Iranian Journal of Horticultural Science
Vol 52, No 4, Winter 2022 (889-898)
DOI: 10.22059/ijhs.2020.297567.1767

علوم باغبانی ایران
دورهٔ ۵۲، شمارهٔ ۴، زمستان ۱۴۰۰ (ص ۸۹۸-۸۸۹)

نشریه پژوهشی:

اثر تنظیم‌کننده‌های رشدگیاهی بر القای کالوس و بررسی تأثیر الیسیتورها بر تولید لیمونن در کشت سلولی به‌لیمو (*Lippia citrodora*)

فریما دانشمندپور[۱]، پریسا عبداللهی[۲*] و منصور امیدی[۳]

۱. دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه بیوتکنولوژی و به‌نژادی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

۲. استادیار، گروه بیوتکنولوژی و به‌نژادی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

۳. استاد، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، کرج، ایران

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۱۲/٤ - تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۳/۱۲)

چکیده

گیاه به‌لیمو به دلیل اهمیت فراوان اقتصادی آن در صنایع غذایی و داروسازی در ایران کشت می‌شود. لیمونن از ترکیبات با ارزش اسانس به‌لیمو است. در این پژوهش به منظور القای کالوس جهت تولید لیمونن در کشت سلولی گیاه به‌لیمو، غلظت‌های مختلف تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی مورد ارزیابی قرار گرفتند. ریز نمونه ریشه، ساقه و برگ در محیط کشت ام اس حاوی تنظیم‌کننده‌های رشد توفودی (۱، ۲ و ٤ میلی گرم در لیتر) و بنزیل آمینوپورین (۰/۱، ۰/۲ و ۱ میلی گرم در لیتر)، ترکیب هورمونی نفتالین استیک اسید و بنزیل آمینوپورین(۰/۵+ ۰/۵ میلی گرم در لیتر) و بنزیل آمینوپورین و توفوردی (۱+ ۱ میلی گرم در لیتر) و بنزیل آمینوپورین و نفتالین استیک اسید (۲+۱ میلی گرم در لیتر) جهت القای کالوس استفاده شد. آزمایش به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی در سه تکرار اجرا شد. نتایج نشان داد بهترین تیمار در افزایش اندازه، وزن تر و خشک کالوس ترکیب هورمون بنزیل آمینوپورین با غلظت ۰/۵ میلی گرم در لیتر به همراه هورمون نفتالین استیک اسید با غلظت ۰/۵ میلی گرم در لیتر از ریزنمونه برگ بود. از الیسیتورهای زیستی و غیرزیستی شامل متیل جاسمونات (۵۰ و ۱۰۰ میکرومولار)، اسید سالیسیلیک (۵۰ و ۱۰۰ میکرومولار)، نانو اکسید تیتانیوم (۰/۵ و ۲ میلی گرم در لیتر) و همچنین عصاره مخمر (۰/۵ و ۲ میلی گرم در لیتر) جهت افزایش تولید لیمونن در کشت سلولی به‌لیمو درکشت سوسپانسیون استفاده شد. الیسیتورهای مورد استفاده تأثیر معنی داری بر افزایش میزان لیمونن نداشتند.

واژه‌های کلیدی: اکسید تیتانیوم، کروماتوگافی گازی، متابولیت ثانویه.

Effect of plant growth regulators on callus induction and elicitor application for limonene production in cell culture of lemon grass (*Lippia citrodora*)

Farima Daneshmandpour[1], Parisa Abdollahi[2*] and Mansoor Omidi[3]
1. M.Sc. Student, Department of Plant Breeding and Biotechnology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran
2. Assistant Professor, Department of Biotechnology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran
3. Professor, University College of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran
(Received: Feb. 23, 2020 - Accepted: Jun 1, 2020)

ABSTRACT

Lemon grass has been cultured in Iran due to its economic value and applications in food and pharmaceutical industries. Limonene is on of the important compound in lemon grass essential oil. In this study, different plant growth regulators were used for callus induction in lemon grass. Root, shoot and leaf explants wee cultured on MS medium containing 2, 4-D (1, 2 and 4 $mg.l^{-1}$), BAP (0.1, 0.2 and 1 $mg.l^{-1}$), hormonal combination of BAP + NAA (0.5+ 0.5 $mg.l^{-1)}$, 2, 4-D + BAP (1+ 1 $mg.l^{-1}$) and BAP + NAA (2+ 1 $mg.l^{-1}$). The experiment was conducted as a factorial experiment in a completely randomized design with three replications. The results showed that the best treatment for increasing callus size, fresh and dry weight was BAP + NAA (0.5+ 0.5 $mg.l^{-1}$), from leaf explants. Biotic and abiotic elicitors including MJ (50, 100 µM), SA (50, 100 µM), Tio2 (0.5, 2 $mg.l^{-1}$) and yeast extract (0.5, 2 $mg.l^{-1}$) were used for increasing limonene production in lemon grass cell culture. Used elicitors had no significant effect on limonene production in cell culture.

Keywords: Gas chromatography**,** secondary metabolites, TiO_2.

* Corresponding author E-mail: abdollahi@srbiau.ac.ir

مقدمه

گیاه به‌لیمو (*Lippia citrodora*) از تیره Verbenaceae، بومی آمریکای جنوبی بوده و رویش آن در شیلی، پرو و آرژانتین است. یک گیاه دارویی معطر بوده که بوی خوشایند لیمو را دارد و تا صد سال پیش فقط به عنوان یک گونه زینتی شناخته می‌شد ولی امروزه به دلیل اهمیت فراوان اقتصادی آن در صنایع غذایی و عطرسازی در اکثر کشورها از جمله ایران کشت می‌شود (Zargari, 1997). این گیاه به‌طور وسیع در غالب نواحی گرم و معتدل مانند نواحی مدیترانه‌ای اروپا پرورش می‌یابد و امروزه این گیاه در استان‌های شمالی و باغ‌ها در ایران کشت می‌شود، البته در آب هوای مناطق کوهستانی مانند استان کهگیلویه و بویراحمد نیز در فصول بهار و تابستان نیز رویش داشته است (Mir Heydari, 1994). قسمت مورد استفاده به‌لیمو، برگ‌های آن است که بویی شبیه لیمو دارند که اگر به حالت تازه توسط دست فشرده شوند، بویی مطبوع از آن متصاعد می‌گردد، ولی پس از خشک شدن، از عطر آن کاسته می‌شود. پودر برگ گیاه به‌لیمو به رنگ سبز مات و دارای بوی معطر و طعم آن تند و کمی تلخ است. ترکیبات اصلی اسانس به‌لیمو شامل ژرانیول، لیمونن، سینئول و سیترال می‌باشد (Golmani *et al*., 2016).

