

تأثیر شرایط نوری و فاکتور pH در بهینه‌سازی کشت ریشه‌های گیاه گلرنگ^۱

ژیلا قلی‌زاده، فرانسواز برنارد: دانشگاه شهید بهشتی، دانشکده علوم زیستی

چکیده

هدف از انجام این بررسی و تحقیق تعیین شرایط بهینه‌سازی کشت ریشه گیاه گلرنگ به‌منظور دستیابی به مقادیر بیش‌تر ریشه است که امکان دارد توانایی چشم‌گیری در تولید ترکیبات متابولیت ثانویه با کاربری‌های مختلف داشته باشند. از آنجاکه گلرنگ گیاهی با فواید شناخته شده در زمینه‌های صنعتی، خوراکی و داروییست لذا بهینه‌سازی شرایط کشت ریشه آن امری ضروری و حائز اهمیت به نظر می‌رسد. از جمله شرایطی که بدین منظور مورد تحقیق قرار گرفته شرایط نوری است که در این مقاله به صورت تیمار نور و تاریکی اعمال شده و در گام بعدی فاکتور pH بررسی شده است. در روش به‌کار گرفته شده ریشه‌های حاصل از ساقه‌های جوان بذرهای رشد کرده در محیط جامد MS^۲، به محیط مایع انتقال داده شده و پس از ریشه‌زایی بیش‌تر و واکنش‌های مختلف تحت تیمار نور و تاریکی و فاکتور pH قرار گرفتند. پس از ۲۱ روز، وزن تر و خشک، مقادیر رنگدانه‌های فتوسنتزی (کلروفیل a، b، محتوی کل کلروفیل و کارتنوئید) و مقادیر رنگدانه‌های مختص گیاه (رنگدانه قرمز در طول موج ۵۱۷ نانومتر، رنگدانه‌های زرد در طول موج‌های ۳۲۱ و ۴۰۳ نانومتر) در نمونه‌های تحت تیمار محاسبه شد. مهم‌ترین دستاورد پژوهش انجام شده دستیابی به مقادیر چشم‌گیری از رنگدانه‌های مختص گیاه گلرنگ و رنگیزه‌های فتوسنتزی در ریشه این گیاه است که بیش‌تر تنها در اندام‌های هوایی و گل گزارش شده بود. علاوه بر آن نتایج به‌دست آمده حاکی از آن است که تیمار نور به نسبت تاریکی تأثیر بهینه‌تری در خصوص میانگین رشد، تولید ترکیبات مهم فتوسنتزی و رنگدانه‌های مختص گیاه داشته است و در مورد تیمار دوم یعنی فاکتور pH گیاه گلرنگ نسبت به تمامی گستره‌های مورد استفاده در راستای افزایش رشد و تولید ترکیبات سازگار بوده است.

مقدمه

گیاه گلرنگ با نام علمی کارتاموس تینکتورس^۳ و نام رایج سافلور^۴ متعلق به خانواده کاسنیان^۵ و جزء لوله گل‌ها^۶ است که از ۴۰۰۰ سال قبل به دلیل استفاده از گلچه‌های آن در مصر کشت می‌شده است. بعدها با پی بردن به درصد بالای روغن آن، که از کیفیت مطلوبی برخوردار بود، کشت و کار آن برای استخراج روغن از دانه‌ها

واژه‌های کلیدی: کشت ریشه، نور و تاریکی، فاکتور pH، وزن تر و خشک، رنگدانه‌های گیاه، رنگیزه‌های فتوسنتزی

دریافت ۸۷/۴/۱۹

پذیرش ۸۹/۵/۲۵

۱. *Carthamus tinctorius* L.

۲. Murashige & Skoog

۳. Safflower

۴. Asteraceae

۵. Tubuliflorae

رواج یافت. این گیاه به‌طور طبیعی در نواحی مدیترانه، شمال شرقی آفریقا، جنوب غربی آسیا تا هند می‌روید [۴]، [۱۳]. روغن دانه‌های این گیاه به دلیل فراوانی اسیدهای چرب ضروری غیراشباع و پایین بودن سطوح اسیدهای اشباع به نسبت سایر گیاهان مصارف خوراکی گسترده‌ای دارد. برگ‌ها و ساقه‌های آن می‌توانند به صورت خام یا پخته مورد استفاده قرار گرفته و به‌علت مزه و بوی مطبوع و شیرین جای‌گزین اسفناج گردند. رنگ زرد حاصل از گل‌ها نیز به‌عنوان جانشین زعفران به‌کار می‌رود. این گیاه خواص دارویی قابل توجهی دارد که شامل: کاهش بیماری‌های مربوط به انسداد شریان‌های قلب، کاهش سطح کلسترول، آنتی‌باکتریال، ضدالتهاب، درمان ورم‌های دهان و لثه، محلل، محرک سلسله اعصاب و... است. شایان ذکر است که از رنگدانه‌های طبیعی (زرد و قرمز) این گیاه در صنعت استفاده زیادی می‌شود [۲۲]، [۳۴]، [۴۱]. گلرنگ تقریباً در ۶۰ کشور جهان کشت می‌شود و سطح زیر کشت آن در دنیا در سال ۲۰۰۵ برابر با یک میلیون و سیزده هزار هکتار بوده است [۱۷]. ایران نیز یکی از مراکز کشت گلرنگ در دنیای قدیم بوده و عمدتاً به‌عنوان منبع تأمین رنگ در قالی بافی و صنعت پارچه در اغلب نقاط مخصوصاً خراسان آذربایجان، زنجان و اصفهان کشت می‌شده است [۲]. امروزه گیاهان برای تولید بسیاری از ترکیبات متابولیت ثانویه که ساخت آن‌ها از طریق سنتزهای شیمیایی بسیار مشکل و پرهزینه است به کار می‌روند. کشت‌های قراردادی و مرسوم گیاهان نیز تحت تأثیر شرایط متفاوتی مانند شرایط آب و هوایی، آفت‌ها و در دسترس بودن زمین برای کشاورزی است. بنا بر این تمایل به کشت‌های بسیارکنترل شده سلول و بافت و اندام‌های گیاهی به‌عنوان روشی برای تولید ترکیبات مورد نیاز مختلف مدنظر قرار گرفته است [۳۳]. کشت‌های سلول، بافت و اندام گیاهی به‌عنوان منبعی برای تولید ترکیبات معطر، سوخت‌های زیستی، پلاستیک، حفاظت‌کننده، آرایشی، رنگدانه‌های طبیعی و ترکیبات زیستی فعال هستند. گروه‌های اصلی متابولیت ثانویه شامل ترپن‌ها، فنول‌ها و ترکیبات ازتدار هستند [۳۷]. گلبرگ‌های گلرنگ تولید پیگمان‌های زرد و قرمز می‌کند. پیگمان قرمز کارتامین نام دارد و پیگمان زرد شامل: پیش‌ساز کارتامین پرکارتامین^۱، سافلومین^۲ A، سافلور زرد^۳ B، هیدروکسی‌سافلور^۴ A است که به کارتامیدین نیز مشهورند. همه این ترکیبات ساختار D-β-C S-گلوکوپیرانوزیل کوئینوشالکون دارند [۳۸]. تا به حال کشت بافت گیاه گلرنگ توسط محققان زیادی صورت گرفته و اغلب از نظر استرس محیطی و مواد مورد نیاز مغذی مورد بررسی بوده است [۷]، [۲۷]. پژوهش‌هایی نیز در خصوص کشت سلول و کالوس گلرنگ به منظور تولید رنگدانه‌های قرمز و زرد انجام شده است [۱۸]، [۱۹]، [۲۰]، [۴۰]. در این مقاله به منظور دستیابی به شرایط بهینه کشت ریشه گیاه گلرنگ و تولید ترکیبات مهم متابولیت ثانویه آن ریشه‌های حاصل از ساقه‌های جوان بندهای رشد کرده در محیط جامد MS^۵ به محیط مایع فاقد هورمون (که از دیگر مزیت‌های قابل ذکر این نوع کشت است) انتقال یافته و پس از رشد و ریشه‌زایی ببیش‌تر در این محیط، مورد تیمارهای نور

