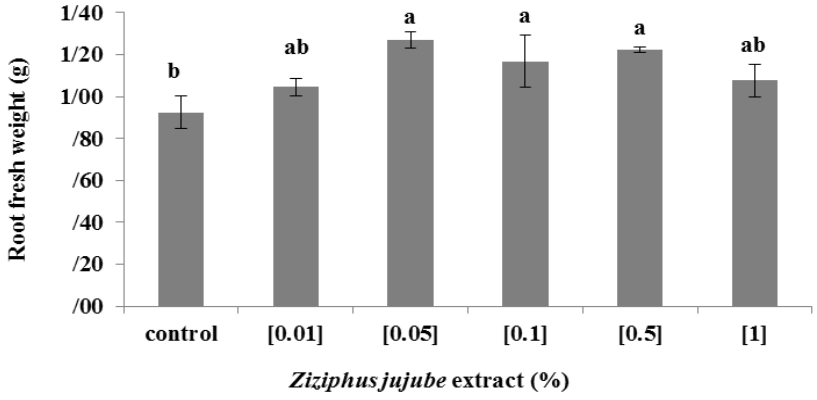
ریشه‌های تیمار داده شده با اسیدسالیسیلیک تأثیر معنی‌داری بر تولید رنگیزه زرد نوع B در محیط نسبت به شاهد ایجاد کردند، این افزایش ۳۶/۲۵٪ است (شکل ۶). اسید

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2025-04-03]

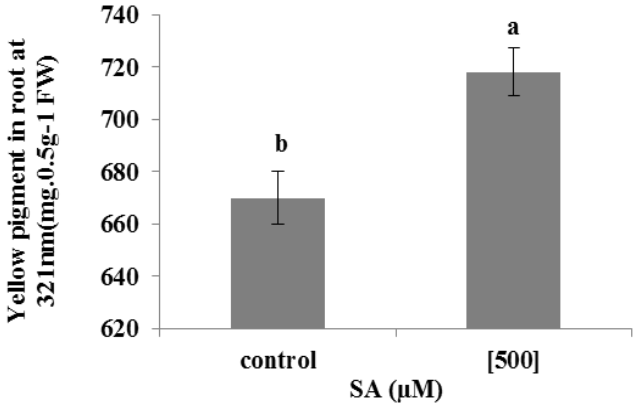
[DOR: 20.1001.1.23222727.1402.12.53.7.5]



شکل ۱- تأثیر اسید سالیسیلیک بر رشد ریشه‌های جداکشت گلرنگ (*Carthamus tinctorius* L.). میله‌ها نشان‌دهنده میانگین (n=3) ± خطای استاندارد است و حروف غیرمشابه روی هر ستون، نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار براساس آزمون LSD ((P<0.05) است.



شکل ۲- تأثیر غلظت‌های مختلف عصاره عناب بر وزن تر ریشه گلرنگ (*Carthamus tinctorius* L.). میله‌ها نشان‌دهنده میانگین (n=3) ± خطای استاندارد است و حروف غیرمشابه روی هر ستون، نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار براساس آزمون LSD ((P<0.05) است.

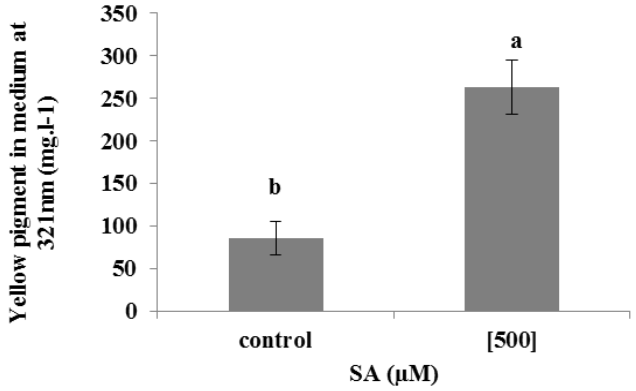


شکل ۳- تأثیر اسید سالیسیلیک بر مقدار رنگیزه A در ریشه گلرنگ (*Carthamus tinctorius* L.). میله‌ها نشان‌دهنده میانگین (n=3) ± خطای استاندارد است و حروف غیرمشابه روی هر ستون، نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار براساس آزمون LSD ((P<0.05) است.

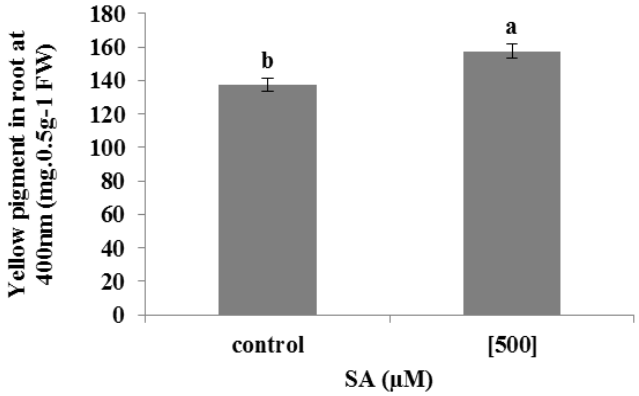
سالیسیلیک هم باعث افزایش تولید این رنگیزه در ریشه و هم سبب خروج این رنگیزه به محیط‌کشت شد. تیمار ریشه‌ها با

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2025-04-03]