ازدیاد به‌لیمو از راه بذر به‌دلیل وجود پدیده دگرگشنی و تفرق ژنتیکی صفات در نتاج، مورد توجه نیست. افزایش این گیاه با قلمه یا خوابانیدن شاخه‌ها صورت می‌گیرد ولی شمار محدودی گیاه تولید می شود. با استفاده از کشت درون شیشه‌ای می‌توان نسبت به تولید انبوه و بدون آلودگی به‌لیمو اقدام کرد (Noorafkan & Ansari, 2017). کشت سلول و بافت گیاهی که با عنوان‌های کشت درون شیشه‌ای یا کشت استریل نیز مطرح می‌شود، ابزاری مهم در مطالعات پایه و کاربردی و دارای کاربردهای تجاری است. این تکنیک توانسته راهی عملی در جهت تولید محصولات متابولیکی فراهم کند (Rao & Ravishankar, 2002). کشت بافت و سلول گیاهی به روشی گفته می‌شود که اجزای مختلف گیاه (سلول، پروتوپلاست، جنین، بافت و غیره) در شرایط آزمایشگاهی و به طور کامل سترون روی یک محیط غذایی قرار می‌گیرند و در شرایط محیطی مناسب نگهداری می‌شوند، به عبارت دیگر کشت بافت گیاهی تکنیکی است که تولید و تکثیر گیاه کامل را از بافت‌های مختلف گیاه امکان‌پذیر می‌سازد. مهترین اهمیت این تکنیک نشان دادن توانایی سلول‌های گیاهی یعنی توتی‌پوتنسی سلول است، بدین معنی که تمام سلول‌های زنده پیکر گیاه، صرف نظر از سطح پلوئیدی و نوع تخصص، توانایی تشکیل گیاه کامل را دارند. در واقع کشت بافت نوعی تکثیر غیرجنسی در محیط درون شیشه‌ای است (Haque & Ghosh, 2018). کشت بافت در زمینه گیاهان دارویی کاربردهای متعددی دارد که مهمترین آنها تکثیر انبوه و سریع گیاهان دارویی یکنواخت از لحاظ محتوای ژنتیکی و کیفی، حفظ گونه‌های گیاهی در حال انقراض از طریق نگهداری در شرایط انجماد و تولید متابولیت‌های ثانویه در شرایط درون شیشه‌ای از طریق کشت سوسپانسیون سلولی و کشت بافت هستند (Omidi & Farzin, 2012).

متابولیت‌های ثانویه گیاهان دارویی برای اهداف غذایی و درمانی دارای اهمیت هستند، لذا هر عاملی که بتواند ضمن ایجاد کمترین تغییر در ساختار ژنتیکی گیاه، تولید این ترکیبات را افزایش دهد با ارزش خواهد بود (Rao & Ravishankar, 2002). گیاهانی که متابولیت‌های ثانویه را تولید می‌کنند پراکنش محدودی در سلسله گیاهان دارند و میزان آنها اغلب کم است، از طرفی بیشتر متابولیت‌های ثانویه از گیاهان وحشی یا کشت شده استخراج می‌شوند که مشکلاتی از قبیل رویش در فصل و مناطق خاص جغرافیایی، در معرض انقراض بودن نسل‌های گیاهی، محدودیت منابع طبیعی، مشکلات مرتبط با اهلی کردن و کشت زراعی این گیاهان و غلظت پایین این ترکیبات در گیاهان، جمع‌آوری آنها را با مشکلاتی مواجه کرده است (Omidi & Farzin, 2012). به علاوه مقدار متابولیت تولید شده تحت تأثیر عوامل متعددی از جمله عوامل بیماری‌زا یا تغییرات آب و هوایی می‌باشد که برای تجاری شدن آنها مشکل آفرین است. یکی از روش‌هایی که امروزه بیش از هر موضوع دیگر در

زمینه بررسی متابولیت‌های گیاهی مورد توجه قرار دارد، روش کشت بافت و سلول گیاهی است. با استفاده از این روش سعی می‌شود تا شواهد بیشتری در رابطه با چگونگی بیوسنتز متابولیت‌ها و نیز مکانیسم تنظیمی آن به‌دست آورد و با این روش‌ها می‌توان تولید متابولیت‌های ثانویه با ارزش در گیاهان را افزایش داد. روش‌های مختلفی به منظور افزایش تولید متابولیت‌های ثانویه در کشت سلول گیاهی استفاده می‌شود که شامل استفاده از الیسیتورها، افزودن پیش‌سازها، بهینه‌سازی محیط کشت، کشت ریشه‌های موئین و مهندسی متابولیت می‌باشد که استفاده از الیسیتورها یکی از مهم‌ترین روش‌ها برای افزایش تولید متابولیت‌های ثانویه است. این ترکیبات نقش مهمی در چرخه تولید متابولیت‌های ثانویه ایفا می‌کنند (Samadi *et al*., 2014).