۱. Precaratham

۲. SafflominA

۳. Safflower yellowB

۴. HydroxysafflorA

۵. Murashige&Skoog

و تاریکی و فاکتور pH قرار گرفتند، تا شرایط مختلف موجود در زمینه افزایش میزان وزن تر و خشک و تولید بیش‌تر ترکیبات مهمی چون رنگدانه‌های فتوسنتزی (کلروفیل a، کلروفیل b و کارتنوئیدها) و رنگدانه‌های غیرفتوسنتزی مختص گیاه مانند کارتامین (رنگدانه زرد در طول موج ۵۱۷ نانومتر)، هیدروکسی‌سافلور A (رنگدانه زرد در طول موج ۳۲۱ نانومتر)، سافلور زرد B (رنگدانه زرد در طول موج ۴۰۳ نانومتر) بررسی شود. داده‌های حاصل از آنالیزهای مختلف انجام گرفته در این خصوص جمع‌آوری شده و تحت آنالیزهای آماری قرار گرفتند که نتایج به‌دست آمده به تفصیل مورد بحث و بررسی قرار خواهند گرفت.

مواد و روش‌ها

کشت بافت

این مرحله شامل ۵ بخش تهیه بذر گیاه، استریل کردن، کشت بذرها، انتقال قطعات جداکشت به محیط جامد و انتقال ریشه‌های حاصل از آن‌ها به محیط مایع است. بذر گیاه گلرنگ (رقم بهاره اصفهان) از موسسه اصلاح و تهیه نهال و بذر وزارت جهاد کشاورزی تهیه و برای تحقیق استفاده شد. برای استریل کردن بذرها از ظروفی که با دمای ۱۱۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ دقیقه اتوکلاو شدند، استفاده شد. ابتدا بذرها با کلرید جیوه (HgCl_2) ۰/۱ درصد به مدت ۱۰-۸ دقیقه ضدعفونی شدند، سپس با آب مقطر استریل ۳ بار شست‌شو گردیدند و برای کشت آماده شدند [۲۷]. بذرها استریل شده در محیط کشت MS [۲۸] جامد حاوی 30 g.l^{-1} ساکاروز و آگار ۰/۸ درصد به تعداد ۵ عدد با فاصله از یکدیگر کشت گردیدند و بعد از بستن درب شیشه‌ها با سلفون در اتاق کشت تحت شرایط نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی، شدت نوری ۱۵۰۰ لوکس و دمای 25 ± 2 درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ روز نگهداری شدند. از ساقه‌های جوان ایجاد شده به‌عنوان منبع جداکشت استفاده شد. در گام بعدی ساقه‌های جوان به‌منظور تولید ریشه به محیط جامد با خصوصیات مشابه ذکر شده انتقال یافتند و پس از ۳ هفته ریشه‌های حاصل از آن‌ها در محیط مایع MS و بدون هورمون قرار گرفتند. ریشه‌ها در این محیط شروع به ایجاد انشعابات متعدد و ریشه‌زایی بیش‌تر کردند و پس از واکنش‌های انجام شده تحت تیمارهای نور و تاریکی و فاکتور pH واقع شدند.

تیمارهای اعمال شده

به‌منظور بررسی تأثیر شرایط مختلف بر روی بهینه‌سازی کشت ریشه گیاه گلرنگ برای دستیابی به مقادیر بیش‌تر متابولیت ثانویه از جمله رنگدانه‌های گیاه که شامل کارتامین (رنگدانه قرمز در طول موج ۵۱۷ نانومتر)، هیدروکسی‌سافلور A (رنگدانه زرد در طول موج ۳۲۱ نانومتر)، سافلور زرد B (رنگدانه زرد در طول موج ۴۰۳ نانومتر) هستند و همچنین مقادیر کلروفیل‌های گیاهی و کارتنوئیدها، ریشه‌های به‌دست آمده تحت تأثیر تیمار نور و تاریکی و pH واقع شدند. تعداد تکرار در خصوص هر دو تیمار ۴ بار بوده است.

۱. تیمار نور و تاریکی: در این تیمار ریشه‌ها با وزن اولیه ۰/۵ گرم در شیشه‌هایی که حاوی مقدار مشابه 4cc محیط مایع MS بودند، قرار گرفتند که گروهی از شیشه‌ها در مجاورت نور با فتوپریود ۱۶ ساعت روشنایی و با شدت نوری ۲۳۰۰ لوکس واقع شده و گروهی دیگر به طور کامل با فویل پوشیده شده بودند.

۲. تیمار pH: در این تیمار از ۷ گستره pH که شامل ۳ گستره اسیدی (۳/۵، ۴، ۴/۵)، ۳ گستره بازی (۶/۵، ۷/۵، ۸/۵) و pH خنثی (۵/۷) بود استفاده شد. ریشه‌ها با وزن اولیه ۰/۵ گرم در شیشه‌هایی با مقدار مشابه 4cc محیط مایع MS که pH آن‌ها پیش از اتوکلاو تنظیم شده بود، قرار گرفتند. شایان ذکر است که با تغییر مقادیر pH رسوب محیط دیده نشد. پس از سه هفته داده‌های به‌دست آمده از تیمارهای اعمال شده مورد بحث و بررسی واقع شدند.

بررسی‌های بیوشیمیایی

۱. اندازه‌گیری وزن تر و خشک: ریشه‌های موجود در هر شیشه به دقت با ترازو وزن شده ابتدا وزن تر آن‌ها محاسبه شد و سپس با ترازوی خشک‌کن سارتوریس^۱ مدل MA40 وزن خشک آن‌ها نیز محاسبه شد.