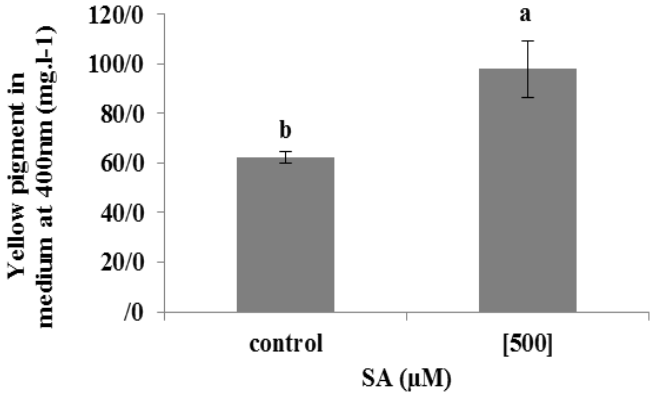
[DOR: 20.1001.1.23222727.1402.12.53.7.5]



شکل ۴- تأثیر اسید سالیسیلیک بر خروج رنگیزه A از ریشه گلرنگ (*Carthamus tinctorius* L.) به محیط‌کشت. میله‌ها نشان‌دهنده میانگین (n=3) ± خطای استاندارد است و حروف غیرمشابه روی هر ستون، نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار براساس آزمون LSD ((P<0.05) است.



شکل ۵- تأثیر اسید سالیسیلیک بر مقدار رنگیزه B ریشه گلرنگ (*Carthamus tinctorius* L.). میله‌ها نشان‌دهنده میانگین (n=3) ± خطای استاندارد است و حروف غیرمشابه روی هر ستون، نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار براساس آزمون LSD ((P<0.05) است.

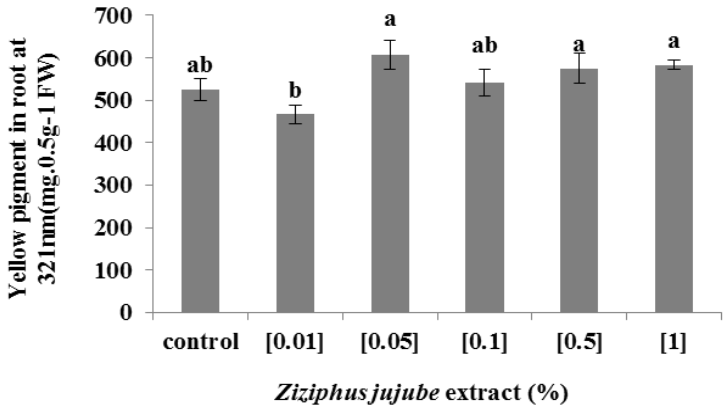


شکل ۶- تأثیر اسید سالیسیلیک بر مقدار رنگیزه B ریشه گلرنگ (*Carthamus tinctorius* L.). میله‌ها نشان‌دهنده میانگین (n=3) ± خطای استاندارد است و حروف غیرمشابه روی هر ستون، نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار براساس آزمون LSD ((P<0.05) است.

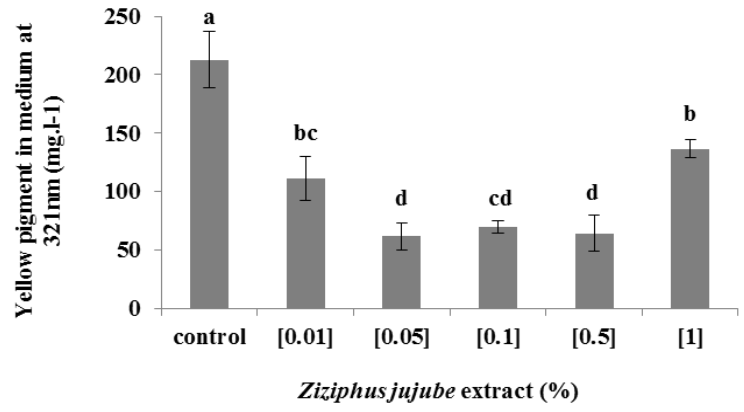
عصاره میوه عناب تأثیر معنی‌داری بر مقدار رنگیزه زرد نوع A در ریشه نسبت به شاهد ایجاد کرد، در واقع در غلظت ۰/۰۵٪

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2025-04-03]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1402.12.53.7.5]



شکل ۷- تأثیر عصاره میوه عناب بر رنگیزه A ریشه گلرنگ (*Carthamus tinctorius* L.). میله‌ها نشان‌دهنده میانگین (n=3) ± خطای استاندارد است و حروف غیرمشابه روی هر ستون، نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار براساس آزمون LSD ((P<0.05) است.



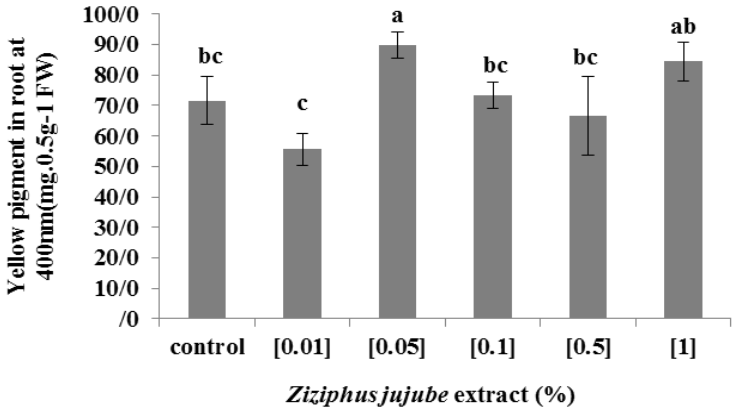
شکل ۸- تأثیر عصاره میوه عناب بر مقدار رنگیزه A ریشه گلرنگ (*Carthamus tinctorius* L.). میله‌ها نشان‌دهنده میانگین (n=3) ± خطای استاندارد است و حروف غیرمشابه روی هر ستون، نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار براساس آزمون LSD ((P<0.05) است.

