مطالعه تاثیر غلظت‌های مختلف 2,4-D بر صفات رشدی و تولید متابولیت‌های ثانویه در کشت درون شیشه گیاه زوفا (*Hyssopus officinalis*)

هوشمند محمودجانلو[۱]، بهاره کاشفی[۲*]، اسماعیل باباخان‌زاده[۳]

[۱و ۲] گروه باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد دامغان، دامغان، ایران.

[۳] سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان سمنان (شاهرود)، سمنان، ایران.

* پست الکترونیکی نویسنده مسئول: bahareh.kashefi@gmail.com

پیش انتشار

چکیده

گیاه زوفا متعلق به خانواده نعناعیان بوده و در طب سنتی و در صنایع دارویی و غذایی کاربرد داشته و دارای فعالیت‌های ضد باکتری، ضد قارچی، آنتی اکسیدانی و ضد اسپاسم بوده و در درمان سرفه، برونشیت، آسم شدید، و سایر بیماری‌های تنفسی موثر استفاده می‌شود. در این مطالعه تاثیر غلظت‌های مختلف 2,4-D (صفر، ۱، ۲، ۳، ۴ و ۵ میلی‌گرم بر لیتر) بر کالوس‌زایی، رشد و تولید متابولیت‌های ثانویه گیاه زوفا مورد مطالعه قرار گرفت. نتایج نشان داد که استفاده از غلظت‌های مختلف 2,4-D تاثیر معنی-دار روی درصد کالوس‌زایی، طول گیاهچه و ریشه، وزن تر گیاهچه، تعداد و سطح برگ، محتوای اسید رزمارینیک، اسید فولیک، کوئرستین، لوتئولین، فلاونوئید و فعالیت آنتی اکسیدان دارد. بطورکلی، بیشترین درصد کالوس‌زایی (۹۷/۴۰ درصد) با کاربرد ۳ میلی‌گرم بر لیتر 2,4-D حاصل شد. بیشترین طول گیاهچه (۸/۹۲ سانتیمتر)، طول ریشه (۱/۶۶ سانتیمتر)، وزن تر گیاهچه (۰/۱۵ گرم)، سطح برگ (۱/۴۴ سانتیمتر مربع) و تعداد برگ (۲۱/۸۰ عدد) در شرایط عدم کاربرد 2,4-D بدست آمد. بالاترین مقدار اسید رزمارینیک (۰/۶۴ میکروگرم در گرم وزن خشک) و لوتئولین (۲/۴۲ میکروگرم در گرم وزن خشک) در حضور ۲ میلی‌گرم بر لیتر 2,4-D مشاهده شد. بیشترین محتوای اسید فولیک (۳۶/۶۵ میکروگرم در گرم وزن خشک)، کوئرستین (۱/۷۲ میکروگرم در گرم وزن خشک) و فلاونوئید (۲/۴۸ میلی‌گرم کوئرستین در گرم عصاره خشک) با کاربرد ۱ میلی‌گرم بر لیتر 2,4-D حاصل گردید. همچنین، بیشترین فعالیت آنتی اکسیدان (۳/۹۸ میکروگرم در میلی‌لیتر) با افزودن ۴ میلی‌گرم بر لیتر 2,4-D بدست آمد. نتایج نشان داد کاربرد تنظیم‌کننده رشد 2, 4-D می تواند در بهبود صفات رشدی، درصد کالوس زایی و میزان متابولیت‌های ثانویه موثر باشد.

کلمات کلیدی: آنتی اکسیدان، اسید رزمارینیک، تنظیم‌کننده رشد، کوئرستین، لوتئولین.

مقدمه

از زمان‌های قدیم، گیاهان به عنوان منابع داروهای طبیعی برای درمان بیماری‌های مختلف مورد استفاده قرار گرفته‌اند. مطالعات نشان می‌دهد که بیش از ۶۰ درصد داروهای ضد سرطان و ۷۵ درصد داروهای درمان بیماری‌های عفونی از گیاهان مشتق شده و یا مشابه ترکیبات گیاهی هستند (Anand *et al.*, 2019). اهمیت دارویی گیاهان بستگی به حضور

این مقاله نهایی نیست و پس از انتشار تغییراتی خواهد داشت.

گروه بزرگی از ترکیبات آلی با وزن مولکولی کم دارد که به عنوان متابولیت‌های ثانویه شناخته می‌شوند و در مقادیر بسیار کم (کمتر از ۱ درصد وزن خشک گیاهان) در دسترس هستند. این متابولیت‌ها به عنوان اسیدهای فنولیک، فلاونوئیدها، آلکالوئیدها، گلیکوزیدها، تانن‌ها، لیگنان‌ها و اسانس‌ها طبقه‌بندی می‌شوند و در محافظت از گیاهان در برابر گیاه‌خواران، به‌عنوان جذب کننده موجودات گرده‌افشان و در همزیستی گیاه با میکروارگانیسم‌ها نقش دارند (Jain *et al*., 2019). تولید این ترکیبات ممکن است به یک خانواده گیاهی خاص، جنس یا حتی یک گونه خاص محدود شود (Shoja and Shishavan, 2021).

گیاه زوفا (*Hyssopus officinalis*) متعلق به خانواده نعناعیان بوده و در طب سنتی و در صنایع دارویی و غذایی کاربرد داشته و دارای فعالیت‌های ضد عفونی کننده، ضد باکتری، ضد قارچی و آنتی اکسیدانی است (Stancheva *et al*., 2019). زوفا به عنوان یک گیاه دارویی دارای اثر ضد اسپاسم بوده و در درمان سرفه، برونشیت، آسم شدید، و سایر بیماری‌های تنفسی موثر استفاده می‌شود. اسانس زوفا حاوی ایزوپینوکامفون، پینن، کامفن و ترپینن، پینوکارون، کارواکرول، پی سیمن و میرتنال است (Wesolowska *et al*., 2010).

برای دستیابی به سطح بالایی از تولید متابولیت‌های ثانویه ارزشمند، روش کشت سلول و بافت گیاهی به عنوان روشی قدرتمند در نظر گرفته می‌شود که می‌تواند عوامل موثر بر سنتز و/یا تجمع این متابولیت‌ها را کنترل کند (Jain *et al*., 2019). کشت بافت گیاهی جایگزینی برای تولید گیاه در مزرعه جهت بدست آوردن زیست توده به عنوان یک منبع پایدار از ترکیبات زیستی فعال است، زیرا سیستم درون شیشه تحت تاثیر محدودیت منابع مواد مغذی یا تغییرات آب و هوایی قرار نمی‌گیرد. همچنین، این سیستم آزمایشی امکان بررسی تاثیر تعدادی از عوامل شیمیایی و فیزیکی بر متابولیسم ثانویه سلول گیاهی را فراهم می‌کند. این رویکرد می‌تواند در بدست آوردن کلونی‌های با تولید بالا از گیاهان دارویی و همچنین کلونی‌های جدیدی که متابولیت‌های غیر معمول با ارزش دارویی فوق‌العاده را سنتز می‌کنند، مفید باشد. بسیاری از رویکردهای آزمایشگاهی برای افزایش بیوسنتز و تجمع متابولیت‌های ثانویه در سلول‌های گیاهی استفاده شده است (Stancheva *et al*., 2019). کشت کالوس یک منبع تجدیدپذیر از متابولیت‌های ثانویه است که مستقل از عوامل فصلی است (Espinosa-Leal *et al*., 2018). به دست آوردن متابولیت‌های ثانویه از کشت کالوس مد نظر بسیاری از محققان بوده و محیط غذایی می‌تواند بیوسنتز متابولیت‌های ثانویه هدف را تحریک و عملکرد آن‌ها را افزایش دهد (Ahmad *et al*., 2019). تولید ترکیبات طبیعی از طریق کشت کالوس نویدبخش توسعه بیوتکنولوژی صنعتی برای به دست آوردن مواد با ارزش پزشکی است (Hendrawati *et al*., 2012). توسعه تکنیک‌هایی برای بهبود اسانس محصولات و ترکیبات خاص آن‌ها مطلوب بوده و عوامل درون‌زا (مرحله خاص رشد کل گیاه و اندام‌های خاص) و برون‌زا (زیستی و غیرزیستی) می‌توانند تولید اسانس و ترکیب شیمیایی را تغییر دهند (Shakoori and Kashefi, 2019; Stancheva *et al*., 2019; Teixeira et al., 2019; Yaacob et al., 2022). تیکزیرا و همکاران (۲۰۱۹) در تحقیقی گزارش داشتند که تنظیم کننده های رشد از جمله 2,4-D می توانند بر میزان برخی از ترکیبات موثره در گیاهان تاثیر مثبت داشته باشند. از دیگر عوامل موثر بر تولید اسانس، تنظیم کننده‌های رشد گیاهی هستند (Prins *et al*., 2010). شکوری و کاشفی (۲۰۱۹) اعلام داشتند مواد تنظیم‌کننده رشد گیاهی در تمام جنبه‌های چرخه حیاتی گیاه کاربرد دارد به طوری که این مواد می‌توانند اثر عمیقی بر روی واکنش‌های گیاه و تولید متابولیت‌های ثانویه داشته باشند. از مهمترین ترکیباتی که دارای خواص آنتی‌اکسیدانی هستند می‌توان به کاروتنوئیدها، فلاونوئیدها، فنل‌ها و

این مقاله نهایی نیست و پس از انتشار تغییراتی خواهد داشت.