۲. اندازه‌گیری میزان رنگدانه‌ها (کارتامین، سافلورزرد B، هیدروکسی‌سافلور A): استانداردهای کارتامین، سافلورزرد B، هیدروکسی‌سافلور A برای آنالیز اسپکتروفتومتری از شرکت انیستیتو رنگدانه سافلور تیانجین چین^۲ خریداری شد [۳۵].

۱-۲. روش استخراج: رنگدانه‌ها در حلال متانول استخراج شدند. ۰/۱ گرم از ریشه مربوط به هر تیمار در لوله اپندروف ریخته شده و ۲ میلی‌لیتر متانول به آن اضافه شد و با دستگاه هموژنیزاتور مدل PT1200C به مدت ۵ دقیقه در دورهای 2x و 3x بر روی یخ هموژن شدند.

۲-۲. روش سنجش: عصاره‌های حاصل به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند و سپس با دور ۱۰۰۰۰ rpm به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ گردیدند. روش‌ناور حاصل به دقت جدا شده و بر اساس نوع رنگدانه جذب آن در طول موج خاص خوانده شد و در نهایت غلظت آن‌ها با توجه به منحنی استاندارد به‌دست آمد (منحنی استاندارد از طریق تهیه محلول‌هایی با غلظت‌های ۵، ۵۰، ۷۵، ۱۰۰، ۱۲۵، ۱۵۰ میلی‌گرم بر لیتر از استانداردهای خریداری شده از شرکت انیستیتو رنگدانه سافلور تیانجین چین در متانول و محاسبه جذب محلول‌ها در طول موج‌های مربوط به هر رنگدانه، حاصل شد). جذب رنگدانه کارتامین در طول موج ۵۱۷ nm، سافلور زرد B در طول موج ۴۰۳ nm و رنگدانه هیدروکسی‌سافلور A در طول موج ۳۲۱ nm خوانده شد.

۱. Sartorius

۲. Safflower Pigment Institute of Tianjin, China

۳. اندازه‌گیری میزان رنگدانه‌های فتوسنتزی (کلروفیل a، b، کل کلروفیل) و کارتنوئیدها: اندازه‌گیری مقادیر رنگدانه‌های فتوسنتزی و کارتنوئیدها با روش لی‌چتن‌تر^۱ [۲۶] انجام شد.

۱-۳. روش استخراج: برای استخراج رنگدانه‌های فتوسنتزی از حلال استون ۸۰٪ استفاده شد. ۰/۱ گرم از ریشه مربوط به هر تیمار در لوله اپندروف ریخته شده و ۲ میلی لیتر استون به آن افزوده و هم‌وزن گردید.

۲-۳. روش سنجش: عصاره‌های به‌دست آمده به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شده و سپس با دور ۴۰۰۰ rpm به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شدند. از محلول رویی برای اندازه‌گیری میزان رنگدانه‌های فتوسنتزی استفاده شد. میزان جذب عصاره استخراج شده با دستگاه اسپکتروفتومتر شیمادز^۲ مدل uv-1601-pc در طول موج‌های ۶۶۳/۲، ۶۴۶/۸، ۴۷۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. مقادیر هریک از رنگیزه‌ها برحسب $\text{mg.g}^{-1}\text{fw}$ با استفاده از فرمول‌های زیر محاسبه شد.

$$\text{Chla} = 12/25 * A_{663/2} - 2/798 * A_{646/8}$$

$$\text{Chlb} = 21/21 * A_{646/8} - 5/01 * A_{663/2}$$

$$\text{ChlT} = \text{Chla} + \text{Chlb} \text{ (کاروتن+گزانتوفیل)} = 1000 * A_{470} - 1/82 * \text{chla} - 85/02 *$$

$$\text{chl b}/198$$

۴. آنالیزهای آماری: آزمایش‌های در قالب طرح‌های کاملاً تصادفی (CRD) انجام شد. تعداد تکرارها صورت گرفته ۴ بار بود. برای مقایسه کلی نتایج حاصل، از آنالیز واریانس (ANOVA) و برای مقایسه دو به دو آن‌ها، از آزمون LSD استفاده شد. آنالیز آماری به کمک نرم افزار SPSS۱۶ و با اطمینان ۹۵٪ صورت گرفت و نمودارها با استفاده از نرم افزار اکسل^۳ رسم شد.

نتایج

دستیابی به کشت ریشه گیاه گلرنگ:

بذرهای گیاه گلرنگ که با کلرید جیوه ضد عفونی شدند، به مدت ۱۰ روز در محیط پایه MS قرار گرفتند. حدود ۹۰ درصد بذرها جوانه زدند. از ساقه‌های حاصل از جوانه‌زنی بذر برای ریشه‌زایی استفاده شد. بدین گونه که ساقه‌ها در محیط MS جامد و بدون هورمون و در شرایط کنترل شده به مدت ۲ هفته واقع شدند (شکل‌های ۱ و ۲).

۱. Lichtenther

۲. Shimadzu

۳. Excel



شکل ۲. ریشه‌زایی ساقه‌های حاصل از جوانه‌زنی



شکل ۱. جوانه‌زنی بذرهاي گیاه گلرنگ

شرایط قابل توجه کشت ریشه: کشت ریشه گیاه گلرنگ در محیط مایع MS با حجم بسیار کم ۴ ml و شرایط کاملاً ثابت و پایا^۱ و بدون استفاده از دستگاه‌های شیکر و همچنین بدون هیچ‌گونه هورمونی صورت گرفت.

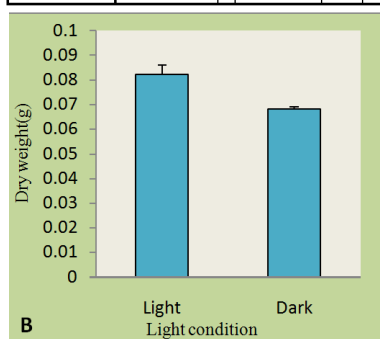
بررسی تیمارهای مؤثر بر وزن تر و خشک ریشه‌های گیاه گلرنگ

۱. اثر شرایط نور و تاریکی بر وزن تر و خشک ریشه‌ها: نتایج به‌دست آمده در خصوص آنالیز وزن تر و خشک ریشه‌ها تحت تأثیر تیمار نور (۲۳۰۰ Lux و فتوپریود ۱۶ ساعت روشنایی) و تاریکی (به‌طور کامل با فویل پوشیده) ۲۱ روز در جدول ۱ آمده است.