افزایش معنی‌داری نشان داد. غلظت ۰/۰۱٪، ۱۱/۲۵ درصد کاهش، غلظت ۰/۰۵٪، ۱۳/۳۹ درصد افزایش، غلظت ۰/۱٪، ۲/۷۳ درصد افزایش، غلظت ۰/۵٪، ۸/۶۲ درصد افزایش و غلظت ۱٪، ۹/۸۵ درصد افزایش را نسبت به شاهد نشان دادند. با انجام آزمون LSD نتایج نشان داد که تنها غلظت ۰/۰۵٪ عصاره میوه عناب، افزایش معنی‌داری با شاهد در مقدار رنگیزه A دارد و بقیه غلظت‌ها با شاهد اختلاف معنی‌داری ندارند (شکل ۷).

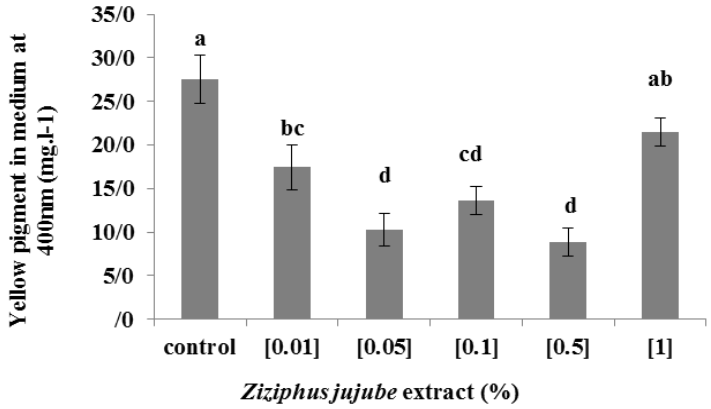
نتایج نشان داد که تیمار ریشه‌ها با عصاره میوه عناب سبب کاهش معنی‌داری در مقدار hydroxysafflor yellow A در محیط‌کشت شد، درواقع عصاره عناب تدثیری بر روی خروج رنگیزه از ریشه به محیط ایجاد نکرده است. این تیمار به‌طور میانگین، ۵۸/۵۰ درصد باعث کاهش خروج این رنگیزه از ریشه به محیط شده است. نتایج آزمون LSD نشان داد که تمامی غلظت‌ها کاهش معنی‌داری با شاهد دارند. غلظت ۰/۰۱٪ تفاوت معنی‌داری با غلظت ۱٪ ندارد ولی با بقیه غلظت‌ها اختلاف معنی‌داری دارد (شکل ۸).

طبق شکل ۹ اختلاف معنی‌داری بین غلظت ۰/۰۵٪ با شاهد وجود دارد که سبب افزایش مقدار رنگیزه نوع B در ریشه شده است. غلظت ۰/۰۱٪، ۲۲/۲۶ درصد کاهش، غلظت ۰/۰۵٪، ۲۶/۵۳ درصد افزایش، غلظت ۰/۱٪، ۲/۳۲ درصد افزایش، غلظت ۰/۵٪، ۶/۹ درصد کاهش و غلظت ۱٪، ۱۵/۲۵

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2025-04-03]
[DOR: 20.1001.1.23222727.1402.12.53.7.5]



شکل ۹- تأثیر غلظت‌های مختلف عصاره میوه عناب بر رنگیزه B ریشه گلرنگ (*Carthamus tinctorius* L.). میله‌ها نشان‌دهنده میانگین (n=3) ± خطای استاندارد است و حروف غیرمشابه روی هر ستون، نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار براساس آزمون LSD ((P<0.05)) است.



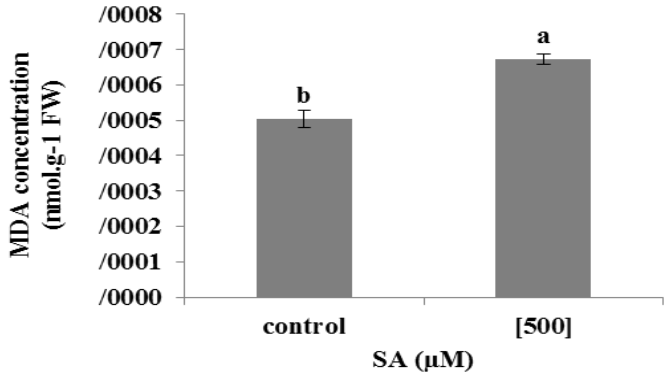
شکل ۱۰- تأثیر غلظت‌های مختلف عصاره عناب بر زنگیزه B ریشه گلرنگ (*Carthamus tinctorius* L.). میله‌ها نشان‌دهنده میانگین (n=3) ± خطای استاندارد است و حروف غیرمشابه روی هر ستون، نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار براساس آزمون LSD ((P<0.05)) است.