واژه الیسیتور در گیاهان به مواد مختلف شیمیایی اطلاق می‌شود که منجر به پاسخ‌های مورفولوژیک و فیزیولوژیک و در نهایت تجمع فیتوالکسین‌ها می‌شود. واضح است که تیمار گیاهان با الیسیتور و یا یک پاتوژن غیر رقیب موجب بروز پاسخ‌های دفاعی مانند تجمع متابولیت‌های ثانوی در گیاهان و یا درکشت‌های سلولی می‌شود. الیسیتورها بر اساس طبیعتشان به زیستی و غیر زیستی و بر اساس و منشأشان به الیسیتورهای بیرونی و درونی طبقه‌بندی می‌شوند (Angelova *et al*., 2006; Zare *et al*., 2012). الیسیتورهای زیستی با منشاء قارچی، باکتریایی و مخمر و الیسیتورهای غیر زیستی نظیر پلی‌ساکاریدها، گلیکوپروتئین‌ها، اشعه فرابنفش، نمک فلزات سنگین، آنزیم‌های غیر فعال و برخی ترکیبات شیمیایی با مکانیسم عمل متفاوت نظیر جاسمونیک اسید، سالیسیلیک اسید، نیتریک اکساید، اسید سیتریک و غیره به منظور افزایش تولید متابولیت‌های ثانویه در کشت سلول و بافت گیاهی مورد استفاده قرار می‌گیرند (Zhao *et al*., 2005; Rahimi Ashtiani *et al*., 2009; Zamani *et al*., 2019).

از آنجایی که گیاه بهلیمو و ترکیبات مؤثره آن دارای خواص درمانی بسیار بوده و از گیاهانی مورد توجه در بحث تجاری است، این پژوهش به منظور شناسایی بهترین تنظیم‌کننده های رشد گیاهی جهت القای کالوس و تهیه سوسپانسیون سلولی گیاه بهلیمو و همچنین بررسی اثر الیسیتورهای مختلف بر افزایش تولید لیمونن در شرایط درون شیشه ای انجام شده است.

مواد و روش‌ها

گیاهچه‌های سالم و عاری از بیماری بهلیمو از پژوهشکده گیاهان دارویی جهاد دانشگاهی تهیه شد. آزمایش در آزمایشگاه کشت بافت مجتمع رازی دانشگاه آزاد واحد علوم و تحقیقات تهران انجام شد. سرشاخه‌های تازه و جوان ضدعفونی شده برای جوانه‌زنی به محیط کشت پایه MS به همراه زغال فعال و بدون هورمون انتقال داده شدند. بعد از گذشت دو هفته اولین نشانه‌های جوانه‌زنی مشاهده شد. از جوانه های رشد یافته در محیط کشت MS فاقد هورمون بعد از گذشت یک ماه قطعات ریزنمونه های مختلف برگ، ریشه و ساقه جداسازی شدند و در شرایط استریل به محیط کشت‌های حاوی ترکیبات مختلف منتقل شدند. تنظیم‌کننده‌های رشد 2,4-D (1,2,4 mg/l) و BAP (0.1, 0.2,1mg/l) ترکیب هورمونی BAP +NAA (0.5 +0.5 mg/l) و 2,4-D + BAP (1+1 mg/l) و BAP+NAA (2+1 mg/l) جهت القای کالوس مورد استفاده قرار گرفتند. اندازه‌گیری صفات مربوط به کالوس در دو واکشت انجام شد که در این پژوهش نتایج واکشت دوم ارایه شده است.

وزن تر کالوس توسط ترازو با دقت ۰/۱ گرم و بلافاصله پس از برداشتن کالوس‌ها از محیط کشت اندازه‌گیری انجام شد. پس از اندازه‌گیری وزن تر، کالوس‌های مورد نظر در دمای ۴۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت درون آون قرار داده شده و سپس وزن آنها توسط ترازو با دقت ۰/۱ گرم اندازه‌گیری شدند.

به‌منظور تهیه محیط کشت سوسپانسیون از محیط کشت MS مایع حاوی تنظیم‌کننده‌های رشد استفاده شد. با توجه به نتایج القای کالوس، ترکیب هورمونی که بهترین کالوس را از نظر وزن و اندازه تولید کرده