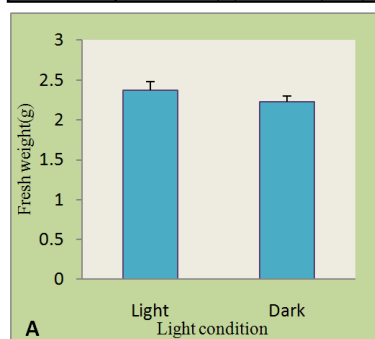
جدول ۱. نتایج حاصل از تیمار نور و تاریکی بر رشد ریشه‌های گیاه گلرنگ پس از ۲۱ روز

Treatment	N	Fw(g) mean $\pm$ SE	Dw(g) mean $\pm$ SE
نور (۲۳۰۰ Lux و فتوپریود ۱۶ ساعت روشنایی)	۴	۲.۳۷ $\pm$ ۰.۱۱	۰.۰۸۱ $\pm$ ۰.۰۰۴
تاریکی (به‌طور کامل با فویل پوشیده)	۴	۲.۲۳ $\pm$ ۰.۰۷	۰.۰۶۸ $\pm$ ۰.۰۰۱

variable	ANOVA			
Dry Weight	Sum of Squares	df	Mean Square	F
Between Groups	۰.۰۰۰	۱	۰.۰۰۰	۸.۷۹۳
Within Groups	۰.۰۰۰	۶	۰.۰۰۰	
Total	۰.۰۰۱	۷		



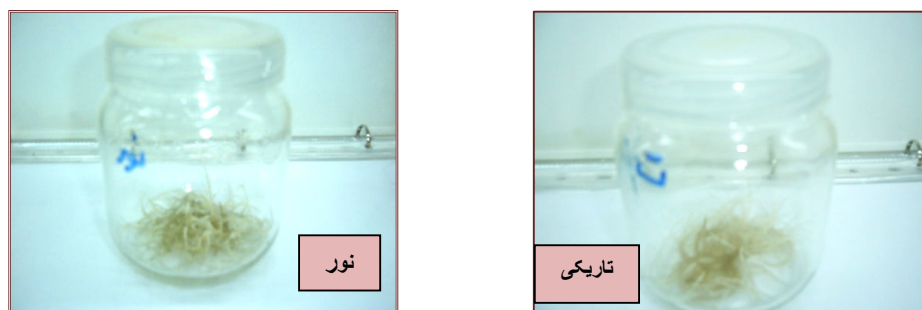
variable	ANOVA			
Fresh Weight	Sum of Squares	df	Mean Square	F
Between Groups	۰.۰۴۴	۱	۰.۰۴۴	۱.۱۴۲
Within Groups	۰.۲۲۹	۶	۰.۰۳۸	
Total	۰.۲۷۲	۷		



نمودار ۱. A) تأثیر تیمار نور و تاریکی بر وزن تر ریشه‌ها. هر تیمار ۴ بار تکرار شده و اختلاف موجود بین تیمارها با توجه به جدول آنالیز واریانس ارائه شده معنی‌دار نیست ($p > 0.05$)

B) تأثیر تیمار نور و تاریکی بر وزن خشک ریشه‌ها. هر تیمار ۴ بار تکرار شده و اختلاف موجود بین تیمارها با توجه به جدول آنالیز واریانس ارائه شده معنی‌دار است ($p > 0.05$)

^۱. Static



شکل ۳. رشد ریشه در تیمار نور و تاریکی پس از ۲۱ روز شرایط نوری (Lux ۲۳۰۰ و فتوپریود ۱۶ ساعت روشنایی) و تاریکی (ظروف کشت به طور کامل با فویل پوشیده است)

چنانچه مشاهده می‌شود بیش‌ترین میزان رشد و نیز وزن تر و خشک ریشه‌های گیاه گلرنگ مربوط به شرایط نوری بوده است. که میانگین وزن تری معادل ۲.۳۷ گرم و میانگین وزن خشکی معادل ۰.۰۸۱ گرم را حاصل کرده است درحالی‌که در شرایط تاریکی میانگین وزن تر و خشک به ترتیب ۲.۲۳ و ۰.۰۶ گرم است و به لحاظ آماری اختلاف میانگین موجود در وزن خشک نمونه‌های واقع در شرایط نوری معنی‌دار است ($p > 0.05$). در نتیجه شرایط نوری منجر به افزایش بیومس محصول شده و شرایط بهتری را ارائه می‌دهد.

۲. اثر فاکتور pH بر وزن تر و خشک ریشه: برای تعیین تأثیر فاکتور pH بر مقدار رشد ریشه از ۷ گستره pH که شامل ۳ گستره اسیدی (۳.۵، ۴، ۴.۵) ۳ گستره بازی (۶.۵، ۷.۵، ۸.۵) و pH خنثی (۵.۷) بود استفاده شد. تعداد تکرار در هر گستره ۴ بار بوده است. نتایج حاصل از آنالیز وزن تر و خشک ریشه در مقادیر مختلف pH در جدول ۲ آمده است.

جدول ۲. تأثیر تیمار pH بر رشد ریشه‌های گیاه گلرنگ پس از ۲۱ روز

Treatment	N	Fw(g) mean $\pm$ SE	Dw(g) mean $\pm$ SE
۳/۵	۴	۲.۱۴ $\pm$ ۰.۰۹	۰.۰۷۵ $\pm$ ۰.۰۰۲
۴	۴	۲.۱۶ $\pm$ ۰.۰۶	۰.۰۷۵۲ $\pm$ ۰.۰۰۳
۴/۵	۴	۲.۱۷ $\pm$ ۰.۰۲	۰.۰۷۵۵ $\pm$ ۰.۰۰۶
۵/۷	۴	۲.۲۱ $\pm$ ۰.۰۷	۰.۰۷۷ $\pm$ ۰.۰۰۲
۶/۵	۴	۲.۱۹ $\pm$ ۰.۰۱	۰.۰۷۵۷ $\pm$ ۰.۰۰۳
۷/۵	۴	۲.۱۸ $\pm$ ۰.۰۹	۰.۰۷۵۵ $\pm$ ۰.۰۰۳
۸/۵	۴	۲.۱۶ $\pm$ ۰.۰۳	۰.۰۷۵ $\pm$ ۰.۰۰۲

چنانچه در جدول ۲ مشاهده می‌شود ۰.۰۵ گرم اولیه ریشه‌ها در تمامی گستره‌های pH مورد استفاده رشد چشم‌گیری داشتند. میانگین وزن تر ریشه در pHهای ۳.۵، ۴، ۴.۵، ۵.۷، ۶.۵، ۷.۵، ۸.۵ به‌ترتیب ۲.۱۴، ۲.۱۶، ۲.۱۷، ۲.۲۱، ۲.۱۹، ۲.۱۸، ۲.۱۶ گرم و میانگین وزن خشک آن‌ها به‌ترتیب ۰.۰۷۵، ۰.۰۷۵۲، ۰.۰۷۵۵، ۰.۰۷۷، ۰.۰۷۵۷، ۰.۰۷۵۵، ۰.۰۷۵۵ pHها صورت گرفته است و در pH=5.7 بیش‌ترین مقدار را داشته است اما با توجه به جدول‌های آنالیز واریانس ارائه شده تفاوت معنی‌داری دیده نمی‌شود ($p > 0.05$).