درصد افزایش، نسبت به شاهد نشان دادند. نتایج آزمون LSD نشان داد که ریشه‌های تیمارشده با Jub تنها در غلظت ۰/۰۵٪ افزایش معنی‌دار با شاهد در مقدار این رنگیزه دارد. غلظت‌های مختلف عصاره عناب سبب کاهش معنی‌دار خروج رنگیزه زرد نوع B نسبت به تیمار شاهد شد. این تیمار به‌طور میانگین، ۴۷/۹۶ درصد باعث کاهش خروج این رنگیزه از ریشه به محیط شده است. نتایج آزمون LSD نشان داد که تمامی غلظت‌های عصاره میوه عناب کاهش معنی‌داری در مقدار این رنگیزه نسبت به شاهد ایجاد کردند (شکل ۱۰). درواقع عصاره عناب تأثیر مهارکننده بر روی خروج این رنگیزه از ریشه به محیط‌کشت ایجاد کرده است.

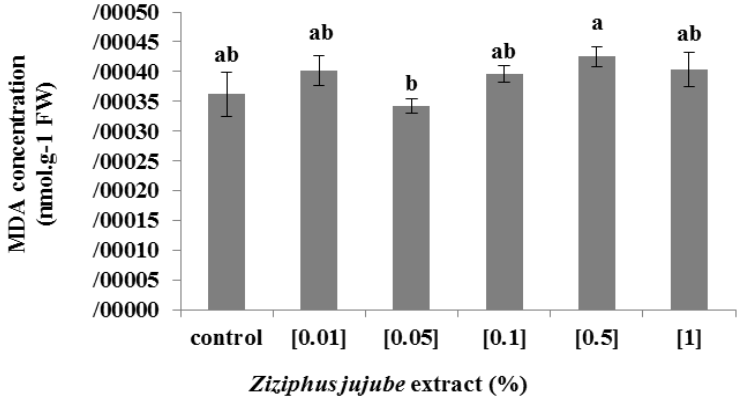
مقدار مالون دآلدئید (MDA) موجود در بافت ریشه به‌عنوان شاخصی برای تعیین پراکسیداسیون لیپیدها مورد استفاده قرار گرفت و از آن به‌عنوان عاملی برای تعیین مقدار آسیب ایجاد شده بر غشاهای سلولی استفاده گردید. شکل ۱۱ نشان می‌دهد که با افزودن اسید سالیسیلیک به محیط‌کشت ریشه گلرنگ، افزایش در مقدار MDA ریشه مشاهده می‌شود که این افزایش معنی‌دار است. درواقع SA باعث افزایش پراکسیداسیون لیپید می‌شود.

پنج غلظت استفاده‌شده برای عصاره میوه عناب نشان دادند که تیمار ریشه‌ها با غلظت‌های مختلف عناب تأثیر معنی‌داری بر روی پراکسیداسیون لیپید غشا در ریشه گلرنگ ایجاد نکرده

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2025-04-03]
[DOR: 20.1001.1.23222727.1402.12.53.7.5]



شکل ۱۱- تأثیر اسید سالیسیلیک بر MDA ریشه گلرنگ (*Carthamus tinctorius* L.). میله‌ها نشان‌دهنده میانگین (n=3) ± خطای استاندارد است و حروف غیرمشابه روی هر ستون، نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار براساس آزمون LSD ((P<0.05) است.



شکل ۱۲- تأثیر غلظت‌های مختلف عصاره میوه عناب بر مقدار MDA در ریشه گلرنگ (*Carthamus tinctorius* L.). میله‌ها نشان‌دهنده میانگین (n=3) ± خطای استاندارد است و حروف غیرمشابه روی هر ستون، نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار براساس آزمون LSD ((P<0.05) است.

اند (شکل ۱۲).

بحث

افزایش رشد در حضور اسید سالیسیلیک در برخی گونه‌های گیاهی گزارش شده است (El-Hady *et al.*, 2021; Es-sbihi *et al.*, 2021; Hussain *et al.*, 2021). اسید سالیسیلیک به‌عنوان یک مولکول القایی در سیستم دفاعی گیاهان مطرح است (Alvarez, 2000, Shah, 2003). در این تحقیق تیمار ریشه‌های جداکشت با اسید سالیسیلیک افزایش رشد معنی‌داری نسبت به وزن اولیه نشان ندادند. ریشه‌ها قهوه‌ای رنگ و فاقد کیفیت خوب بودند. پاسخ SA وابسته به غلظت است، در این پژوهش غلظت ۵۰۰ میکرومولار استفاده شد که غلظت بالایی است و می‌تواند اثر کاهنده بر رشد داشته باشد. از طرفی SA در این غلظت باعث افزایش پراکسیداسیون لیپید شد. احتمال داده می‌شود قهوه‌ای‌شدن ریشه‌های تیمار داده شده با SA به‌علت افزایش پراکسیداسیون لیپید باشد.

عصاره میوه عناب با غلظت ۰/۰۵٪ تأثیر مثبتی بر روی رشد فراهم کرد. ریشه‌های ایجادشده دارای کیفیت بسیار عالی بوده و ریشه‌های ثانویه فراوانی تولید شدند. احتمال داده می‌شود که ترکیباتی که در عصاره میوه عناب وجود دارد سبب افزایش فعالیت هورمون اکسین شده باشد که این هورمون سبب افزایش ریشه‌زایی شده است. عصاره عناب دارای

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2025-04-03]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1402.12.53.7.5]

ترکیبات فلاونوئیدی است درنتیجه می‌تواند در سیستم انتقال اکسین تأثیرگذار باشد. نتایج پراکسیداسیون لیپید در ریشه‌های تیمارشده با عصاره عناب معنی دار نمی‌باشد در نتیجه ثابت می‌کند سیستم غشا تحت‌تأثیر منفی رادیکال‌های فعال نبوده و غشاء سلول آسیب ندیده است بنابراین ریشه‌ها رشد خوبی نشان داده اند (Morales-Quintana and Ramos, 2021).