ترکیبات فنلی اشاره نمود. این ترکیبات از محرک‌های رشد گیاه و بازدارنده‌های زیستی تشکیل شده‌اند و برای افزایش رشد گیاه و عملکرد محصول استفاده می‌شوند و می‌توانند محتوای پروتئین‌ها و قندها را بهبود بخشند و مقاومت گیاه را در برابر تنش‌های زیستی و غیرزیستی افزایش دهند (Farjaminezhad and Garoosi, 2019). گزارش‌های متعددی درخصوص تاثیر تنظیم‌کننده‌های رشد مختلف بر میزان کال زایی در گیاه زوفا موجود می‌باشد (Tayefeh et al., 2018; Maslova et al., 2021; Sedaghati and Assareh, 2022). 2,4-D یک تنظیم‌کننده رشد گیاهی بسیار موثر از گروه اکسین‌ها می‌باشد که در تحریک تشکیل سلول‌های کالوس نقش دارد (Mahadi et al. 2016). همچنین، این هورمون در مقایسه با انواع دیگر اکسین‌ها دارای خواص پایدارتری است، زیرا به راحتی توسط آنزیم‌های آزاد شده توسط ریزنمونه‌ها یا با حرارت دادن در طی فرآیند استریل کردن تجزیه نمی‌شود (George et al. 2008). در بررسی تاثیر 2,4-D، بیشترین میزان تولید کالوس در دو گونه زوفا در محیط کشت MS حاوی ۰/۵ میلی گرم در لیتر 2,4-D و ۰/۲ میلی گرم در لیتر NAA مشاهده شد که در آن زوفا معمولی پس از ۶ روز کالوس نشان داد در حالی که گونه محلی زوفا پس از ۱۱ روز شروع به پینه زدن کرد. بر اساس این تحقیق، این تیمار برای القای کالوس در هر دو گونه پیشنهاد شد (Tayefeh et al., 2018). تنظیم‌کننده‌های رشد با نقش تعیین کننده‌ای که در کشت درون شیشه گیاهان مختلف دارند می‌توانند بر رشد و تولید ترکیبات موثره گیاهان دارویی مختلف اثر گذار باشند. از این رو هدف از مطالعه حاضر بررسی تاثیر سطوح مختلف 2,4-D بر صفات رشدی، درصد کالوس‌زایی و تولید متابولیت‌های ثانویه در کالوس گیاه زوفا بود.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی

این مطالعه در آزمایشگاه بیوتکنولوژی کشاورزی واقع در دانشگاه آزاد اسلامی واحد دامغان انجام شد. بذر گیاه زوفا از بانک بذر موسسه تحقیقات جنگل‌ها و مراتع کشور تهیه گردید. ابتدا بذرها به مدت ۲۰ دقیقه در آب شهری شسته شدند. سپس، با اتانول ۷۰ درصد به مدت ۱ دقیقه و هیپوکلریت سدیم ۲/۵ درصد به مدت ۵ دقیقه ضدعفونی سطحی شده و در نهایت سه بار با آب مقطر استریل آبکشی شدند. بذرهای ضد عفونی شده در شیشه‌های کشت حاوی محیط کشت MS جهت جوانه‌زنی کشت و در اتاقک رشد با دمای ۲ ± ۲۵ درجه سانتیگراد با دوره روشنایی ۱۶ ساعت و شدت نور ۳۰۰۰ لوکس به مدت ۳۰ روز نگهداری شدند (Alizadeh and Hosseini, 2013). گیاهچه های حاصل به منظور اعمال تیمار مورد استفاده قرار گرفت.

تاثیر غلظت‌های مختلف 2,4-D بر کالوس‌زایی و رشد ریزنمونه

به منظور مطالعه تاثیر غلظت‌های مختلف 2,4-D بر ویژگی‌های رشدی، کالوس زایی و میزان متابولیت های ثانویه، ریزنمونه‌های ساقه دارای یک گره و دو عدد برگ از گیاهچه‌های حاصل در مرحله قبل تهیه و توسط قیچی ضدعفونی جدا شده و بر روی محیط کشت MS پایه حاوی غلظت‌های مختلف 2,4-D (صفر، ۱، ۲، ۳، ۴، و ۵ میلی‌گرم در لیتر) به صورت عمودی قرار داده شد. کشت‌ها در اتاقک رشد با دمای ۲ ± ۲۵ درجه سانتیگراد، دوره روشنایی ۱۶ ساعت و شدت نور ۳۰۰۰ لوکس به مدت ۴۰ روز نگهداری و هر ۲۰ روز یکبار واکشت شدند (Alizadeh and Hosseini, 2013). پس از ۴۰ روز شاخص‌های طول گیاهچه، طول ریشه، وزن تر و خشک گیاهچه، سطح برگ، تعداد برگ،

این مقاله نهایی نیست و پس از انتشار تغییراتی خواهد داشت.

درصد کالوس‌زایی، محتوای اسید رزمارینیک، اسید فولیک، کوئرستین، لوتئولین، فنول، فلاونوئید و آنتی‌اکسیدان اندازه-گیری شد.

اندازه گیری شاخص های رشد

اندازه گیری طول گیاهچه و طول ریشه با استفاده از خط کش انجام شد. به منظور تعیین وزن تر و خشک نمونه ها از ترازوی دیجیتالی با دقت ۰/۰۰۱ استفاده گردید (به منظور تعیین وزن خشک، گیاهچه‌ها به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۷۰ درجه سانتیگراد در آون نگهداری شدند). همچنین تعداد برگ شمارش و سطح برگ با استفاده از دستگاه Leaf area meter اندازه گیری شد. درصد کالوس زایی نیز از درصد تعداد ریزنمونه های دارای کالوس بر تعداد کل ریزنمونه ها محاسبه گردید.

تهیه عصاره از برگ‌ها

برای این منظور، ۵ گرم پودر برگ خشک شده با ۵۰ میلی‌لیتر متانول ۸۰ درصد مخلوط و به مدت ۲۴ ساعت روی شیکر نگهداری شد. پس از ۲۴ ساعت با استفاده از دستگاه روتاری حلال از عصاره جدا شد و عصاره خالص در ظرف کوچکی نگهداری شد (Ebrahimzade et al., 2008).

اندازه‌گیری محتوای فنول

مقدار فنول عصاره تهیه شده به روش ابراهیم‌زاده و همکاران (۲۰۰۸) مشخص گردید. برای این منظور، ۵۰۰ میکرولیتر از عصاره بدست آمده با ۵ میلی‌لیتر فولین سیوکالتیو (رقیق شده با نسبت ۱ به ۱۰ توسط آب مقطر) مخلوط شده و سپس ۴ میلی‌لیتر کربنات سدیم یک مولار اضافه شد. برای شاهد نیز بجای عصاره خشک،از متانول استفاده شد که از این محلول برای صفر کردن اسپکتروفتومتر استفاده شد. محلول حاصل ۱۵ دقیقه در تاریکی قرار داده شد و مقدار جذب در طول موج ۷۶۵ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر خوانده شد و از طریق منحنی استاندارد اسید گالیک مقدار فنول بر حسب اکی‌والان اسید گالیک در گرم عصاره خشک گزارش گردید.