بررسی تیمارهای مؤثر بر میزان تولید رنگدانه‌های گیاه گلرنگ:

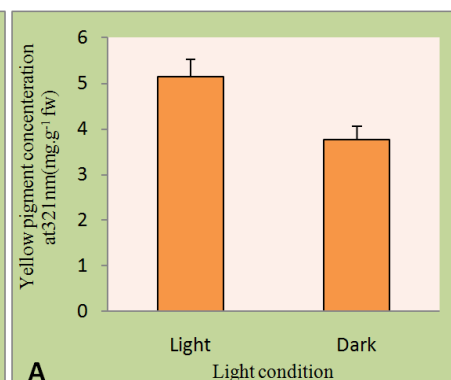
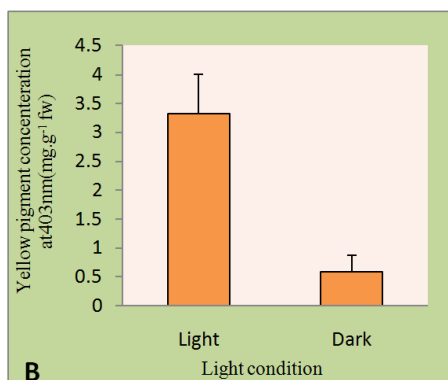
۱. اثر تیمار نور و تاریکی بر تولید رنگدانه‌های گیاه: نتایج به‌دست آمده در خصوص آنالیز رنگدانه‌های گیاه گلرنگ تحت تأثیر تیمار نور (2300 Lux و فتوپریود ۱۶ ساعت روشنایی) و تاریکی (ظروف کشت به طور کامل با فویل پوشیده) در جدول ۳ آمده است.

جدول ۳. نتایج حاصل از تیمار نور (2300 Lux و فتوپریود ۱۶ ساعت روشنایی) و تاریکی (به طور کامل با فویل پوشیده) بر میزان تولید رنگدانه‌ها در کشت درون شیشه ریشه گیاه گلرنگ پس از ۲۱ روز

Treatment	N	رنگدانه قرمز در طول موج 517nm (mean $\pm$ SE) (mg.g ⁻¹ fw)	رنگدانه زرد در طول موج 403nm (mean $\pm$ SE) (mg.g ⁻¹ fw)	رنگدانه زرد در طول موج 321nm (mean $\pm$ SE) (mg.g ⁻¹ fw)
نور	۴	0.157 ± 0.003	3.334 ± 0.66	5.151 ± 0.36
تاریکی	۴	0.151 ± 0.001	0.589 ± 0.29	3.772 ± 0.28

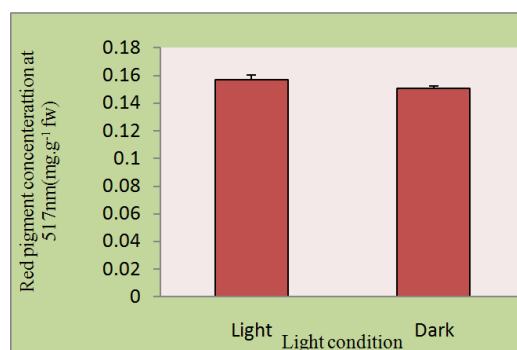
variable	ANOVA				
Yellow pigment concentration at 403	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	10.131	1	10.131	14.337	0.009
Within Groups	6.332	6	1.055		
Total	16.462	7			

variable	ANOVA				
Yellow pigment concentration at A321	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	3.799	1	3.799	9.048	0.024
Within Groups	2.519	6	0.420		
Total	6.319	7			



نمودار ۲. میزان رنگدانه زرد در طول موج‌های ۳۲۱ (A) و ۴۰۳ (B) نانومتر در کشت درون شیشه ریشه گیاه گلرنگ تحت تیمار نور (2300 Lux و فتوپریود ۱۶ ساعت روشنایی) و تاریکی (به طور کامل با فویل پوشیده) پس از ۲۱ روز. هر تیمار ۴ بار تکرار شده و نتایج به‌دست آمده با توجه به جداول آنالیز واریانس معنی‌دار است ($p > 0.05$) چنان‌که از نتایج موجود در جدول ۳ و نمودارهای مرتبط با آن برمی آید، میانگین تولید رنگدانه زرد در طول موج‌های ۴۰۳ و ۳۲۱ نانومتر و رنگدانه قرمز در طول موج ۵۱۷ نانومتر در شرایط نوری به ترتیب 3.334 ، 5.151 ، 0.157 بوده و در شرایط تاریکی 0.589 ، 3.772 ، 0.151 بوده است که اختلاف میانگین موجود بین دو شرایط مورد بحث در خصوص تولید رنگدانه زرد در طول موج‌های ۴۰۳ و ۳۲۱ نانومتر به لحاظ آماری معنی‌دار است ($p > 0.05$).

variable	ANOVA				
	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Red pigment concentration at 517nm					
Between Groups	۰.۰۰۰	۱	۰.۰۰۰	۲.۴۸۴	۰.۱۶۶
Within Groups	۰.۰۰۰	۶	۰.۰۰۰		
Total	۰.۰۰۰	۷			



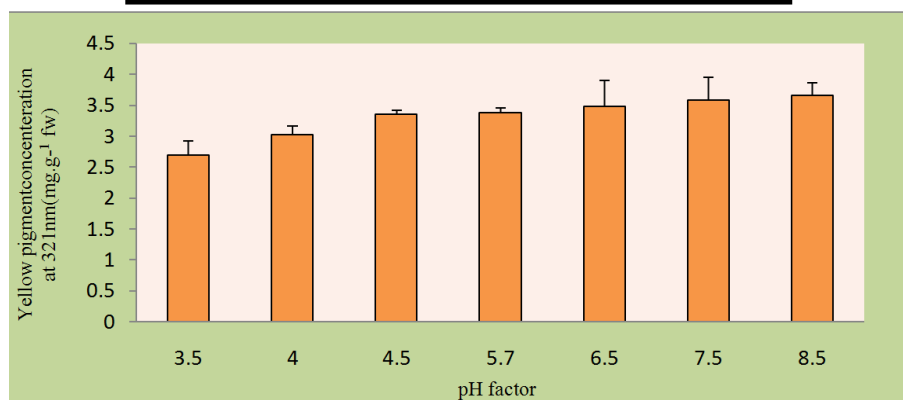
نمودار ۳. میزان رنگدانه قرمز در طول موج ۵۱۷ نانومتر در کشت درون شیشه ریشه گیاه گلرنگ تحت تیمار نور (۲۳۰۰ Lux و فتوپریود ۱۶ ساعت روشنایی) و تاریکی (به طور کامل با فویل پوشیده) پس از ۲۱ روز. هر تیمار ۴ بار تکرار شده و نتایج به‌دست آمده از لحاظ آماری معنی‌دار نیست ($p > 0.05$).

۲. اثر فاکتور pH بر تولید رنگدانه‌های گیاه : برای تعیین تأثیر فاکتور pH بر تولید ترکیبات رنگی گیاه از ۷ گستره pH (۳.۵، ۴، ۴.۵، ۵.۷، ۶.۵، ۷.۵، ۸.۵) استفاده شد. هر تیمار ۳ بار تکرار شده است. نتایج حاصل از آنالیز رنگدانه‌های گیاه گلرنگ در مقادیر مختلف pH در جدول ۴ آمده است.