بود جهت تهیه محیط کشت سوسپانسیون انتخاب شد. بعد از تهیه محیط‌های کشت سوسپانسیون، کالوس‌ها در شرایط کاملاً استریل زیر هود لامینار با اسکالپل به قطعاتی با ابعاد ۰/۵ سانتی متر برش خورده، سلول‌های آن به طور یکنواخت جداسازی و داخل محیط کشت سوسپانسیون ریخته شد. ارلن‌های حاوی ۲۰ میلی لیتر کشت‌های سوسپانسیون داخل انکوباتور شیکردار در دمای ۲۴ درجه سانتی گراد با ۱۱۰ دور در دقیقه و شرایط کاملاً تاریکی قرار گرفتند تا کالوس‌ها به‌طور کامل از هم جدا شده و سلول‌ها تکثیر شوند. بعد از گذشت ۱۴ روز واکشت سوسپانسیون انجام شد.در این پژوهش از سه الیسیتور غیر زیستی شامل متیل جاسمونات در دو سطح ۵۰ و ۱۰۰ میکرو مولار، اسید سالیسیلیک در دو سطح ۵۰ و ۱۰۰ میکرو مولار، نانو اکسید تیتانیوم در دو سطح ۰/۵ و ۲ میلی گرم بر لیتر و همچنین الیسیتور زیستی عصاره مخمر در دو سطح ۰/۵ و ۲ میلی گرم بر لیتر درکشت سوسپانسیون استفاده شد و برای رسم نمودار کالیبراسیون از چهار غلظت ماده استاندارد لیمونن (۱۰۰، ۵۰۰ و ۱۰۰۰ppm) استفاده گردید. پس از افزودن الیسیتورها به سوسپانسیون سلولی مجدداً در انکوباتور شیکردار با دمای۲۴درجه سانتی‌گراد و با ۱۱۰ دور در دقیقه در شرایط کاملاً تاریکی قرار گرفتند. سلول‌ها طی ۲ بازه زمانی ۲۴ ساعت و ۴۸ ساعت جمع آوری شدند. سلول‌های موجود در سوسپانسیون سلولی توسط عمل سانتریفیوژ از محیط کشت مایع جدا شده و در دمای ۸۰°C- نگهداری شدند، به‌منظور تهیه عصاره لیمونن به نسبت ۲۰ به ۱ به سلول‌ها n- هگزان به عنوان حلال اضافه شد و سپس برای مدت ۳۰ دقیقه در دستگاه اولتراسونیک قرار گرفت. سپس مخلوط برای مدت ۳۰ دقیقه با ۳۵۰۰ دور در دقیقه در دستگاه سانتریفیوژ قرار داده شد. پس از انجام سانتریفیوژ، فاز بالایی که حاوی عصاره لیمونن بود جدا گردید و جهت تزریق به دستگاه GC آماده شد. به‌منظور تجزیه و آنالیز بهینه عصاره لیمونن از دستگاه GC مدل Shimadzu-2010 استفاده شد. در این آنالیز نوع ستون BP5، گاز حامل هیدروژن و برنامه دمایی ۲۲۰ درجه سانتی‌گراد استفاده شد. غلظت لیمونن استخراج شده توسط فرمول y=1E+12x-52806 با شیب خط R^2=0.9999 (y سطح زیر پیک لیمونن می باشد) که از طریق رسم نمودار منحنی کالیبراسیون در Excel بدست آمد، محاسبه گردید. این پژوهش به صورت یک آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی در ۳ تکرار انجام شد. تجزیه و تحلیل داده‌ها و مقایسه میانگین‌ها با استفاده از نرم افزارهای SAS و MSTAT-C و محیط Excel انجام گرفت. برای انجام آزمون مقایسه میانگین‌ها از آزمون چند دامنه‌ای دانکن جهت تعیین معنی‌دار بودن تفاوت‌ها در سطح احتمال پنج درصد و یک درصد استفاده شد.

نتایج و بحث

اندازه کالوس

طبق جدول ۱، اثر اصلی تیمارهای ریزنمونه و هورمون گیاهی بر اندازه کالوس به‌لیمو در شرایط درون شیشه‌ای در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار شد اما اثر متقابل ریزنمونه در تیمار هورمونی تأثیر معنی‌دار در سطح احتمال پنج درصد بر اندازه کالوس داشت.

بیشترین اندازه کالوس در نمونه‌های تهیه شده از برگ و ساقه گیاه به‌لیمو، تحت تأثیر ترکیب BAP +NAA (0.5 +0.5 mg/l) به ترتیب ۳۷و ۳۴/۵ میلی‌متر به‌دست آمد که با سایر تیمارها تفاوت معنی‌دار داشتند (شکل ۱).

وزن تر کالوس

بیشترین وزن تر کالوس در نمونه‌های تهیه شده از برگ گیاه به‌لیمو، مشابه با الگوی اندازه کالوس، به‌طور مشترک تحت تأثیر ترکیب هورمونی BAP+NAA (0.5 +0.5 mg/l) در نمونه برگ و ساقه به‌ترتیب با میانگین ۱/۱۹ و ۱/۰۶ گرم به‌دست آمد که با سایر تیمارها تفاوت معنی‌دار نشان دادند (شکل ۲). تیمار BAP با غلظت ۰/۲ میلی گرم بر لیتر نیز در نمونه‌های برگ و ساقه بر افزایش وزن تر کالوس مؤثر بوده اما تاثیر آن در حد اثر ترکیبی BAP+NAA (0.5 +0.5 mg/l) نبود (شکل ۲).

وزن خشک کالوس

مشابه با الگوی اندازه و وزن تر کالوس، بیشترین وزن

خشک کالوس در نمونه‌های تهیه شده از برگ گیاه بهلیمو تحت تأثیر تیمار BAP +NAA (0.5 +0.5 mg/l) با میانگین ۰/۵۹ گرم حاصل شد که با سایر تیمارهای هورمونی تفاوت معنی‌دار ایجاد نموده است (شکل ۳).

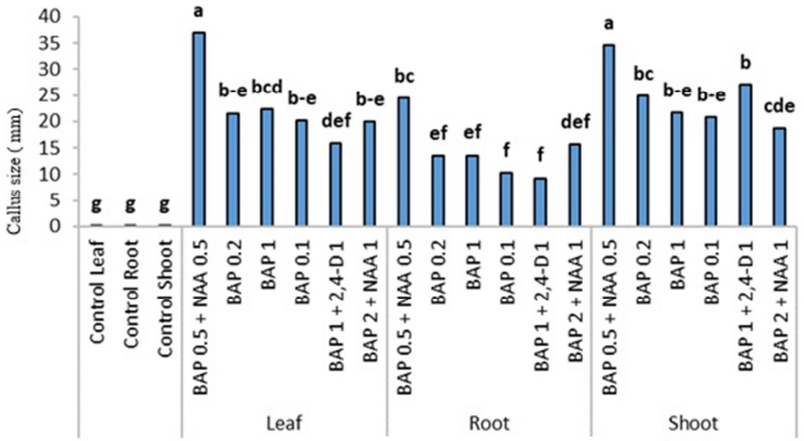
جدول ۱. تجزیه واریانس اثر ریزنمونه و تنظیم کننده های رشد گیاهی بر برخی صفات بهلیمو در کشت درون شیشه‌ای.

Table 2. Results of variance analysis effect of explant and plant growth regulators on some traits of *Lippia citrodora in vitro* culture.