اندازه‌گیری فعالیت آنتی‌اکسیدانی به روش DPPH

میزان مهار رادیکال‌های DPPH[۱] با روش ابراهیم‌زاده و همکاران (۲۰۰۸) مورد ارزیابی قرار گرفت. ابتدا از عصاره خشک تهیه شده، ۴۰ میلی‌گرم در ۲۵ میلی‌لیتر متانول حل گردید. در این مرحله رادیکال DPPH به غلظت ۰/۱ میلی-مولار تهیه شد. پس از افزودن عصاره‌ها، ۲ میلی‌لیتر متانول و ۲ میلی‌لیتر DPPH اضافه گردید و به مدت ۱۵ دقیقه در تاریکی قرار داده شد و مقدار جذب در طول موج ۵۱۷ نانومتر با دستگاه اسپکتروفتومتر خوانده شد. اعداد توسط فرمول زیر به درصد مهار تبدیل و ضمن تعیین معادله خط، درصد مهار ۵۰ (IC_{50}) محاسبه و بر اساس میلی‌گرم بر میلی‌لیتر گزارش شد.

$$\text{درصد مهار رادیکال‌های آزاد DPPH} = ((Ac - As) / Ac) \times ۱۰۰$$

در این رابطه، Ac جذب نوری شاهد و As جذب نوری نمونه بر حسب نانومتر است.

[۱] 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl

این مقاله نهایی نیست و پس از انتشار تغییراتی خواهد داشت.

اندازه‌گیری محتوای فلاونوئید

اندازه‌گیری محتوای فلاونوئید به روش ابراهیم زاده و همکاران (۲۰۰۸) انجام شد. برای این منظور ۰/۵ میلی‌لیتر از عصاره متانولی، ۱/۵ میلی‌لیتر متانول، ۱۰۰ میکرولیتر آلومینیوم کلرید ۱۰٪ در اتانول، ۱۰۰ میکرولیتر استات پتاسیم ۱ مولار و ۲/۸ میلی‌لیتر آب مقطر مخلوط شدند. محلول حاصل ۳۰ دقیقه در تاریکی قرار گرفته و مقدار جذب در طول موج ۴۱۵ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر خوانده شد. محتوای فلاونوئید با استفاده از منحنی استاندارد کوئرستین محاسبه و برحسب میلی‌گرم کوئرستین در گرم عصاره خشک گزارش گردید.

استخراج و اندازه‌گیری اسید رزمارینیک، اسید فولیک، کوئرستین و لوتئولین

برای این منظور، ۲۰ گرم بافت خشک پودر شده در ۲۰۰ میلی‌لیتر اتانول ۷۰ درصد به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد حمام آب گرم قرار داده شد. سپس نمونه‌ها خنک شده و با دور ۴۵۰۰ rpm به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفوژ شدند. این فرآیند دوبار تکرار گردید. عصاره حاصل به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۱۲۰۰۰rpm سانتریفوژ شده و محلول رویی تا زمان تزریق به دستگاه HPLC در دمای ۲۰- سانتیگراد نگهداری شدند. مقدار اسید رزمارینیک، اسید فولیک، کوئرستین و لوتئولین با استفاده دستگاه Knauer HPLC system (UV detector, Germany) با ستون کربن ۱۸ (TSKgel-ODS C-18, 5µm, 4. 6 × 250 mm, Japan) اندازه‌گیری شد. فاز متحرک شامل متانول و استیک اسید ۰/۱ درصد با نسبت ۵۰ : ۵۰ بود. سرعت جریان ۱ میلی‌لیتر در دقیقه و حجم تزریق ۱۰ میکرولیتر بود. میزان جذب در چهار دقیقه اول با طول موج ۳۳۰ نانومتر و در ادامه با طول موج ۳۷۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. مقدار سنتز این ترکیبات با استفاده از منحنی استاندارد اسید رزمارینیک اسید، اسید فولیک، کوئرستین و لوتئولین بدست آمد (Vlase et al., 2014).

آنالیز آماری

آزمایش در قالب طرح کاملا تصادفی با ۶ تیمار و ۵ تکرار انجام و پس از جمع‌آوری داده‌ها، تجزیه و تحلیل آماری با استفاده از نرم‌افزار SPSS 24.0 انجام گرفت. مقایسه میانگین داده‌ها از طریق آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ۵٪ انجام شد. برای رسم نمودار از نرم‌افزار Excel 2016 استفاده شد.

نتایج و بحث

آنالیز واریانس صفات مورد مطالعه

نتایج حاصل از تجزیه واریانس نشان داد که افزودن مقادیر مختلف 2,4-D به محیط کشت MS تاثیر معنی‌داری روی درصد کالوس‌زایی، طول گیاهچه، وزن تر گیاهچه، سطح برگ، تعداد برگ، محتوای اسید رزمارینیک، محتوای اسید فولیک، کوئرستین، لوتئولین، فلاونوئید و فعالیت آنتی اکسیدان داشت، اما تاثیری روی وزن خشک گیاهچه و محتوای فنول نداشت (جدول ۱ و ۲).

جدول ۱- آنالیز واریانس تاثیر غلظت‌های مختلف 2,4-D بر درصد کالوس‌زایی و رشد گیاهچه‌های زوفا

این مقاله نهایی نیست و پس از انتشار تغییراتی خواهد داشت.

منابع تغییر	درجه آزادی	میانگین مربعات Mean of square						
		درصد کالوس-زایی	طول گیاهچه	طول ریشه	وزن تر گیاهچه	وزن خشک گیاهچه	سطح برگ	تعداد برگ
2,4-D	۵	۵۶۰۹/۷۱**	۲۸/۴۱**	۰/۶۰**	۰/۰۰۶**	۰/۰۰۰۲ ns	۰/۳۱۷**	۱۱۵/۲۳**
خطا	۲۴	۲۶/۱۸۳	۱/۸۰۷	۰/۰۹۶	۰/۰۰۱	۰/۰۰۰۱۵۸	۰/۰۴۹	۷/۸۶۷
ضریب تغییرات (٪)		۸/۷۲	۱۰/۳۲	۱۱/۴۰	۱۳/۸۶	۸/۲۵	۱۲/۸۹	۹/۵۲