همان‌طور که مطالعات قبلی نشان می‌دهد، استفاده از SA تولید هایپرسین و سودوهایپرسین را در *H. hirsutum* و *H. maculatum* (Coste *et al*., 2011) و تولید پروسیانیدین و آنتوسیانین را در کشت سلول‌های انگور افزایش می‌دهد. به‌نظر می‌رسد در مطالعه حاضر SA اگزوژن منجر به ایجاد تنش برای گیاه شده و نیز منجر به افزایش تولید ترکیبات ثانویه از جمله رنگیزه در گیاه می‌شود. در گیاه گلرنگ SA هم در ریشه و هم در محیط مقدار رنگیزه yellow A و yellow B به‌طور معنی‌داری افزایش داد. علت تأثیر مثبت SA روی مقدار رنگیزه را می‌توان به‌دلیل تأثیری که روی فرایندهای فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی گیاه از جمله انتقال یون و نفوذپذیری غشاء دارد (Singh, 1993) دانست که در پیامد آن خروج رنگیزه را به محیط تحریک می‌کند. همین طور اسید سالیسیلیک با تأثیری که بر روی پراکسیداسیون لیپید ایجاد می‌کند و باعث افزایش پراکسیداسیون لیپید می‌شود باعث خروج رنگیزه به محیط می‌شود. نتایج این آزمایش نشان داد الیسیتور SA با تخریب غشا می‌تواند باعث خروج رنگیزه شود. در این پژوهش از عصاره عناب برای اولین بار جهت افزایش نفوذپذیری استفاده شد. نتایج استفاده از عصاره عناب نشان داد که کاربرد این عصاره منجر به کاهش نفوذپذیری در سلول‌های گیاهی شد و مقدار رنگیزه‌های گیاه گلرنگ در محیط بسیار کاهش یافتند. در واقع سلول‌های گیاهی با داشتن دیواره سلولی مانع از خروج رنگیزه‌ها به محیط شده‌اند. تأثیر عصاره عناب وابسته به غلظت است، در غلظت‌های ۰/۰۵، ۰/۱ و ۰/۵ درصد افزایش رشد ریشه مشاهده شد. مقدار رنگیزه‌ها در ریشه در غلظت ۰/۰۵٪ افزایش معنی‌دار نشان دادند که در همین غلظت افزایش رشد در ریشه هم ایجاد شده است. بنابراین با افزایش رشد در ریشه باعث افزایش مقدار رنگیزه در ریشه شده است البته مقدار رنگیزه B نسبت به رنگیزه A افزایش بیشتری نشان داده است (رنگیزه A، ۱۳٪/۳۶ و رنگیزه B، ۲۶٪/۵۳). عصاره عناب در غلظت‌های ۰/۰۵٪ و ۱٪ تأثیری بر مقدار کل رنگیزه‌ها ایجاد نکرده است ولی در بقیه غلظت‌ها باعث کاهش مقدار کل رنگیزه‌ها شده است. همین‌طور عصاره میوه عناب تأثیر مهارکننده بر خروج رنگیزه‌های زرد رنگ ایجاد کرد و کاهش معنی‌داری در مقدار رنگیزه در محیط‌کشت نشان داد. که دلیل آن را می‌توان به مقادیر بالای ترکیبات فلاونوئیدی در ترکیب عصاره میوه عناب نسبت داد که می‌تواند در متابولیسم فلاونوئید گلرنگ دخالت داشته باشد. همچنین عدم خروج ترکیبات به محیط می‌تواند بر رشد ریشه‌ها تأثیر داشته باشد. نشت الکترون‌ها از زنجیره انتقال الکترون به O_2 در طول متابولیسم هوازی طبیعی به تولید انواع ROS مانند سوپراکسید منجر می‌شود. این نوع اکسیژن سمی بسیار فعال بوده، در غیاب هر مکانیسم محافظتی، متابولیسم معمولی سلول را از طریق آسیب اکسیداتیو تخریب می‌کند. یکی از موارد آسیب آن پراکسیداسیون لیپیدهای غشا است، که نتیجه آن تخریب پروتئین‌ها، غیرفعال شدن آنزیم‌ها و تخریب رشته DNA است. رادیکال‌های سوپراکسید تولید شده در تنش خشکی و شوری موجب پراکسیداسیون لیپیدهای غشا می‌شوند. مطالعاتی که توسط EL-Tayeb (۲۰۰۵) انجام شد، نشان داد که رادیکال‌های آزاد در جو تحت تنش شوری افزایش یافته، غشای سلولی آسیب می‌بیند، چون مقدار MDA و نشت الکترولیتی غشاء افزایش یافته است. تحقیقات نشان داده که اسید سالیسیلیک اسید از طریق اثر بر بیوسنتز اتیلن باعث مقاومت گیاه نسبت به تنش‌های محیطی می‌شود (Khan *et al*., 2021). اتیلن به‌عنوان یک تنش عامل از طریق فعال‌کردن آنزیم‌هایی مانند (لیپوکسیژناز) القاءکننده کاتابولیسم کلروفیل (کاتالاز، پراکسیدازها) القاءکننده کاتابولیسم کلروفیل و پراکسیداسیون لیپیدها (سلولازها) آنزیم تخریب‌کننده دیواره سلولی و پلی‌گالاکتوروناز‌ها بر بسیاری از سیستم آنتی‌اکسیدانی و ترکیبات اثر می‌گذارد (Chae *et al*., 2003, Sagee *et al*.,