Sources of variation	df	Mean of squares		
		Callus size	Callus fresh weight	Callus dry weight
Explant (E)	2	449.35**	0.583**	0.121**
Plant Growth Regulators (PGR)	6	788.45**	0.738**	0.126**
E×PGR	12	35.61*	0.072*	0.026**
Error	42	15.72	0.021	0.0062
C.V (%)	-	22.46	27.86	50.82

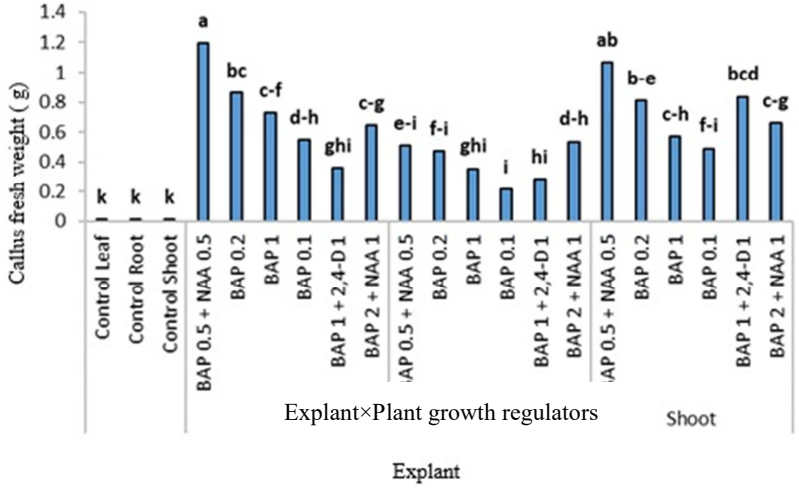
ns ، * و **، به ترتیب نبود تفاوت معنی دار و تفاوت معنی دار در سطح احتمال پنج و یک درصد.

ns, * and **: Non- significantly difference and significantly difference at 5 and 1 percent of probability level, respectively difference, respectively.



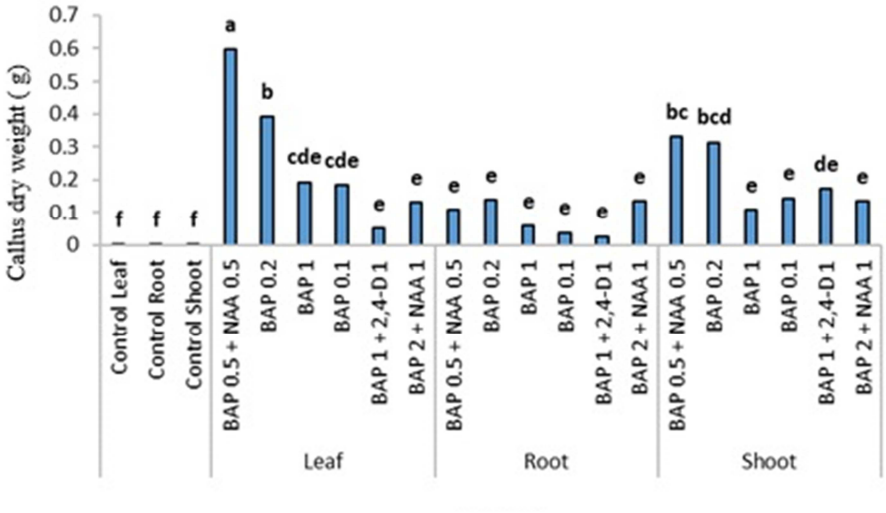
شکل ۱. مقایسه میانگین اثر متقابل ریزنمونه و تنظیم کننده های رشد گیاهی بر اندازه کالوس بهلیمو.

Figure 1. Mean comparison interaction effect of explant and plant growth regulators on callus size of *Lippia citrodora*.



شکل ۲. مقایسه میانگین اثر متقابل ریزنمونه و تیمارهای تنظیم کننده های رشد گیاهی بر وزن ترکالوس بهلیمو.

Figure 2. Mean comparison interaction effect of explant and plant growth regulators on callus fresh weight of *Lippia citrodora*.



شکل ۳. مقایسه میانگین اثر متقابل ریزنمونه و تیمارهای تنظیم کننده های رشد گیاهی بر وزن خشک کالوس به‌لیمو.
Figure 1. Mean comparison interaction effect of explant and plant growth regulators on callus dry weight of *Lippia citrodora*.

اندازه گیری ماده مؤثره لیمونن

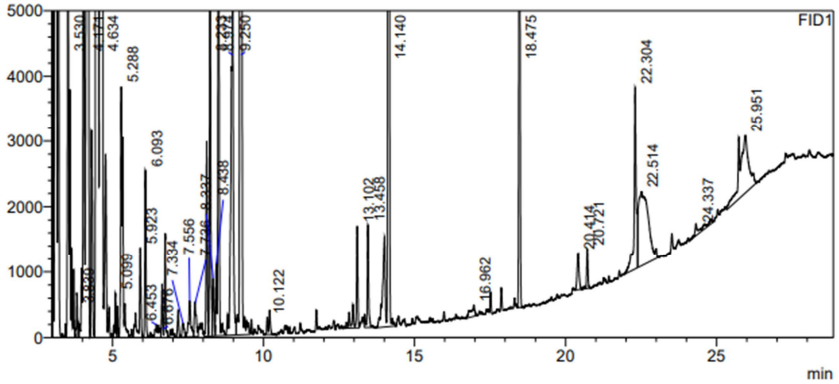
میزان لیمونن استخراج شده در ۱۰۰ میلی گرم ماده خشک از کالوس‌های گیاه به‌لیمو در کشت سوسپانسیون تحت تأثیر تیمارهای مورد آزمایش در جدول ۲ آمده است. لیمونن یک مایع بی رنگ هیدروکربنی از کلاس سیکلوترپن با فرمول بسته C10H16 و یک مونوترپن تک حلقه ای با دمای جوش 176 °C جرم مولی 136.24 g/mol و چگالی 841 kg/m^3 است که به فرم‌های راستگرد، چپگرد و راسمیک وجود دارد (Mortazavi & Ziaolhagh, 2004).