** معنی‌دار در سطح احتمال ۱ درصد، ns غیر معنی‌دار

درصد کالوس‌زایی

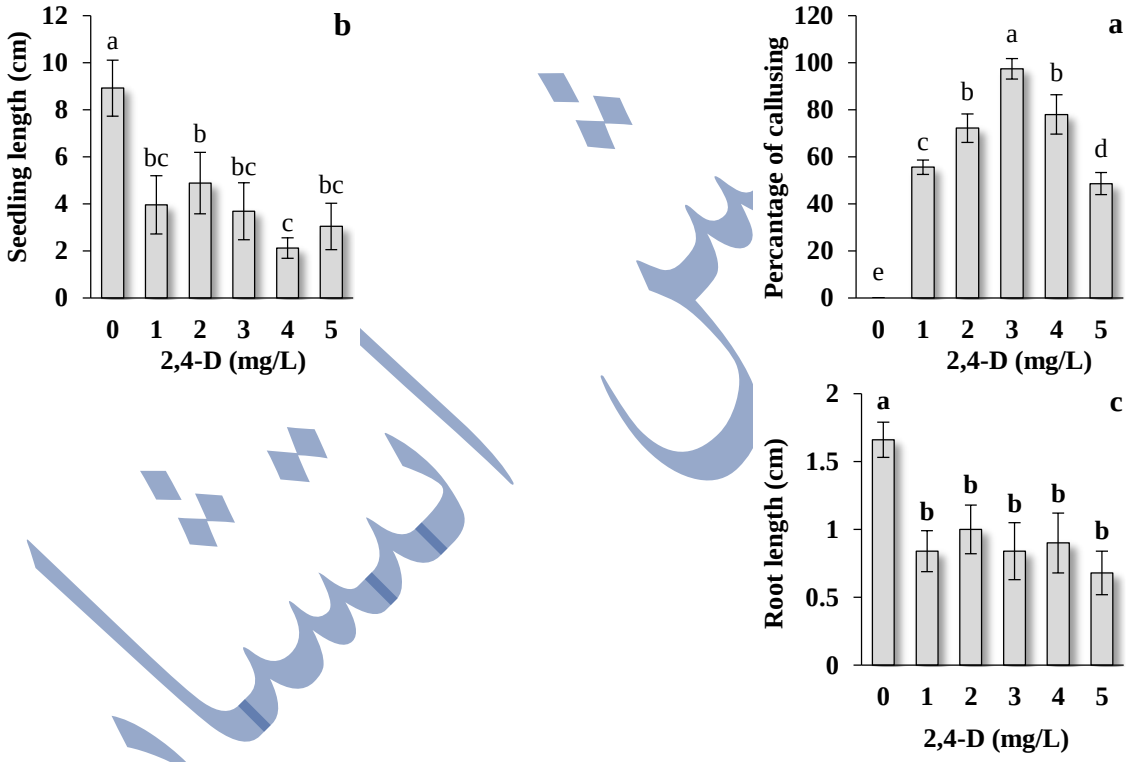
استفاده از غلظت‌های مختلف 2,4-D موجب القاء کالوس شده بود، در حالی که در شاهد القاء کالوس مشاهده نشد. با کاربرد ۱، ۲، ۴ و ۵ میلی‌گرم بر لیتر 2,4-D درصد کالوس‌زایی به ترتیب ۵۵/۶، ۷۲/۲، ۷۸ و ۴۸/۶ درصد بود. بین غلظت‌های مختلف 2,4-D بیشترین درصد کالوس‌زایی به میزان ۹۷/۴ درصد در غلظت ۳ میلی‌گرم در لیتر بدست آمد که نسبت به غلظت‌های ۱، ۲، ۴ و ۶ میلی‌گرم در لیتر به ترتیب ۱/۷۵، ۱/۳۵، ۱/۲۵ و ۲/۰۰ برابر بود (شکل ۱– a). تعیین ترکیبات تنظیم کننده رشد گیاهی در محیط کشت یک راهکار مهم برای القاء کالوس و تولید متابولیت‌های ثانویه است (Farjaminezhad *et al.*, 2013; Murthy *et al.*, 2014; Raj *et al.*, 2015). در کشت بافت گیاهی برای تولید بیشترین مقدار بیوماس و متابولیت‌های ثانویه بایستی ترکیب اکسین/سیتوکینین بهینه شود (Raj *et al.*, 2015). اکسین‌ها نقش مهمی را در القاء کالوس داشته و انواع مختلف اکسین‌ها اثرات مختلفی را دارند (Giannakoula *et al.*, 2012). در مطالعه صورت گرفته روی گیاه گیلاس زمستانی مشخص شد که محیط کشت MS حاوی ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D و ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر کینتین بیشتر درصد کالوس‌زایی (۹۸ درصد) را دارد (Chakraborty *et al.*, 2013). مطالعه انجام شده روی کشت گل نارس چریش نشان داد که بیشترین درصد کالوس‌زایی (۷۸ درصد) در محیط کشت MS حاوی ۱ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D و ۱ میلی‌گرم در لیتر BAP، ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA و ۳ درصد ساکارز حاصل می‌شود (Rafiq and Dahot, 2010). در گیاه *Rhodiola imbricata*، کالوس در محیط کشت MS حاوی ۳ میلی‌گرم در لیتر NAA و ۳ میلی‌گرم در لیتر BAP بدست آمد (Kapoor *et al.*, 2019). در کشت گیاه مخملی با کاربرد ریزنمونه‌های برگ، ساقه و دمبرگ کالوس در محیط کشت MS حاوی بیش از ۱ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D بدست آمد (Jie et al., 2019). در گیاه *Tridx procumbens* بیشترین میزان القای کالوس و درصد باززایی در غلظت ۲ میلی‌گرم در لیتر 2-4-D حاصل گردید (Wani et al., 2010). مشخص شد که بالاترین درصد کالزایی و وزن کالوس در محیط کشت پایه MS حاوی ۲ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D برای Angustifolia تولید شد (Keikhaakhar et al., 2013). در مطالعه انجام شده بر روی گیاه مرزنجوش (*Origanum vulgare*) مشخص شد که بهترین محیط کشت برای تشکیل و تکثیر کالوس، محیط کشت پایه MS حاوی 2,4-D با غلظت ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر می‌باشد (Kumari and Saradhi, 1992).

صفات رشدی

طول گیاهچه و ریشه: غلظت‌های مختلف 2,4-D طول گیاهچه را نسبت به شاهد کاهش داد. با کاربرد غلظت‌های مختلف 2,4-D بیشترین طول گیاهچه با میانگین ۴/۸۸ سانتی‌متر در غلظت ۲ میلی‌گرم بر لیتر بدست آمد که نسبت به

این مقاله نهایی نیست و پس از انتشار تغییراتی خواهد داشت.

شاهد ۴۵ درصد کاهش یافت. بطورکلی، بیشترین طول گیاهچه با میانگین ۸/۹۲ سانتیمتر در تیمار شاهد و کمترین طول گیاهچه با میانگین ۲/۱۲ سانتی‌متر در تیمار ۴ میلی‌گرم بر لیتر 2,4-D بدست آمد (شکل ۱– b). نتایج مقایسه میانگین نشان داد که در بین غلظت‌های مختلف هورمون 2,4-D بیشترین طول ریشه (۱ سانتی‌متر) با کاربرد ۲ میلی‌گرم بر لیتر بدست آمد که نسبت به شاهد ۴۰ درصد کاهش یافته بود. بنابراین، افزودن غلظت‌های 2,4-D موجب کاهش طول ریشه گیاه زوفا گردید. کمترین طول ریشه نیز با میانگین ۰/۶۸ سانتی‌متر با کاربرد ۵ میلی‌گرم بر لیتر 2,4-D بدست آمد که نسبت به شاهد بیش از ۵۹ درصد کاهش نشان داد (شکل ۱– c و ۲).



شکل ۱– تاثیر غلظت‌های مختلف 2,4-D بر درصد کالوس‌زایی (a) و طول گیاهچه (b) و ریشه (c) در کشت درون شیشه زوفا. مقایسه میانگین به روش آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ۵ درصد. حروف غیر مشابه نشان دهنده تفاوت معنی‌دار است. ارور بارها بر اساس خطای استاندارد رسم شده است.

این مقاله نهایی نیست و پس از انتشار تغییراتی خواهد داشت.

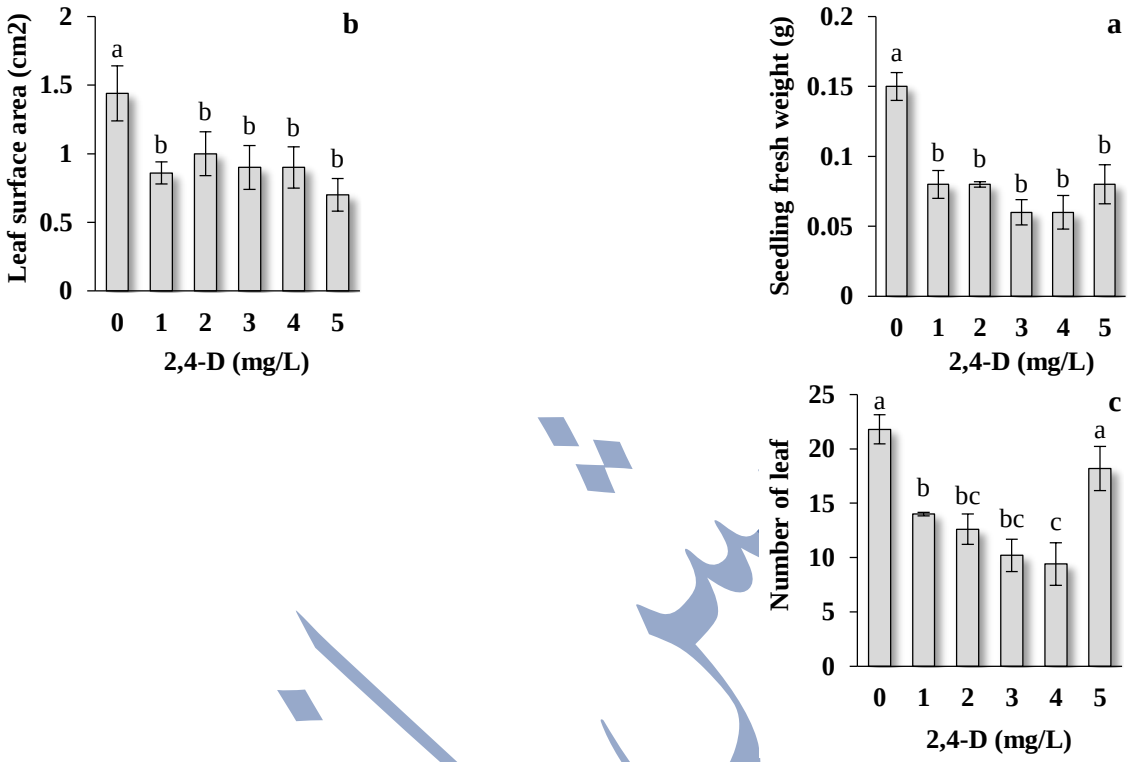
شکل ۲- گیاهچه‌های گیاه زوفا پس از اعمال غلظت‌های مختلف 2,4-D