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2025-04-03]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1402.12.53.7.5]

1989). به علاوه اسید سالیسیلیک با عمل کلات‌کردن فلزات مقدار MDA را در گیاهان تحت تنش فلز سنگین کاهش می‌دهد. بنابراین اسید سالیسیلیک در تثبیت غشاهای سلول شرکت می کند (Mishra and Choudhuri, 1999) و با افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان در برگ‌ها منجر به تعدیل آسیب اکسیداتیو می‌گردد به‌طوری‌که با کاهش مقادیر MDA نشان داده شده است. در این پژوهش مشاهده شد که اسید سالیسیلیک باعث افزایش مقدار MDA شد در واقع پراکسیداسیون لیپید افزایش یافته است که به احتمال زیاد، اسید سالیسیلیک باعث افزایش در تولید ROS شده است که نتیجه آن پراکسیده شدن لیپیدهای غشا است.

همین‌طور عصاره میوه عناب تأثیر معنی‌داری بر روی مقدار MDA در ریشه ایجاد نکرد. درواقع مانع از پراکسیداسیون لیپید شده است. در غلظت ۰/۰۵٪ عصاره میوه عناب نسبت به غلظت‌های دیگر کاهش کمتری از مقدار MDA مشاهده می‌شود ولی معنی‌دار نیست. بنابراین می‌توان گفت که عصاره میوه عناب مانع از تشکیل گونه‌های فعال اکسیژن می‌شود که از اکسیداسیون لیپیدها جلوگیری می‌کند. در گیاهانی که دچار تنش می‌شوند وگیاه با تنش حاصل سازگاری نیابد، روند تولید مالون دی‌آلدئید با افزایش پراکسیداسیون چربی‌های غشا شدت بیشتری گرفته و تداوم این وضعیت موجب از هم گسیختگی ساختار غشا و خروج آب و یون‌ها از سلول می‌شود که ادامه این روند نهایتاً به مرگ سلول منتهی خواهد گردید.

نتیجه‌گیری

تیمارهای اسید سالیسیلیک و عصاره میوه عناب تأثیر متفاوتی بر روی رشد ریشه و مقدار تولید و نشت رنگیزه‌های A و B داشتند. تیمار اسید سالسیلیک تأثیری بر روی رشد ریشه ایجاد نکرد اما تیمار عصاره میوه عناب تأثیر مثبتی بر روی رشد ریشه ایجاد کرد و باعث افزایش ریشه‌های ثانویه شد. تیمار اسید سالیسیلیک باعث افزایش خروج رنگیزه‌های A و B به محیط‌کشت شد اما باعث افزایش پراکسیداسیون لیپید در بافت ریشه شد، تیمار عصاره میوه عناب بدون تأثیر بر پراکسیداسیون لیپید، در غلظت ۰/۰۵٪ باعث افزایش مقدار رنگیزه‌ها در ریشه شد ولی مقدار رنگیزه‌ها در محیط‌کشت افزایش نشان نداد. بنابراین تیمار اسید سالیسیلیک نسبت به تیمار عصاره میوه عناب برای افزایش خروج رنگیزه‌ها از ریشه به محیط‌کشت بهتر است.

منابع

Adzu, B., Amos, S., Wambebe, C. and Gamaniel, K. (2001) Antinociceptive activity *of Zizyphus spina* Christi root bark extract. Fitoterapia 72: 344-350.

Al-Reza, S. M., Bajpai, V. K. and Kang, S. C. (2009) Antioxidant and antilisterial effect of seed essential oil and organic extracts from *Zizyphus jujuba*. Food Chem Toxicol 47: 2374-2380.

Alvarez, M. (2000) Salicylic acid in the machinery of hypersensitive cell death and disease resistance. Plant Molecular Biology 44: 429-442.

Bernard, F., Hassanpour, A., Gholizadeh, G., Hassannejad, S. and Chaghari, Z. (2010) High yellow pigments production by root culture of *Carthamus tinctorius* and its release in medium under gas oil treatment. Acta Physiologiae Plantarum 33: 431-436.

Carola, F., Trabace, T. and Sunseri, F. (1997) High frequency of plant regeneration in sunflower from cotyledons via somatic embryogenesis. Plant Cell Reports 16: 295-298.

Chae, H. S., Faure, F. and Kieber, J. J. (2003) The eto1, eto2, and eto3 mutations and cytokinin treatment increase ethylene biosynthesis in Arabidopsis by increasing the stability of ACS Protein. The Plant Cell 15: 545-559.

Cheng, Q. (2000) Flavonoids from *Ziziphus jujube* mill var. Spinosa Tetrahedron 56: 8915-8920.

Coste, A., Valse, L., Halmagi, A. and Deliu, C. (2011) Effect of plant growth regulatore and elicitors on production of secondary metabolites in shoot cultures of *Hypericum hirsutum* and *Hypericum maculatum*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 106: 279-288.