جدول ۴. نتایج حاصل از تیمار pH بر میزان تولید رنگدانه‌ها در کشت درون شیشه ریشه گیاه گلرنگ پس از ۲۱ روز

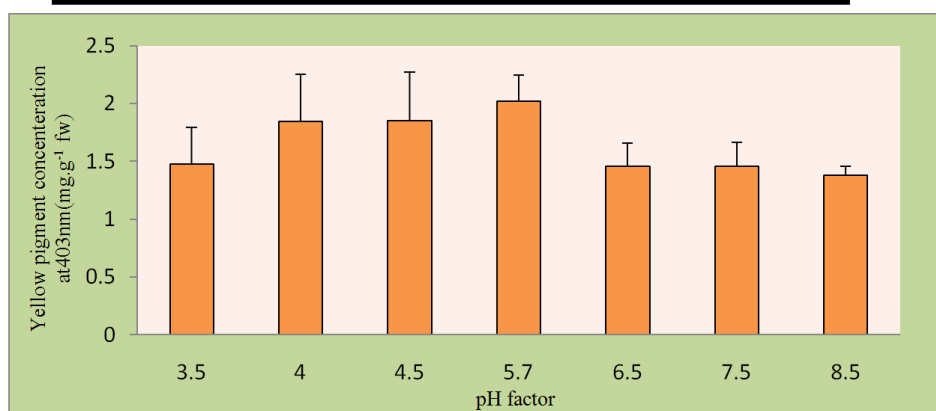
Treatment	N	رنگدانه قرمز در طول موج 517nm (mean $\pm$ SE) (mg.g ⁻¹ fw)	رنگدانه زرد در طول موج 403nm (mean $\pm$ SE) (mg.g ⁻¹ fw)	رنگدانه زرد در طول موج 321nm (mean $\pm$ SE) (mg.g ⁻¹ fw)
3/5	۳	۰.۱۴۸ $\pm$ ۰.۰۰۲	۱.۴۷۴ $\pm$ ۰.۳۲	۲.۶۹۳ $\pm$ ۰.۲۳
4	۳	۰.۱۴۹ $\pm$ ۰.۰۰۲	۱.۸۴۵ $\pm$ ۰.۴۱	۳.۰۳ $\pm$ ۰.۱۳
4/5	۳	۰.۱۵۰ $\pm$ ۰.۰۰۱	۱.۸۵۵ $\pm$ ۰.۴۲	۳.۳۵۶ $\pm$ ۰.۰۶
5/7	۳	۰.۱۵۲ $\pm$ ۰.۰۰۱	۲.۰۲ $\pm$ ۰.۲۳	۳.۳۷۷ $\pm$ ۰.۰۸
6/5	۳	۰.۱۴۹ $\pm$ ۰.۰۰۲	۱.۴۶ $\pm$ ۰.۲	۳.۴۸ $\pm$ ۰.۴۲
7/5	۳	۰.۱۵۰ $\pm$ ۰.۰۰۱	۱.۴۵۸ $\pm$ ۰.۲۱	۳.۳۵۸ $\pm$ ۰.۳۷
8/5	۳	۰.۱۴۸ $\pm$ ۰.۰۰۱	۱.۳۷۸ $\pm$ ۰.۰۸	۳.۳۶۵ $\pm$ ۰.۲

variable	ANOVA				
	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Yellow pigment concentration at 321nm					
Between Groups	۲.۰۶۵	۶	۰.۳۴۴	۱.۲۳۴	۰.۳۴۷
Within Groups	۳.۹۰۵	۱۴	۰.۲۷۹		
Total	۵.۹۷۰	۲۰			



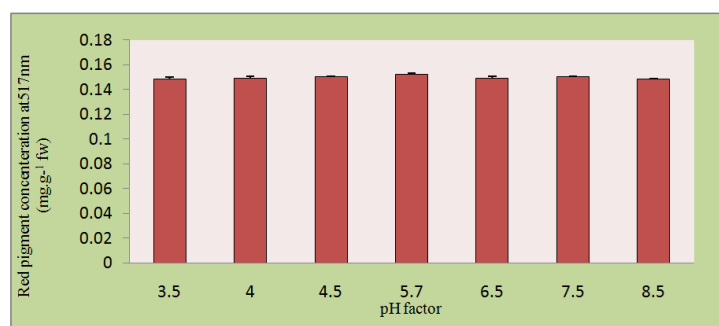
نمودار ۴. میزان رنگدانه زرد در طول موج ۳۲۱ نانومتر در کشت درون شیشه ریشه گیاه گلرنگ. تعداد تکرار ۳ بار بوده و اختلاف میانگین موجود با توجه به جدول آنالیز واریانس ارائه شده معنی‌دار نیست ($p > 0.05$)

variable	ANOVA				
	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Yellow pigment concentration at 403nm					
Between Groups	۱.۰۷۰	۶	۰.۱۷۸	۰.۶۸۳	۰.۶۶۷
Within Groups	۳.۶۵۶	۱۴	۰.۲۶۱		
Total	۴.۷۲۶	۲۰			



نمودار ۵. میزان رنگدانه زرد در طول موج ۴۰۳ نانومتر در کشت درون شیشه ریشه گیاه گلرنگ. تعداد تکرار ۳ بار بوده و اختلاف میانگین موجود با توجه به جدول آنالیز واریانس ارائه شده معنی‌دار نیست ($p > 0.05$).

variable	ANOVA				
	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Red pigment concentration at 517nm					
Between Groups	۰.۰۰۰	۶	۰.۰۰۰	۰.۰۴۳	۰.۷۶۸
Within Groups	۰.۰۰۰	۱۴	۰.۰۰۰		
Total	۰.۰۰۰	۲۰			



نمودار ۶. میزان رنگدانه قرمز در طول موج ۵۱۷ نانومتر در کشت درون شیشه ریشه گیاه گلرنگ. تعداد تکرار ۳ بار بوده و اختلاف میانگین موجود معنی‌دار نیست ($p > 0.05$).

چنانچه در جدول ۴ و نمودارهای مربوط به آن دیده می‌شود تولید رنگدانه‌های گیاه گلرنگ در تمامی گستره‌های pH بررسی شده صورت می‌گیرد. با وجود آنکه در مورد تولید رنگدانه زرد در طول موج ۴۰۳ نانومتر pH های گستره اسیدی و در تولید رنگدانه زرد در طول موج ۳۲۱ نانومتر pH های گستره بازی موفق‌تر بوده‌اند اما آنالیزهای آماری در کل تفاوت معنی‌داری را نشان نمی‌دهد ($p > 0.05$).