وزن تر و خشک گیاهچه: نتایج نشان داد که استفاده از 2,4-D موجب کاهش رشد گیاهچه و در نتیجه کاهش وزن تر گیاهچه گردید. با کاربرد ۱، ۲، ۳، ۴ و ۵ میلی‌گرم بر لیتر 2,4-D میانگین وزن تر گیاهچه به ترتیب ۰/۰۷۹، ۰/۰۸۱، ۰/۰۵۸، ۰/۰۶ و ۰/۰۸۱ گرم بود. بین غلظت‌های مختلف 2,4-D بیشترین (۰/۰۸۱ گرم) و کمترین (۰/۰۵۸ گرم) وزن تر گیاهچه با کاربرد ۲ و ۳ میلی‌گرم در لیتر بدست آمد که نسبت به شاهد به ترتیب ۴۶ و ۶۱ درصد کاهش نشان داد (شکل ۳- a). نتایج بدست آمده از تجزیه واریانس نشان داد که غلظت‌های مختلف هورمون 2,4-D تاثیر معنی‌داری بر وزن خشک گیاهچه نداشت. بطورکلی، بین غلظت‌های مختلف 2,4-D اضافه شده به محیط کشت و شاهد اختلاف آماری معنی‌داری مشاهده نشد.

تعداد و سطح برگ: نتایج نشان داد که غلظت‌های مختلف هورمون 2,4-D تاثیر منفی بر تعداد برگ داشت و تعداد آن نسبت به شاهد کاهش یافت. با کاربرد غلظت‌های مختلف 2,4-D بیشترین تعداد برگ با میانگین ۱۸/۲ عدد در غلظت ۵ میلی‌گرم بر لیتر بدست آمد که نسبت به شاهد ۱۶ درصد کاهش نشان داد. بطورکلی، بیشترین تعداد برگ با میانگین ۲۱/۸ عدد در تیمار شاهد و کمترین تعداد برگ با میانگین ۹/۴ عدد در تیمار ۴ میلی‌گرم بر لیتر 2,4-D بدست آمد (شکل ۳- b) بر اساس مقایسه میانگین، در بین غلظت‌های مختلف هورمون 2,4-D بیشترین سطح برگ با میانگین ۱ سانتی‌متر مربع با کاربرد غلظت ۲ میلی‌گرم بر لیتر بدست آمد که نسبت به شاهد ۳۰ درصد کاهش یافت. بنابراین، افزودن غلظت‌های 2,4-D موجب کاهش سطح برگ گیاه زوفا گردید. کمترین سطح برگ نیز با میانگین ۰/۷۰ سانتی-مترمربع با کاربرد ۵ میلی‌گرم بر لیتر 2,4-D بدست آمد که نسبت به شاهد ۵۱ درصد کاهش نشان داد (شکل ۳- c).

تحقیقات متعددی، گویای تاثیرگذاری عوامل خارجی و داخلی بر نتایج حاصل از کشت بافت میباشد که از جمله این عوامل می‌توان به نوع ریزنمونه، ترکیبات محیط کشت و شرایط فیزیکی محیط اشاره کرد (Lal et al., 2016). کاربرد تنظیم کننده های رشد از جمله اکسین ها و سایتوکینین ها می توانند موجب بهبود صفات رشدی شوند. برطبق نتایج کاربرد توأم و تنهای هورمون‌های رشد موجب افزایش شاخص های رشد، ترکیبات بیوشیمیایی و مواد موثره گیاه ترخون در شرایط درون شیشه ای شد (Shakoori and Kashefi, 2019; Yaacob et al., 2022; Sedaghati and Assareh, 2022).

این مقاله نهایی نیست و پس از انتشار تغییراتی خواهد داشت.



شکل ۳- تاثیر غلظت‌های مختلف 2,4-D بر وزن تر گیاهچه (a)، سطح برگ (b) و تعداد برگ (c) در کشت درون شیشه زوفا. مقایسه میانگین به روش آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ۵ درصد. حروف غیر مشابه نشان دهنده تفاوت معنی‌دار است. ارور بارها بر اساس خطای استاندارد رسم شده است.

جدول ۲- آنالیز واریانس تاثیر غلظت‌های مختلف 2,4-D بر فعالیت‌های آنتی اکسیدان و سنتز متابولیت‌های ثانویه گیاهچه‌های زوفا

منابع تغییر	درجه آزادی	میانگین مربعات						
		اسید رزمارینیک	اسید فولیک	کوئرستین	لوتئولین	فنول	فلاونوئید	آنتی اکسیدان
2,4-D	۵	۰/۲۰۶**	۷۶/۵۰۵**	۰/۵۰۴**	۰/۴۰۸**	۰/۰۰۲ ns	۰/۰۲۳**	۵/۵۶۷**
خطا	۲۴	۰/۰۱۲	۰/۷۱۹	۰/۰۰۷	۰/۰۰۶	۰/۰۰۱	۰/۰۰۵	۰/۳۴۷
ضریب تغییرات (٪)		۱۳/۵۶	۶/۶۲	۶/۲۱	۶/۵۶	۱۰/۵۲	۱۲/۹۲	۸/۰۹

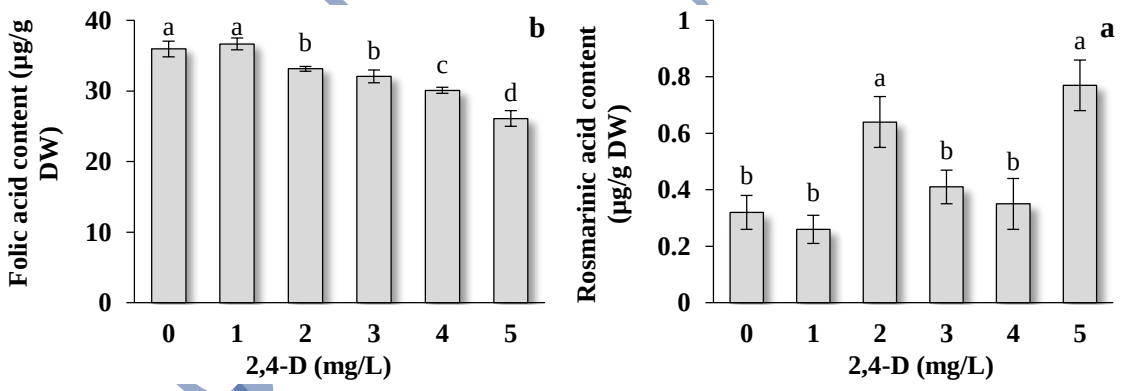
** معنی‌دار در سطح احتمال ۱ درصد، ns غیر معنی‌دار

محتوای اسید رزمارینیک و اسید فولیک

نتایج نشان داد که کاربرد غلظت‌های مختلف 2,4-D بسته به غلظت تاثیر مثبت و منفی بر تولید اسید رزمارینیک داشت. بطورکلی، بیشترین مقدار اسید رزمارینیک با میانگین ۰/۷۷ میکروگرم در گرم وزن خشک در ۵ میلی‌گرم بر

این مقاله نهایی نیست و پس از انتشار تغییراتی خواهد داشت.

لیتر 2,4-D که نسبت به شاهد افزایش داشت و کمترین مقدار آن با میانگین ۰/۲۶ میکروگرم در گرم وزن خشک در تیمار ۱ میلی‌گرم بر لیتر 2,4-D بدست آمد (شکل ۴- a). در بین غلظت‌های مختلف هورمون 2,4-D بیشترین مقدار اسید فولیک (۳۶/۶۵ میکروگرم در گرم وزن خشک) با کاربرد ۱ میلی‌گرم بر لیتر بدست آمد. غلظت‌های بالای آن تاثیر منفی بر سنتز اسید فولیک نشان داد. کمترین مقدار اسید فولیک با میانگین ۲۶/۰۹ میکروگرم در گرم وزن خشک با کاربرد ۵ میلی‌گرم بر لیتر 2,4-D بدست آمد که نسبت به شاهد بیش از ۲۷ درصد کاهش یافت. بنابراین، افزودن غلظت‌های پایین 2,4-D موجب افزایش سنتز اسید فولیک در گیاه زوفا گردید (شکل ۴- b). بسیاری از گزارش‌های اولیه نقش اساسی تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی در رشد سلول و سنتز متابولیت‌های ثانویه را شرح داده‌اند. علاوه بر این، تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی مشابه برحسب نوع و غلظت آن‌ها می‌توانند بیوسنتز متابولیت‌های خاص را تحریک یا مهار کنند. بنابراین، تعیین نوع و غلظت بهینه اکسین‌ها و سیتوکینین‌ها برای رشد سلولی از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است (Farjaminezhad and Garoosi, 2019). گیاهان مختلف پاسخ‌های متفاوتی را به تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی نشان می‌دهند. به عنوان مثال، بهترین رشد کشت سلول گیاه تشنه‌دارو در محیط کشت MS حاوی ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BA حاصل شده است (Khanpour-Ardestani *et al*., 2015).