میزان لیمونن استخراج شده، تحت تأثیر تیمارهای مختلف تفاوت چندانی نسبت به شاهد و همچنین دیگر تیمارها نداشته و میزان آن تقریباً در بازه یکسانی قرار داشت. با این وجود، در مجموع میزان ماده مؤثره لیمونن در تیمار شاهد با مقدار ۵/۴۴۱ درصد کمتر از سایر تیمارها بود اما این تفاوت معنی‌دار نشد(جدول ۲).

پیک لیمونن تحت اثر اسید سالیسیلیک ۵۰ میلی‌گرم بر لیتر در مدت ۲۴ ساعت، در زیر آمده است. به دلیل بالا بودن تعداد پیک‌ها از نمایش همه پیک‌ها خودداری شده است.

با توجه به جدول۱، غلظت های مختلف هرکدام از تیمارها نیز نسبت به یکدیگر تفاوت معنی‌داری ایجاد نکردند و با افزایش غلظت، میزان لیمونن در کالوس‌ها تغییری نکرده است.

یکی از اهداف مهم روش‌های کشت بافت تولید کالوس بیشتر در مدت زمان کمتر است که این امر علاوه بر صرفه‌جویی در وقت و هزینه، از تنوع سوماکلونی احتمالی در نتیجه طولانی شدن مدت زمان کشت جلوگیری می‌کند، بنابر این، استفاده از ترکیبات هورمونی فوق‌الذکر در مقایسه با دیگر تیمارها از پتانسیل خوبی در کشت درون شیشه‌ای گیاه دارویی به‌لیمو برخوردار است. کارایی مثبت ترکیب تنظیم‌کننده‌های رشد BAP و NAA در بهینه‌سازی گونه‌های مختلف گیاهان دارویی گزارش شده است (Soltanipour *et al.*, 2011; Sadeghian *et al.*, 2014). طبق گزارش های موجود غلظت مناسب و ترکیب دو تنظیم‌کننده رشد گیاهی BAP و NAA، بسته به منشاء ریزنمونه متغیر است و ریزنمونه‌ها نسبت به ترکیبات مختلف دو تنظیم‌کننده، واکنش‌های متفاوتی بروز می‌دهند که در این پژوهش ریزنمونه به دست آمده از برگ بسیار بهتر از ساقه و ریشه به تولید کالوس پاسخ داد. به غیر از غلظت ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر NAA، در بقیه غلظت‌ها، افزودن BAP تأثیر چندانی بر اندازه و وزن تر و خشک کالوس نداشت.



شکل ۴. پیک مربوط به تزریق نمونه به‌لیمو تحت تأثیر سالیسیلیک اسید ۵۰ میلی‌گرم بر لیتر در مدت ۲۴ ساعت.
Figure 4. Peak for injection of lemonene sample under salicylic acid 50 mg.l^{-1} treatment for 24 hours.

جدول ۲. میزان لیمونن استخراجی از کشت سوسپانسیون گیاه به‌لیمو تحت تأثیر الیسیتورهای زیستی و غیر زیستی.
Table 1. Extracted limonene amount from *Lippia citrodora* suspension culture under biotic and abiotic elicitors.

Stimulant	Concentration	Treatment time (hours)	Area*	Percentage of limonene extracted in 100 mg of dry matter
Sample	-	-	1603	5.441
Methyl Jasmonate (µM)	50	24	1762	5.457
		48	2267	5.507
	100	24	1920	5.473
		48	1998	5.48
Salicylic acid(µM)	50	24	1741	5.455
		48	2459	5.527
	100	24	1672	5.448
		48	1752	5.456
Tio_2(mg/l)	0.5	24	1963	5.477
		48	2534	5.534
	2	24	1928	5.473
		48	1832	5.464
Yeast extract(mg/l)	0.5	24	2066	5.487
		48	1983	5.479
	2	24	1639	5.445
		48	1904	5.471

* Area under the peak of limonene

* سطح زیر پیک لیمونن

بنابراین علاوه بر نوع اکسین، غلظت آن نیز جهت دستیابی به حداکثر اندازه، از اهمیت خاصی برخوردار است (Aghili *et al.*, 2015)، که در این رابطه از تأثیر مثبت ترکیب BAP و NAA بر کالوس‌زایی استویا و ارتباط تنگاتنگ کالوس‌زایی با غلظت ترکیبات هورمونی گزارش شده است (Mirnia, 2010)، همچنین محیط کشت MS حاوی NAA با غلظت ۲ میلی‌گرم بر لیتر به همراه BAP با غلظت ۱ میلی‌گرم بر لیتر در گیاه استویا کالوس بیشتری تولید کرد (Patel & Shah, 2009)، که با نتایج پژوهش حاضر همخوانی داشت. نتایج آزمایش (Eliasi *et al.*, 2016) نشان داد که بیشترین حجم و اندازه کالوس گیاه دارویی مرزه بختیاری در کشت درون شیشه‌ای با استفاده از ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA در ترکیب با ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP به دست آمد.

در این پژوهش میزان لیمونن تحت تأثیر الیسیتورها با غلظت‌های تعیین شده واقع نشد. سالیسیلیک اسید یک ترکیب فنلی و شبه هورمونی است که در گیاهان در پاسخ به عوامل محیطی به عنوان مولکول سیگنال دهنده عمل کرده و بیان ژن‌های دخیل در بیوسنتز متابولیت های ثانویه را القا کرده و باعث افزایش تولید آنها می شود. اما تاثیر این مولکول به عنوان الیسیتور بسیار به نحوه ی مصرف آن و غلظت آن بستگی دارد (Habibi *et al.*, 2015) . با