بررسی تیمارهای مؤثر بر تولید رنگیزه‌های فتوسنتزی گیاه گلرنگ

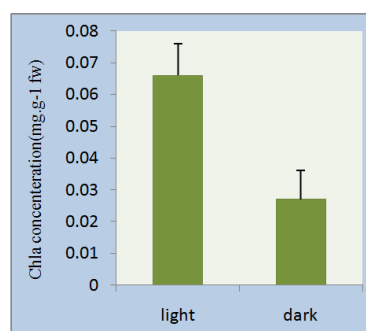
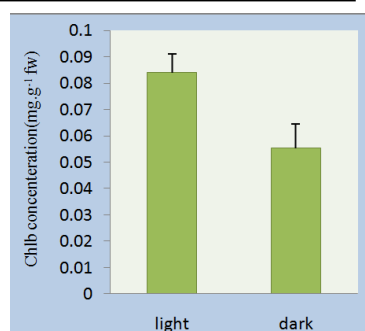
۱. اثر تیمار نور و تاریکی بر تولید رنگیزه‌های فتوسنتزی: نتایج حاصل از تأثیر فاکتور نور (۲۳۰۰ Lux) و فتوپریود ۱۶ ساعت (روشنایی) و تاریکی (به‌طور کامل با فویل پوشیده) بر مقادیر تولید رنگیزه‌های فتوسنتزی (Chla، Chlb، محتوی کل کلروفیل و کارتنوئیدها) در جدول ۵ آمده است.

جدول ۵. نتایج حاصل از تیمار نور (2300Lux) و فتوپریود ۱۶ ساعت (روشنایی) و تاریکی (به‌طور کامل با فویل پوشیده) بر میزان تولید رنگیزه‌های فتوسنتزی در کشت درون شیشه ریشه گیاه گلرنگ پس از ۲۱ روز

Treatment	N	Chla (mean $\pm$ SE) (mg.g ⁻¹ fw)	Chlb (mean $\pm$ SE) (mg.g ⁻¹ fw)	Total Chl (mean $\pm$ SE) (mg.g ⁻¹ fw)	کارتنوئیدها (mean $\pm$ SE) (mg.g ⁻¹ fw)
نور	۴	۰.۰۶۵ $\pm$ ۰.۰۰۱	۰.۰۸۴۱ $\pm$ ۰.۰۰۷	۰.۱۴۹ $\pm$ ۰.۰۰۶	۷.۶۷ $\pm$ ۰.۸
تاریکی	۴	۰.۰۲۷ $\pm$ ۰.۰۰۹	۰.۰۵۵ $\pm$ ۰.۰۰۹	۰.۰۸۴۳ $\pm$ ۰.۰۰۵	۶.۶۷ $\pm$ ۰.۰۳

variable	ANOVA				
	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
مقدار کلروفیل b					
Between Groups	۰.۰۰۲	۱	۰.۰۰۲	۶.۲۳	۰.۰۴۷
Within Groups	۰.۰۰۲	۶	۰.۰۰۰		
Total	۰.۰۰۳	۷			

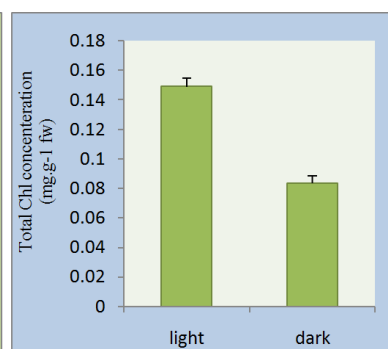
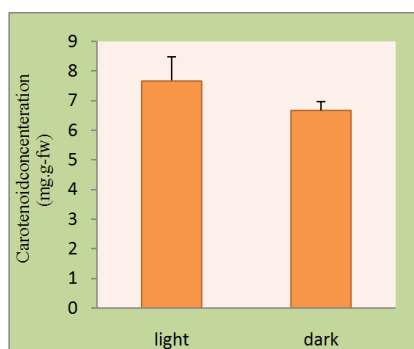
variable	ANOVA				
	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
مقدار کلروفیل a					
Between Groups	۰.۰۰۳	۱	۰.۰۰۳	۷.۸۳۱	۰.۰۳۱
Within Groups	۰.۰۰۲	۶	۰.۰۰۰		
Total	۰.۰۰۵	۷			



نمودار ۸. مقادیر کلروفیل a و کلروفیل b در کشت درون شیشه ریشه گیاه گلرنگ در تیمار نور و تاریکی. تعداد تکرار ۴ بار بوده و نتایج با توجه به جداول آنالیز واریانس در خصوص مقدار کلروفیل a معنی‌دار ($p < 0.05$) بوده و در خصوص مقدار کلروفیل b معنی‌دار نیست ($p > 0.05$)

variable	ANOVA				
	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
مقدار کارتنوئید					
Between Groups	۱.۹۸۷	۱	۱.۹۸۷	۱.۴۸۸	۰.۲۶۸
Within Groups	۸.۰۱۳	۶	۱.۳۳۶		
Total	۱۰.۰۰۰	۷			

variable	ANOVA				
	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
محتوی کل کلروفیل					
Between Groups	۰.۰۰۹	۱	۰.۰۰۹	۵۹.۸۳۷	۰.۰۰۰
Within Groups	۰.۰۰۱	۶	۰.۰۰۰		
Total	۰.۰۱۰	۷			



نمودار ۹. محتوی کل کلروفیل و میزان کارتنوئیدها در کشت درون شیشه ریشه گیاه گلرنگ تحت تیمار نور و تاریکی. تعداد تکرار ۴ بار بوده و نتایج در مورد مقادیر محتوی کل کلروفیل معنی‌دار ($p > 0.05$) بوده و در مورد کارتنوئیدها معنی‌دار نیست ($p > 0.05$)

چنان‌که در جدول ۵ و نمودارهای مرتبط با آن دیده می‌شود، میانگین تولید ترکیبات در شرایط نوری به ترتیب ۰.۰۶۲، ۰.۰۶۷، ۰.۱۲۹، ۷.۶۷ بوده و میانگین مقدار همین ترکیبات در شرایط تاریکی ۰.۰۳۲، ۰.۰۵۴، ۰.۰۸۶، ۶.۶۷ بوده است. که اختلاف میانگین موجود بین دو شرایط مورد بحث در خصوص تولید

کلروفیل a، محتوی کل کلروفیل معنی‌دار بوده ($p > 0.05$) اما مقادیر کارتئوئیدی با اینکه بیش‌تر از نمونه‌های تیمار تاریکی است ولی تفاوت معنی‌داری را نشان نمی‌دهد.