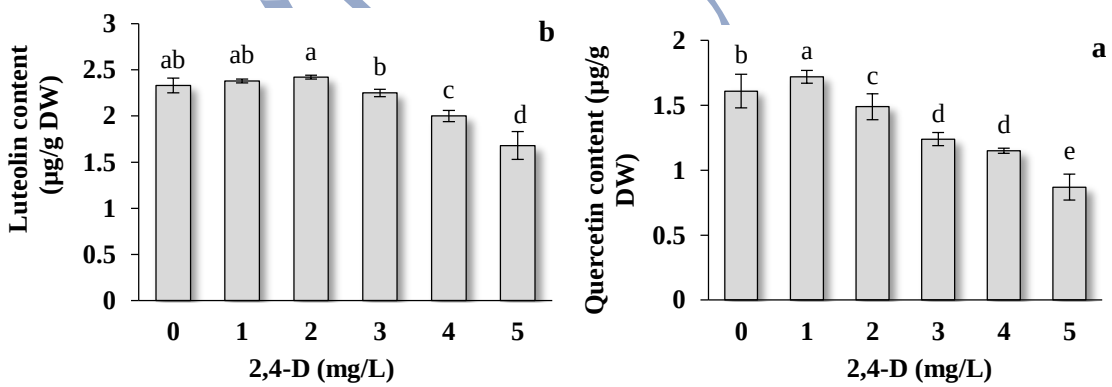
شکل ۴- تاثیر غلظت‌های مختلف 2,4-D بر محتوای اسید رزمارینیک (a) و اسید فولیک (b) در کشت درون شیشه زوفا. مقایسه میانگین به روش آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ۵ درصد. حروف غیر مشابه نشان دهنده تفاوت معنی-دار است. ارور بارها بر اساس خطای استاندارد رسم شده است.

محتوای کوئرستین و لتئولین

افزودن غلظت‌های مختلف 2,4-D به محیط کشت موجب تغییر مقدار سنتز کوئرستین در گیاهچه‌ها شد. نتایج نشان داد که استفاده از غلظت‌های پایین 2,4-D موجب افزایش سنتز کوئرستین گردید، اما غلظت‌های بالاتر سنتز آن را مهار نمود. با کاربرد ۱، ۲، ۳، ۴ و ۵ میلی‌گرم بر لیتر 2,4-D میانگین مقدار کوئرستین به ترتیب ۱/۷۲، ۱/۴۹، ۱/۲۴، ۱/۱۵ و ۰/۸۷ میکروگرم در گرم وزن خشک بود. بین غلظت‌های مختلف 2,4-D، بیشترین مقدار کوئرستین (۱/۷۲ میکروگرم در گرم وزن خشک) و کمترین مقدار آن (۰/۸۷ میکروگرم در گرم وزن خشک) با کاربرد ۱ و ۵ میلی‌گرم بر لیتر بدست آمد که نسبت به شاهد به ترتیب ۷ درصد افزایش و ۴۵ درصد کاهش یافت (شکل ۵- a). در بین غلظت‌های مختلف هورمون 2,4-D بیشترین مقدار لوتئولین با میانگین ۲/۴۲ میکروگرم در گرم وزن خشک با کاربرد غلظت ۲

این مقاله نهایی نیست و پس از انتشار تغییراتی خواهد داشت.

میلی‌گرم بر لیتر بدست آمد. بنابراین، افزودن غلظت‌های ۱، ۲ و ۳ میلی‌گرم بر لیتر 2,4-D موجب افزایش سنتز لوتئولین در گیاه زوفا گردید، اما غلظت‌های بالاتر منجر به مهار سنتز آن شد. کمترین مقدار لوتئولین با میانگین ۱/۶۸ میکروگرم در گرم وزن خشک با کاربرد ۵ میلی‌گرم بر لیتر 2,4-D بدست آمد که نسبت به شاهد حدود ۲۸ درصد کاهش داشت (شکل ۵- b). گزارش‌های اولیه اثرات نسبت اکسین به سیتوکینین روی تولید متابولیت‌های ثانویه نظیر ایزوفلاون‌ها (Luczkiewicz *et al.*, 2014)، اسیدهای فنولی (Szopa and Ekiert, 2014) و آلکالوئیدها (Raj *et al.*, 2015) در کشت‌های سلول گیاهی را نشان داده‌اند. در کشت سوسپانسیون سلولی گیاه تشنه‌دارو بیشترین مقدار استوزید در محیط کشت MS حاوی ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA و ۲ میلی‌گرم در لیتر BA تولید شد (Khanpour-Ardestani *et al.*, 2015). برطبق گزارش ها، محیط کشت MS حاوی ۰/۴ میلی‌گرم در لیتر BA و ۰/۴ میلی‌گرم در لیتر کینتین مقدار هیپرسین در *Hypricum maculatum* و هیپرفورین در *Hypricum hirustum* افزایش یافت، اما در هر دو گونه هنگام استفاده از TDZ غلظت هیپرسین و هیپرفورین روند کاهشی مشاهده شد (Coste *et al.*, 2011). در کشت سوسپانسیون سلولی جنسینگ آمریکایی بیشترین مقدار ساپونین‌های جنسینوزید با کاربرد ۲/۵ میلی‌گرم در لیتر IBA و ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر کینتین و بدون کاربرد 2,4-D بدست آمده بود (Zhong *et al.*, 1996). در کشت گیاه رنگین زرد بالاترین محتوای ایزوفلاون با کاربرد ۵ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر کینتین تولید شده بود (Luczkiewicz *et al.*, 2014).



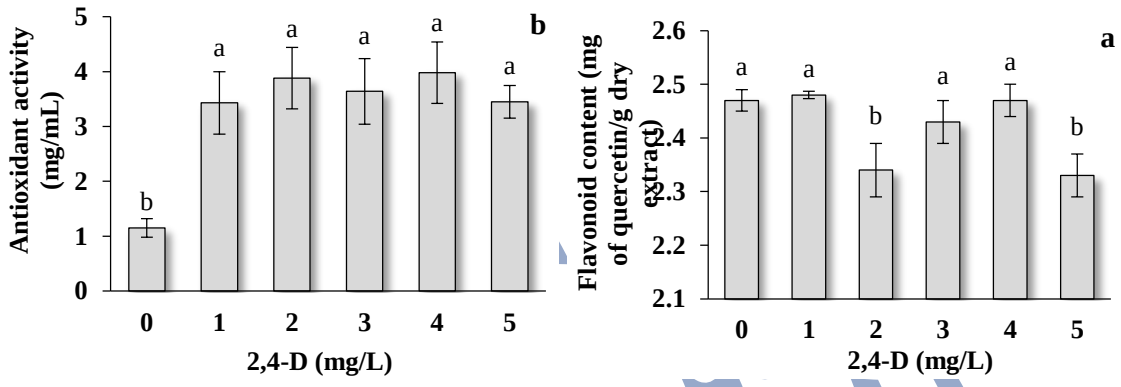
شکل ۵- تاثیر غلظت‌های مختلف 2,4-D بر محتوای کوئرستین (a) و لوتئولین (b) در کشت درون شیشه زوفا. مقایسه میانگین به روش آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ۵ درصد. حروف غیر مشابه نشان دهنده تفاوت معنی‌دار است. ارور بارها بر اساس خطای استاندارد رسم شده است.