توجه به نتایج گزارش شده از غلظت‌های بالای الیسیتور اسید سالیسیلیک و عصاره مخمر در سوسپانسیون سلولی گیاه بابونه میزان متابولیت ثانویه بتاکاریوفیلن نسبت به گیاه طبیعی به‌طور معنی‌داری افزایش داشته در مقابل درصد زنده‌مانی سلول‌ها کاهش یافته است. مطابق این نتایج استفاده از غلظت‌های بالای این الیسیتورها در صورتی که درصد زنده مانی سلول‌ها را کاهش ندهد می تواند به منظور افزایش میزان متابولیت های ثانویه استفاده شود (Darvishi *et al.*, 2016). نانو اکسید تیتانیوم به عنوان یک الیسیتور غیر زیستی به منظور افزایش میزان لیمونن در گیاه به‌لیمو استفاده شد که مشابه دیگر الیسیتورها اثر معنی‌داری بر افزایش مقدار لیمونن نداشت. ازآنجاکه اکسید تیتانیوم امکان اکسید یا احیاکردن ترکیباتی که در مجاور آن قرار می‌گیرد بویژه در هنگامی که نور با طول موج مشخصی به آن تابیده شود را خواهد داشت، ممکن است این مولکول باعث اکسید کردن لیمونن و جلوگیری از افزایش آن شده باشد (Behpour & Khalilian, 2013). نانواکسید تیتانیوم بر تولید آلوئین در کشت سلولی آلوئه ورا نیز تاثیر معنی داری نداشته است (Raee *et al.*, 2016).

جاسمونات‌ها مبدل سیگنال اولیه برای تولید متابولیت‌های ثانویه گیاه هستند. جاسمونات‌ها موجب انباشت ترکیبات متعلق به کلاس‌های ساختاری مختلف نظیر فنول‌ها، ترپنوئیدها، آلکالوئیدها و ... در بافت گیاهی می‌شوند اما متیل جاسمونات در غلظت‌های بالاتر اثر محدودکنندگی بر رشد ریشه مویین داشته و میزان متابولیت‌های ثانویه را با بازدارندگی از رشد ریشه ناشی از پاسخ دفاعی گیاه در مقابل تنش‌های زیستی و غیرزیستی در آن کاهش می‌دهد (Pazirandeh *et al.*, 2015). به‌طور کلی تاثیر الیسیتورها بر تولید و مقدار متابولیت به عوامل مختلفی از جمله غلظت الیسیتور، طول مدت تیمار و مرحله رشدی کشت سلولی دارد. با توجه با اینکه الیسیتورها بعد از واکشت دوم به کشت سلولی اضافه شدند با گذر حدود یکماه از کشت سلول‌ها، الیسیتورها در فاز ایستایی منحنی رشد سلول‌ها اضافه شدند . در فاز ایستایی، رشد سلول‌ها به حداکثر مقدار خود رسیده و تکثیر سلول کاهش می یابد. عدم تاثیر الیسیتورهای استفاده شده در این پژوهش بر میزان تولید لیمونن ممکن است به دلیل عدم اعمال تیمار در فاز رشدی مناسب باشد. عدم کفایت غلظت تیمارهای مورد استفاده جهت افزایش تولید مقدار لیمونن می تواند از دیگر موارد موثر در عدم افزایش مقدار لیمونن در کشت درون‌شیشه‌ای باشد. همچنین به علت فرار بودن مولکول لیمونن، ممکن است مقدار آن در اثر واکشت‌های متوالی کالوس و سوسپانسیون سلولی حاصل از کالوس‌ها در مراحل مختلف آزمایش باشد کاهش یافته باشد.

نتیجه‌گیری کلی

با توجه به نتایج به دست آمده از این تحقیق، بهترین تیمار در جهت افزایش اندازه، وزن تر و خشک کالوس تیمار ترکیب هورمون BAP با غلظت ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر به همراه هورمون NAA با غلظت ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر بود. این تیمار در تمامی صفات، تیمار برتر بوده و منجر به بهترین نتیجه شده است. بر این اساس، اندازه کالوس در ترکیب تیماری BAP+NAA با غلظت ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر تا مقدار ۳۷ میلی‌متر نیز افزایش یافت. تحت تأثیر این ترکیب هورمونی، وزن تر کالوس به ۱/۱۹ گرم رسید. وزن خشک کالوس نیز روند مشابهی داشته و به ۰/۵۹۸ گرم رسید. در مورد اثر ریزنمونه تهیه شده از بخش‌های مختلف گیاهی، استفاده از برگ به‌عنوان ریزنمونه موجب تولید بیشترین کالوس و افزایش وزن تر و خشک کالوس نسبت به ریزنمونه‌های تهیه شده از ساقه و ریشه به‌لیمو شد که جهت تحقیقات بعدی استفاده از این ریزنمونه جهت تولید کالوس توصیه می‌گردد.

با توجه به نتایج به‌دست‌آمده از این تحقیق، در مورد اثر الیسیتورهای زیستی و غیرزیستی در این تحقیق بر تولید متابولیت ثانویه لیمونن، قابل ذکر است که با توجه به غلظت‌های بکار برده شده از این

الیسیتورها، هیچکدام از آنها بر میزان لیمونن تأثیر چشمگیری نداشته و نسبت به شاهد تفاوت محسوس و معنی‌داری ایجاد نکردند که علت آن می‌تواند عدم تأثیرپذیری آنزیم‌ها و ترکیبات دخیل در سیکل تولید لیمونن از الیسیتورهای مورد بررسی باشد. همچنین، احتمال می‌رود غلظت‌های بکار برده شده جهت تأثیرگذاری روی چرخه تولید لیمونن کافی نبوده باشد. استفاده از الیسیتورها در فاز رشد تصاعدی سلول به منظور افزایش تولید متابولیت‌های ثانویه می‌تواند موثرتر باشد.