El-Hady, N. A. A. A., ElSayed, A. I., El-Saadany, S. S., Deligios, P. A. and Ledda, L. (2021) Exogenous application of foliar salicylic acid and propolis enhances antioxidant defenses and growth parameters in tomato plants. Plants 10: 74.

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2025-04-03]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1402.12.53.7.5]

El-Tayeb, M. A. (2005) Response of barley Gains to the interactive effect of salinity and salicylic acid. Journal of Plant Growth Regulation 45: 215-225.

Es-sbihi, F. Z., Hazzoumi, Z., Aasfar, A. and Amrani Joutei, K. (2021) Improving salinity tolerance in *Salvia officinalis* L. by foliar application of salicylic acid. Chemical and Biological Technologies in Agriculture 8: 1-12.

Gao, Q. H., Wu, C. S. and Wang, M. (2013) The jujube (*Ziziphus jujuba* Mill.) fruit: A review of current knowledge of fruit composition and health benefits. Journal of Agricultural and Food Chemistry 61: 3351-3363.

Gao, W. Y., Fan, L. and Paek, K. Y. (2000) Yellow and red pigment production by cell cultures of carthamus tinctorius in a bioreactorPlant Cell, Tissue and Organ Culture 60: 95-100.

Guil-Guerreo, J. L., Diaz Delgado, A., Gonzalez, M. M. C. M. and Torija Isasa, M. E. (2004) Fatty acids and carotenes in some ber (*Zizyphus jujuba* Mill.) varieties. Plant Foods for Human Nutrition 59: 23-27.

Han, S. Y., Li, H. X., Ma, X., Zhang, Z. Z. and Tu, P. F. (2009) Protective effects of purified safflower extract on myocardial ischemia in vivo and in vitro. Phytomedicine 16: 694-702.

Hanagata, N., Ito, A., Fukuju, Y. and Murata, K. (1992) Red pigment formation in cultured cells of *Carthamus tinctorius* L. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry 56: 44-47.

Hanagata, N. and Karube, I. (1994) Red pigment production by *Carthamus tinctorius* L. cells in a two-stage culture system. Journal of Biotechnology 37: 59-65.

Heath, R. L. and Packer, L. (1968) Photoperoxidation in isolated chloroplasts l. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. Archives of Biochemistry and Biophysics 125: 189-198.

Hussain, S. J., Khan, N. A., Anjum, N. A., Masood, A. and Khan, M. I. R. (2021) Mechanistic elucidation of salicylic acid and sulphur-induced defence systems, nitrogen metabolism, photosynthetic, and growth potential of mungbean (*Vigna radiata*) under salt stress. Journal of Plant Growth Regulation 40: 1000-1016.

Khan, M. I. R., Jahan, B., AlAjmi, M. F., Rehman, M. T., Iqbal, N., Irfan, M., Sehar, Z. and Khan, N. A. (2021) Crosstalk of plant growth regulators protects photosynthetic performance from arsenic damage by modulating defense systems in rice. Ecotoxicology and Environmental Safety 222: 112535.

Kulkarni, D. N., Revanwar, S. M., Kulkarni, K. D. and Deshpande, H. W. (1997) Extraction and uses of natural pigments from safflower florets. In: Proceedings of the 4th International Safflower Conference, Bari.

Kazuma, K., Takahashi, T., Sato, K., Takeuchi, H., Matsumoto, T. and Okuno, T. (2000) Quinochalcones and flavonoids from fresh florets in different cultivars of *Carthamus tinctorius*. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry 64: 1588-1599.

Meselhy, M. R., Kadota, S., Momose, Y., Hatakeyama, N., Kusai, A., Hattori, M. and Namba, T. (1993) Two new quinochalcone yellow pigments form *Carthamus tinctorius* and Ca2? antagonistic activity of tinctorimine. Chemical and Pharmaceutical Bulletin 41: 1796-1802.

Mandal, A. K. A., Gupta, S. D. and Chatterji, A. K. (2001) Factors affecting somatic embryogenesis from cotyledonary explants of safflower. Biological Plantarum 44: 503-507.

Matkowaski, A. (2008) Plant in vitro culture for the production of antioxidants — A review. Biotechnology Advances. 26: 548-560.

Mishra, A. and Choudhuri, M. A. (1999) Effects of salicylic acid on heavy metal induced membrane deterioration mediated by lipoxygenase in rice. Biologia Plantarum 42: 409-415.

Morales-Quintana, L. and Ramos, P. (2021) A talk between flavonoids and hormones to reorient the growth of gymnosperms. International Journal of Molecular Sciences 22: 12630.

Murashige, T. and Skoog, F. (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. Plant Physiology 15: 437-497.

Namdeo, A. G. (2007) Plant cell elicitation for production of secondary metabolites. Pharmacognosy Reviews 1: 69-79.

Pawlowska, A. M., Camangi, F., Bader, A. and Braca, A. (2009) Flavonoids of *Zizyphus jujuba* L, and *Zizyphus spina-christi* (L.) Willd (Rhamnaceae) fruits. Food Chemistry 112: 858-862.

Popova, L., Ananieva, V., Hristova, V., Christov, K., Georgieva, K., Alexieva, V. and Stoinova, Zh. (2003) Salicylic acid-and methyl jasmonate–induced protection on photosynthesis to paraquat oxidative stress. Bulg. Journal of Plant Physiology 133-152.

Popova, L., Pancheva, T. and Uzunova, A. (1997) Salicylic acid: Properties, biosynthesis and physiological role. Plant Physiology 23: 85-93.