محتوای فنول، فلاونوئید و فعالیت آنتی اکسیدان

نتایج نشان داد که غلظت‌های مختلف هورمون 2,4-D تاثیری بر مقدار فنول نداشته و بین غلظت‌های مختلف 2,4-D اضافه شده به محیط کشت و شاهد از نظر مقدار فنول اختلاف آماری معنی‌داری وجود نداشت. لذا، نتایج عددی تاثیر هورمون بر میزان فنول در اینجا ارائه نشد. مقایسه میانگین نشان داد که کاربرد غلظت‌های مختلف 2,4-D اثرات متفاوتی بر مقدار فلاونوئید دارد. بطوریکه، بیشترین مقدار فلاونوئید با میانگین ۲/۴۸ میلی‌گرم کوئرستین در گرم عصاره خشک در تیمار ۱ میلی‌گرم بر لیتر 2,4-D بدست آمد که نسبت به شاهد اختلاف معنی‌داری نداشت و کمترین مقدار آن با میانگین ۲/۳۳ و ۲/۳۴ میلی‌گرم کوئرستین در گرم عصاره خشک در تیمار ۵ و ۲ میلی‌گرم بر لیتر 2,4-D

این مقاله نهایی نیست و پس از انتشار تغییراتی خواهد داشت.

بدست آمد (شکل ۶– a). بین غلظت‌های مختلف 2,4-D بیشترین (۳/۹۸ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) و کمترین (۳/۴۳ میلی-گرم بر میلی‌لیتر) فعالیت آنتی‌اکسیدان با کاربرد ۴ و ۱ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D بدست آمد؛ با این حال، بین غلظت‌های مختلف 2,4-D اعمال شده اختلاف معنی‌داری وجود نداشت (شکل ۶– b).



شکل ۶– تاثیر غلظت‌های مختلف 2,4-D بر محتوای فلاونوئید (a) و فعالیت آنتی‌اکسیدان (b) در کشت درون شیشه زوفا. مقایسه میانگین به روش آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ۵ درصد. حروف غیر مشابه نشان دهنده تفاوت معنی-دار است. ارور بارها بر اساس خطای استاندارد رسم شده است.

نتیجه‌گیری

در این مطالعه تاثیر غلظت‌های مختلف تنظیم کننده رشد گیاهی 2,4-D بر صفات رشدی، کالوس‌زایی و تولید متابولیت‌های ثانویه گیاه زوفا مورد مطالعه قرار گرفت. نتایج نشان داد که بیشترین درصد کالوس‌زایی با کاربرد ۳ میلی‌گرم بر لیتر 2,4-D حاصل می‌شود. بیشترین طول گیاهچه، طول ریشه، وزن تر گیاهچه، سطح برگ و تعداد برگ در شرایط عدم کاربرد 2,4-D بدست آمد. بالاترین مقدار اسید رزمارینیک و لوتئولین در حضور ۲ میلی‌گرم بر لیتر 2,4-D مشاهده شد. بیشترین محتوای اسید فولیک، کوئرستین و فلاونوئید با کاربرد ۱ میلی‌گرم بر لیتر 2,4-D حاصل گردید. همچنین، بیشترین فعالیت آنتی اکسیدان با افزودن ۴ میلی‌گرم بر لیتر 2,4-D بدست آمد. نتایج نشان داد کاربرد تنظیم‌کننده رشد 2, 4-D می تواند در بهبود درصد کالوس زایی و میزان متابولیت‌های ثانویه موثر باشد. با توجه به اهمیت این گیاه و احتمال انقراض آن، می توان از این نتایج برای حفاظت از این گیاه ارزشمند استفاده کرد.

سپاسگزاری

نویسندگان مقاله بدین‌وسیله مراتب تشکر و قدردانی خود را از مسئولین محترم دانشگاه آزاد اسلامی واحد دامغان جهت فراهم آوردن امکانات پژوهشی برای انجام این تحقیق ابراز می دارند.

این مقاله نهایی نیست و پس از انتشار تغییراتی خواهد داشت.

منابع

Ahmad, W., Zahir, A., Nadeem, M., Zia, M., Hano, C. & Abbasi, B.H. (2019). Thidiazuron-induced efficient biosynthesis of phenolic compounds in callus culture of *Ipomoea turbinata* Lagasca and Segura. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 55(6), 710-719. https://doi.org/10.1007/s11627-019-10027-1.

Alizadeh, M. & Hosseini, B. (2013). Effect of Population Type and BAP Treatments on In vitro Regeneration of Hyssop (*Hyssopus officinalis* L.). *Journal of Horticultural Science*, 27(2), 201-207. https://doi.org/10.22067/jhorts4.v0i0.24822.

Anand, U., Jacobo-Herrera, N., Altemimi, A. & Lakhssassi, N. (2019). A comprehensive review on medicinal plants as antimicrobial therapeutics: potential avenues of biocompatible drug discovery. *Metabolites*, 9(11), 258. https://doi.org/10.3390/metabo9110258.

Chakraborty, N., Banerjee, D., Ghosh, M., Pradhan, P., Gupta, N.S., Acharya, K. & Banerjee, M. (2013). Influence of plant growth regulators on callus mediated regeneration and secondary metabolites synthesis in *Withania somnifera* (L.) Dunal. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 19(1), 117-125. https://doi.org/10.1007%2Fs12298-012-0146-2.

Coste, A., Vlase, L., Halmagyi, A., Deliu, C. & Coldea, G. (2011). Effects of plant growth regulators and elicitors on production of secondary metabolites in shoot cultures of *Hypericum hirsutum* and *Hypericum maculatum*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 106(2), 279-288. http://doi.org/10.1007/s11240-011-9919-5.

Ebrahimzade, MA., Hosseinimehr, S.J., Hamidinia, A. & Jafari, M. (2008). Antioxidant and free radical scavenging activity of *Feijoa sellowiana* fruits peel and leaves. *Pharmacologyonline*, 1, 7-14.

Espinosa-Leal, C.A., Puente-Garza, C.A. & García-Lara, S. (2018). In vitro plant tissue culture: means for production of biological active compounds. *Planta*, 248(1), 1-18. https://doi.org/10.1007/s00425-018-2910-1.

Farjaminezhad, R. & Garoosi, G.A. (2019). New biological trends on cell and callus growth and azadirachtin production in *Azadirachta indica*. 3 *Biotech*, 9(8), 1-17. https://doi.org/10.1007/s13205-019-1836-z.

Farjaminezhad, R., Zare, N., Zakaria, R.A. & Farjaminezhad, M. (2013). Establishment and optimization of cell growth in suspension culture of *Papaver bracteatum*: a biotechnology approach for thebaine production. *Turkish Journal of Biology*, 37(6), 689-697. https://doi.org/10.3906/biy-1304-54.

George, E.F., Hall, M.A. and De Klerk, G. (2008) Plant propagation by tissue culture, 3rd edn. Springer, Berlin.

Giannakoula, A.E., Ilias, I.F., Maksimović, J.J.D., Maksimović, V.M. & Živanović, B.D. (2012). The effects of plant growth regulators on growth, yield, and phenolic profile of lentil plants. *Journal of Food Composition and Analysis*, 28(1), 46-53. https://doi.org/10.1016/j.jfca.2012.06.005.

Hendrawati, O., Woerdenbag, H.J., Hille, J. and Kayser, O. (2012) Metabolic engineering of medicinal plants and microorganisms for the production of natural products. Pharmaceutical Biotechnology: Drug Discovery and Clinical Applications, 2nd ed.; Kayser, O., Warzecha, H., Eds. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co KGaA, Weinheim.

Jain, C., Khatana, S. & Vijayvergia, R. (2019). Bioactivity of secondary metabolites of various plants: a review. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Research*, 10(2), 494-504. http://doi.org/10.13040/IJPSR.0975-8232.

Jie, E.Y., Atong, N.S., Ahn, W.S., Ahn, M.S., Min, B.H., Kadzimin, S. & Kim, S.W. (2019). High-frequency plant regeneration from embryogenic cell suspension cultures of *Gynura procumbens*. *Plant Biotechnology Reports*, 13(1), 27-33. http://doi.org/10.1007/s11816-018-0507-6.

این مقاله نهایی نیست و پس از انتشار تغییراتی خواهد داشت.

Keikhaakhar, F., Khadem, A. & Sharifi, A. (2013). Improving of tissue culture of *angustifolia*. 3rd Iranian Agricultural Biotechnology Conference, Mashhad. Iran.
Khanpour-Ardestani, N., Sharifi, M. & Behmanesh, M. (2015). Establishment of callus and cell suspension culture of *Scrophularia striata* Boiss.: an in vitro approach for acteoside production. *Cytotechnology*, 67(3), 475-485. https://doi.org/10.1007%2Fs10616-014-9705-4.

Kumari, N. & Saradhi, P. (1992). Regeneration of plants from callus cultures of *Origanum vulgare*. *Plant Cell Reproductive*, 11(9), 476-479. https://doi.org/10.1007/bf00232694.