REFERENCES

1. Aghili, S., Nasr, N. & Kazemi tabar, S. (2015). Effects of auxin and cytokinin on callus production and regeneration of Stevia. *Journal of Medicinal Plants Biotech*, 4 (3), 311-318. (In Farsi).
2. Angelova, Z., Georgiev, S., & Roos, W. (2006). Elicitation of plants. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 20(2), 72-83.
3. Bahmani, M. A. (2016*). Evaluation of callus formation of different organs and the effect of chitosan elicitor, silver and titanium dioxide nanoparticles on phenolic compounds of cumin*. M.Sc. Thesis, Faculty of Agriculture and Natural Resources, Zabol University. (In Farsi).
4. Behpour, M. & Khalilian, E. (2013). A review of the specific applications of titanium dioxide nanoparticles. *Nanotechnology Journal*, 12(11), 19-23. (In Farsi).
5. Darvishi, A., Kahrizi, D., Bahrami Nejad, S. & Mansouri, M. (2016). Effect of yeast extract and salicylic acid elicitors on cell viability, beta caryophyllene and isopulegol in *Mentha pulegium* cell culture. *Journal of Cellular and Molecular Research*, 29 (4), 370-381. (In Farsi).
6. Eliasi, L., Mehrabi, A., Sididi, M. & Safari, R. (2016). Optimization of *Satureja* callus culture using explants and different concentrations of growth regulators. *Journal of Crop Breeding*, 8 (20), 124-132. (In Farsi).
7. Golmani, M. T., Ghasemi, A., Eskandari, M. H. & Niakowthari M. (2016). Evaluation of the effect of solvent removal with microwave on the chemical compounds and antimicrobial activity of leaf eEssential oils of lemon grass. *Journal of Research and Innovation in Food Science and Technology*, 5 (1), 105-118. (In Farsi).
8. Habibi, G., Z. Sadeghipour, & R. Hajiboland. (2015). Effect of salicylic acid on tobacco (*Nicotiana rustica*) plant under drought conditions. *Iranian Journal of Plant Biology*, 7(25), 17-28. (In Farsi).
9. Haque, S. M., & Ghosh, B. (2018). Micropropagation of *Kaempferia angustifolia* Roscoe-An aromatic, essential oil yielding, underutilized medicinal plant of Zingiberaceae family. *Journal of Crop Science and Biotechnology*, 21(2), 147-153.
10. Mirnia, M. (2010). *Investigation of the regulation of some growth regulators on stevia organogenesis.* M.Sc. Thesis, Faculty of Agriculture and Natural Resources, Zabol University. (In Farsi).
11. Moartazavi, A. & Ziaolhagh, Hr. (2004). *Technology of citrus by- products*. Ferdowsi University of Mashhad Publications.322 pages. (In Farsi).
12. Noorafkan, H. & Ansari, F. (2017). Effect of MS and B5 media on growth characteristics of lemon grass in *in vitro* conditions. *Iranian Journal of Horticultural Science*, 48 (1), 249-252. (In Farsi).
13. Omidi, M. & Farzin, V. (2012). Biotechnology solutions in increasing the efficiency of medicinal plants (review article). *Journal of Modern Genetics*, 7 (3), 209-220. (In Farsi).
14. Patel, R. M., & Shah, R. R. (2009). Regeneration of *Stevia* plant through callus culture. *Indian journal of Pharmaceutical Sciences*, 71(1), 46-50.
15. Pazirandeh, M. S., Hasanloo, T., Shahbazi, M., Niknam, V., & Moradi-Payam, A. (2015). Effect of methyl jasmonate in alleviating adversities of water stress in barley genotypes. *International Journal of Farming and Allied Sciences,* 4(2), 111-118. (In Farsi).
16. Rae, M., Omidi, M., Torabi, S., Khodayari, M. (2016). Application of nano-elicitors to produce aloin in cell suspension of *Aloe vera* L. *Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants*, 32(2), 256-263. (In Farsi).
17. Rahimi Ashtiani, S., Hassanlou, T. & Bihamta, M. (2009). The use of yeast extract as a strategy to increase the content of flavonolignans in suspended cell culture of *Salvia* spp. via stimulation mechanism. *Journal of Medicinal Plants*, 32, 108-119. (In Farsi).
18. racid on stimulation of hypersin production in *Hypericum perforatum*. *Journal of Cellular Biotechnology*, 6 (22), 41-50. (In Farsi).
19. Rao, S. R., & Ravishankar, G. A. (2002). Plant cell cultures: chemical factories of secondary metabolites. *Biotechnology Advances*, 20(2), 101-153.

20. Sadeghian, S., Ranjbar, Q. & Kazemi tabar, S. (2014). Investigation and selection of appropriate hormonal composition for shoot regeneration and *in vitro* propagation of basil. *Journal of Crop Breeding*, 6 (13), 40-48. (In Farsi).
21. Samadi, P., Ghasemnejad, A. & Alizadeh, M. (2014). Changes in phenylalanine ammonium enzyme (PAL) activity in artichoke under effect of methyl jasmonate and salicylic acid in *in vitro* conditions. *Journal of Crop Production Research*, 21 (4), 135-148. (In Farsi).
22. Soltanipour, M., Mohammadi, A., Rahnama, H. & Abbas Zadeh B. (2011). Evaluation of callus formation in *Melissa afficinalis* L. *Iranian Journal of Agriculture & Plant Breeding*, 7(1), 45-54. (In Farsi).
23. Torabi, S., Khodayari, M., Raei, M. & Omidi, M. (2016). Application of nano-elicitors for aloin production in *Aloe vera* L. cell suspension. *Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants Research*, 32(2), 256-263. (In Farsi).
24. Zamani, M., Moradi, H., Chalavi, V. & Kazemitabar, S.K., (2019). Effect of salicylic acid and methyle jasmonat elicitors on hypericin production in stJohn's wort (*Hypericum perforatum* L.) cv. Topas callus culture. *Iranian Journal of Horticultural Science*. 49(4), 915-923. (In Farsi).
25. Zare, M., Bihamta, M.R., Omidi, M. & Naghavi, M.R., (2012). Effects of some elicitors on artemisinin production in *Artemisia annua* plant. *Iranian Journal of Horticultural Science*. 43(3), 323-330. (In Farsi).
26. Zhao, J., Davis, L. C., & Verpoorte, R. (2005). Elicitor signal transduction leading to production of plant secondary metabolites. *Biotechnology Advances*, 23(4), 283-333.