Raskin, I. (1992) Role of salicylic acid in plants. Annual Review of Plant Biology 43: 439-46.

Sagee, O., Riov, J. and Goren, R. (1989) Ethylene-enhanced catabolism of (14C) indole-3 acetic acid to indole-3-carboxylic acid in citrus leaf tissues. Plant Physiology 91: 54-60.

Shah, J. (2003) The salicylic acid loop in plant defense. Current Opinion in Plant Biology 6: 365-371.

Singh, S. P. (1993) Effect of non-auxinic chemicals on root formation in some ornamental plant cuttings. Advances in Horticultural Science. 3: 207-210.

Tavakoli, M. and Sedaghat, M. (1992) Herbal medicine. 4th Ed. Roozbahan Publications, Tehran.

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2025-04-03]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1402.12.53.7.5]

Tripathi, L. and Tripathi, J. N. (2003) Role of biotechnology in medicinal plants. Tropical Journal of Pharmaceutical Research 2: 243-53.

Takahshi, Y., Saito, K., Yanaga, M., Hikicki, K., Matsumoto, T. and Wada, M. (1984) Tetrahedron Letters 23: 2471.40.

Wakayama, S., Kusaka, K. and Kanehira, T. (1994) Kinobeon A, a novel red pigment produced in Safflower tissus culture systems. Zeitschrift für Naturforschung 49c: 1-5.

Tu, Y., Liu, F., Guo, D., Fan, L., Zhu, Z., Xue, Y., Gao, Y. and Guo, M. (2016) Molecular characterization of flavanone 3-hydroxylase gene and flavonoid accumulation in two chemotyped safflower lines in response to methyl jasmonate stimulation. BMC Plant Biology 16: 1-12.

Waraporn, P.,Wanwimon, L., Wanchai, D., Hiroyuki, T. and Yukihiro, S. (2007) Improvement of artemisinin production by chitosan in hairy root cultures of *Artemisia annua* L. Biotechnol Lett 29: 1143-1146.

Wei, X., Liu, H., Sun, X., Fu, F., Zhang, X., Wang, J., An, J. and Ding, H. (2005) Hydroxysafflor yellow A protects rat brains against ischemia reperfusion injury by antioxidant action. Neuroscience 386: 58-62.

Weili, J. N. (2007) Isolation and analysis of anovel proteoglycan from *Ziziphus jujuba*. Journal of Food and Drug Analysis 15: 271-277.

Yine, H. B., He, Z. S. and Ye, Y. (2000) Cartorimine, a new cycloheptenone oxide derivative from *Carthamus tinctorius*. Journal of Natural Products 63: 1164.

Yoon, J. M. (2003) Thermal stability of the pigments Hydroxysafflor yellow A, Safflor yellow B, and precarthamin from Safflower (*Carthamus tinctorius*). Food Chemistry and Toxicology. 68: 839-843.

Zhang, W., Curtin, C., Kikuchi, M. and Franco, C. (2002) Integration of jasmonic acid and light irradiation for enhancement of anthocyanin biosynthesis in Vitis -inifera suspension cultures. Plant Science 162: 459-468.

Zhao, J. (2006) Simultaneous determination of saponins and fatty acids in *Ziziphus jujuba* (suanzaoren) by high performance liquid chromatography evaporative light scattering detection and pressurized liquid extraction. Journal of Chromato Graphy A. 1106: 188-194.

Zhao, J., Davis, L. C. and Verpoorte, R. (2005) Elicitor signal transduction leading to production of plant secondary metabolites. Biotechnology Advances 23: 283-333.

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2025-04-03]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1402.12.53.7.5]

Effect of salicylic acid and ziziphus jujube (*Ziziphus jujube*) fruit extract on the production and release of yellow pigments by safflower (*Carthamus tinctorius* L.) root culture

Raheleh Gorzi, Françoise Bernard*,Mohammad Reza Ghalamboran

Shahid Beheshti University G.C., Faculty Biological Sciences and Technology, Department of Plant Sciences, Tehran, Iran

(Received: 16/07/2021, Accepted: 27/07/2022)

Abstract

Safflower (*Carthamus tinctorius* L.) belongs to the Asteraceae family. It contains flavonoids such as kinocalcone pigments and these compounds have been shown to exhibit medicinal properties. These pigments are abundantly found in flower of this plant, but it has been seen that the roots of this plant have been able to produce these pigments in vitro. One of the ways to increase the production of secondary metabolites in tissue culture is to use different elicitors. In this study, jujube fruit extract and salicylic acid were used as an elicitor. Grown roots were first cultured in liquid Murashige and Skoog (MS) medium for mass production, in static condition. The roots were then sub-cultured with jujube fruit extract (0, 0.01, 0.05, 0.1, 0.5 and 1%) and salicylic acid (0, 500 µm). After 20 days of culture, the growth was determined and the yellow pigments of root and medium were measured by spectrophotometer and the results showed that jujube fruit extract had protected root tissues against lipid peroxidation and this fact had triggered their growth. Under this condition, there was an increase in yellow pigments but these pigments were not released in the culture medium. Conversely, the SA treatment that further increased the production of pigments affected the integrity of cell membranes which led to a fall of growth and a release of pigments in the culture medium.

Keywords: Elicitor, Pigment, Jujube fruit extract, Salicylic acid, In-glass culture and MS medium

Corresponding author, Email: F_bernard256@yahoo.fr

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2025-04-03]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1402.12.53.7.5]