Lal, D., Sharma, A., Tak, K. R. & Ashok, T. H. (2016). Effect of growth regulators and chemical supplements on callus induction in japonica rice varieties through anther culture. *Research in Environment and Life Sciences*, 9(7), 903-906. http://doi.org/10.3923/pjbs.2004.331.334.

Luczkiewicz, M., Kokotkiewicz, A. & Glod, D. (2014). Plant growth regulators affect biosynthesis and accumulation profile of isoflavone phytoestrogens in high-productive in vitro cultures of *Genista tinctoria*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 118(3), 419-429. http://doi.org/10.1007/s11240-014-0494-4.

Mahadi, I., Syafi'I, W. & Sari Y. (2016). Callus induction of calamansi (*Citrus microcarpa*) using 2,4-D and BAP hormones by in vitro methods. *Indonesian Journal of Agricultural Science*, 21(2), 84–89. http://doi.org/10.18343/jipi.21.2.84.

Maslova, E., Gulya, N., Perelugina, T., Semykina, V. & Kalashnikova, E. (2021). Introduction of *Hyssopus officinalis* L. into in vitro culture to optimize the conditions for obtaining callus tissues and microclonal propagation as a promising method of innovative agrobiotechnologies. BIO Web of Conferences 30, 05006. https://doi.org/10.1051/bioconf/20213005006.

Murthy, H.N., Lee, E.J. & Paek, K.Y. (2014). Production of secondary metabolites from cell and organ cultures: strategies and approaches for biomass improvement and metabolite accumulation. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 118(1), 1-16. http://doi.org/10.1007/s11240-014-0467-7.

Prins, C.L., Vieira, I.J. & Freitas, S.P. (2010). Growth regulators and essential oil production. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, 22, 91-102. https://doi.org/10.1590/S1677-04202010000200003.

Rafiq, M. & Dahot, M.U. (2010). Callus and azadirachtin related limonoids production through in vitro culture of neem (*Azadirachta indica* A. Juss). *African Journal of Biotechnology*, 9(4), 449- 453. https://doi.org/10.5897/AJB09.1091.

Raj, D., Kokotkiewicz, A., Drys, A. & Luczkiewicz, M. (2015). Effect of plant growth regulators on the accumulation of indolizidine alkaloids in *Securinega suffruticosa* callus cultures. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 123(1), 39-45. http://doi.org/10.1007/s11240-015-0811-6.

Sedaghati, M & Assareh, M. H. (2022). Response of different plant species to callus induction. *Journal of medicinal plants biotechnology*, 7(2), 98-105.

Shakoori, Y. & Kashefi, B. (2019). Effects of culture medium and growth regulators on growth traits and secondary metabolites of *Artemisia dracunculus* L. under in vitro conditions. *Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants*, 35(3), 437-455. https://doi.org/10.22092/ijmapr.2019.122953.2377.

Shoja, H. M. & Shishavan, H. K. (2021). Effects of different hormonal treatments on growth parameters and secondary metabolite production in organ culture of *Hyssopus* officinalis L. BioTechnologia. *Journal of Biotechnology Computational Biology and Bionanotechnology*, 102(1), 33-41. http://doi.org/10.5114/bta.2021.103760.

Stancheva, I., Geneva, M., Hristozkova, M. & Zayova, E. (2019). Comparison of bioactive compounds in *Hyssopus officinalis* plants collected from natural habitats with those propagated from seed and in vitro. *Journal of Herbs, Spices & Medicinal Plants*, 25(2), 104-113. https://doi.org/10.1080/10496475.2019.1572686.

Szopa, A. & Ekiert, H. (2014). Production of biologically active phenolic acids in *Aronia melanocarpa* (Michx.) Elliott in vitro cultures cultivated on different variants of the Murashige and Skoog medium. *Plant Growth Regulation*, 72(1), 51-58. http://doi.org/10.1007/s10725-013-9835-2.

Tayefeh, S., Mahna, N., Kazemitabar, S. K & Ghasemi-Omran, V. (2018). Callogenesis induction in two Hyssopus species (*H. officinalis* and *H. angustifolius*) using different hormonal levels and culture media. *Journal of Medicinal Plants Biotechnology*, 3(2), 29-39.

Teixeira, M. G., Carvalho, M., Leite, M. A., Barbosa, S., Santos, P. R. & Santos, B. R. (2019). Effect of salicylic acid, 2, 4-D and 2i-P on the production of secondary metabolites in *Garcinia brasiliensis* Mart. Callus. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 62, 1- 11. http://doi.org/10.1590/1678-4324-2019170303.

Vlase, L., Benedec, D., Hanganu, D., Damian, G., Csillaq, I., Sevastre, B., Mot, A. C., Silaghi-Dumitrescu, R. & Tilea, I. (2014). Evaluation of antioxidant and antimicrobial activities and phenolic profile for *Hyssopus officinalis*, *Ocimum basilicum* and *Teucrium chamaedrys*. *Molecules*, 19, 5490-5507. https://doi.org/10.3390/molecules19055490.

Wani, M., Pande, S. & More, M. (2010). Callus induction studies in *Tridax procumbents* L., International *Journal of Biotechnology Application*, 2(1), 11-14. http://dx.doi.org/10.9735/0975-2943.

Wesolowska, A., Jadczak, D. O. R. O. T. A. & Grzeszczuk, M. O. N. I. K. A. (2010). Essential oil composition of hyssop *Hyssopus officinalis* L. cultivated in north-western Poland. *Herba Polonica*, 56(1), 57-65.

Yaacob, J. S., Ramli, M., Abd Rahim, M. H., Selvaraj, A. M. R. & Nyanasaigran, L. (2022). Comparative Analysis on the Role of 2,4-Dichlorophenoxyacetic Acid in the Expression of Bioactive Compounds in Callus of *Capsicum frutescens*. *Sains Malaysiana*, 51(10), 3171-3182. http://doi.org/10.17576/jsm-2022-5110-05.

Zhong, J. J., Bai, Y. and Wang, S. J. (1996). Effects of plant growth regulators on cell growth and ginsenoside saponin production by suspension cultures of *Panax quinquefolium*. *Journal of Biotechnology*, 45(3), 227-234. https://doi.org/10.1016/0168-1656(95)00170-0.

این مقاله نهایی نیست و پس از انتشار تغییراتی خواهد داشت.

Studying the effect of different concentrations of 2,4-D on the growth and secondary metabolites production in hyssop (*Hyssopus officinalis*) in *in vitro* culture.

Hoshmand Mahmoudjanlou[1], Bahareh Kashefi[2*], Esmaeil Babakhanzadeh[3]

[1, 2] Department of Horticulture, Faculty of Agriculture, Islamic Azad University, Damghan Branch, Damghan, Iran.

[3]Agricultural Research, Education and Extension Organization, Agricultural and Natural Resources Research and Education Center of Semnan Province (Shahrood), Semnan, Iran.

* Corresponding author e-mail: bahareh.kashefi@gmail.com

Abstract

The hyssop belongs to the Lamiaceae family and is used in traditional medicine and in the pharmaceutical and food industries. It has antibacterial, antifungal, antioxidant and antispasmodic activities and is used effectively in the treatment of cough, bronchitis, severe asthma and other respiratory diseases. In this study, the effect of different concentrations of 2,4-D (0, 1, 2, 3, 4 and 5 mg/liter) on callusing, growth and production of secondary metabolites of the studied hyssop plant. The results showed that the use of different concentrations of 2,4-D had a significant effect on the percentage of callusing, seedling and root length, seedling fresh weight, number and leaf surface area, content of rosmarinic acid, folic acid, quercetin, luteolin, flavonoid and antioxidant activity. In general, the highest percentage of callusing (97.40%) was achieved with the application of 3 mg/L 2,4-D. The maximum seedling length (8.92 cm), root length (1.66 cm), seedling fresh weight (0.15 g), leaf surface area (1.44 cm^2), and number of leaves (21.80) 2,4-D were obtained under the control condition. The maximum amount of rosmarinic acid (0.64 µg/g dry weight) and luteolin (2.42 µg/g dry weight) was observed in the presence of 2 mg/L 2,4-D. The maximum contents of folic acid (36.65 µg/g dry weight), quercetin (1.72 µg/g dry weight), and flavonoid (2.48 mg quercetin/g dry extract) were obtained with application of 1 mg/L 2,4-D.Also, the maximum antioxidant activity (3.98 µg/mL) was obtained by adding 4 mg/L 2,4-D.

Keywords: Antioxidant, Acid Rosmarinic, Growth regulators, Quercetin, Luteolin.

این مقاله نهایی نیست و پس از انتشار تغییراتی خواهد داشت.