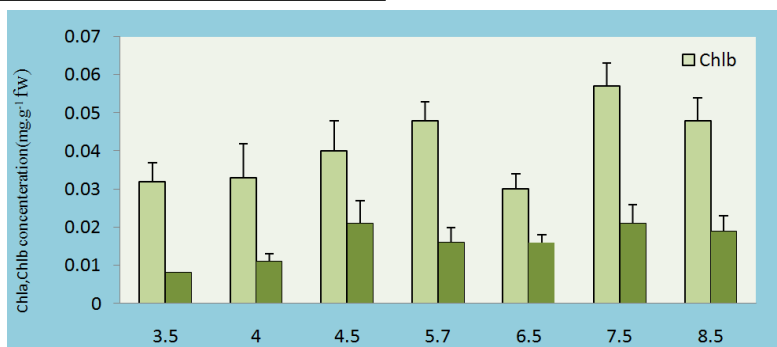
۲. اثر فاکتور pH بر تولید رنگیزه‌های فتوسنتزی: نتایج حاصل از تأثیر فاکتور pH (۳.۵، ۴، ۴.۵، ۵.۷، ۶.۵، ۷.۵، ۸.۵) بر تولید رنگیزه‌های فتوسنتزی (Chla، Chlb، محتوی کل کلروفیل و کارتئوئیدها) در جدول ۶ آمده است.

جدول ۶. نتایج حاصل از تیمار فاکتور pH بر تولید رنگیزه‌های فتوسنتزی در کشت درون شیشه ریشه گیاه گلرنگ. تعداد تکرار در خصوص هر گستره ۴ بار بوده است.

Treatment	N	Chla (mean $\pm$ SE) (mg.g ⁻¹ fw)	Chlb (mean $\pm$ SE) (mg.g ⁻¹ fw)	Total Chl (mean $\pm$ SE) (mg.g ⁻¹ fw)	کارتئوئیدها (mean $\pm$ SE) (mg.g ⁻¹ fw)
۳.۵	۴	۰.۰۰۸ $\pm$ ۰.۰۰	۰.۰۳۲ $\pm$ ۰.۰۰۵	۰.۰۴ $\pm$ ۰.۰۰۵	۳.۱۴۵ $\pm$ ۰.۰۹
۴	۴	۰.۰۱۱ $\pm$ ۰.۰۰۲	۰.۰۳۳ $\pm$ ۰.۰۰۹	۰.۰۴۵ $\pm$ ۰.۰۱۱	۳.۲۴۲ $\pm$ ۰.۰۴
۴.۵	۴	۰.۰۲۱ $\pm$ ۰.۰۰۶	۰.۰۴ $\pm$ ۰.۰۰۸	۰.۰۶۱ $\pm$ ۰.۰۱۲	۳.۸۸ $\pm$ ۰.۵۷
۵.۷	۴	۰.۰۱۶ $\pm$ ۰.۰۰۴	۰.۰۴۸ $\pm$ ۰.۰۰۵	۰.۰۶۵ $\pm$ ۰.۰۰۲	۳.۲۱۲ $\pm$ ۰.۲۷
۶.۵	۴	۰.۰۱۶ $\pm$ ۰.۰۰۲	۰.۰۳ $\pm$ ۰.۰۰۴	۰.۰۴۷ $\pm$ ۰.۰۰۷	۲.۸۶ $\pm$ ۰.۵۳
۷.۵	۴	۰.۰۲۱ $\pm$ ۰.۰۰۵	۰.۰۵۷ $\pm$ ۰.۰۰۶	۰.۰۷۸ $\pm$ ۰.۰۰۵	۳.۲۳ $\pm$ ۰.۴۷
۸.۵	۴	۰.۰۱۹ $\pm$ ۰.۰۰۴	۰.۰۴۸ $\pm$ ۰.۰۰۶	۰.۰۶۸ $\pm$ ۰.۰۰۱	۳.۳۹ $\pm$ ۰.۵۵

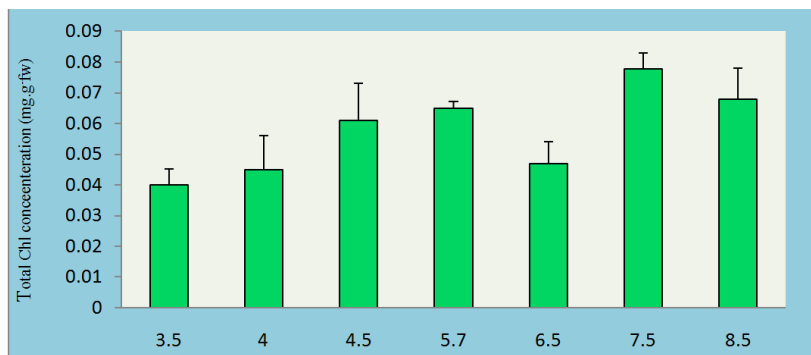
variable	ANOVA				
مقدار کلروفیل b	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	۰.۰۰۲	۶	۰.۰۰۰	۲.۱۴	۰.۰۹۱
Within Groups	0.004	۲۱	۰.۰۰۰		
Total	0.006	۲۷			

variable	ANOVA				
مقدار کلروفیل a	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	۰.۰۰۱	۶	۰.۰۰۰	۱.۵۵	۰.۲۱۰
Within Groups	۰.۰۰۱	۲۱	۰.۰۰۰		
Total	۰.۰۰۲	۲۷			



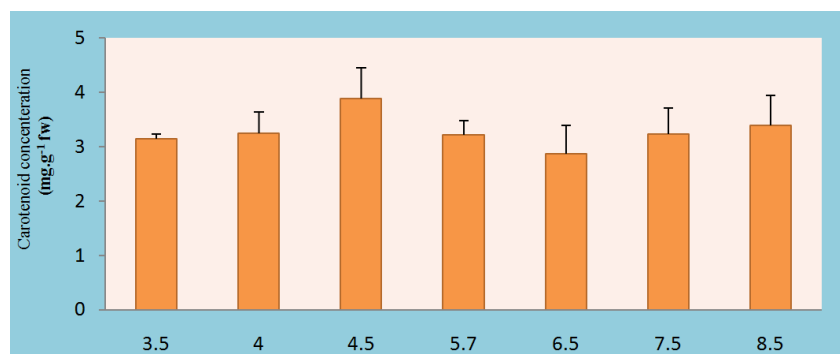
نمودار ۱۰. مقادیر کلروفیل a و کلروفیل b در کشت درون شیشه ریشه گیاه گلرنگ تحت تیمار فاکتور pH. تعداد تکرارها ۴ بار بوده و اختلاف میانگین موجود با توجه به جدول آنالیز واریانس مربوط معنی‌دار نیست ($p > 0.05$).

variable	ANOVA				
	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	۰.۰۰۵	۶	۰.۰۰۱	۲.۶۴۲	۰.۰۴۵
Within Groups	۰.۰۰۶	۲۱	۰.۰۰۰		
Total	۰.۰۱۱	۲۷			



نمودار ۱۱. مقادیر محتوی کل کلروفیلی در کشت درون شیشه ریشه گیاه گلرنگ تحت تیمار فاکتور pH. تعداد تکرار ۴ بار بوده و اختلاف میانگین موجود با توجه به جدول آنالیز واریانس مربوط معنی دار است ($p < ۰.۰۵$).

variable	ANOVA				
	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	۲.۳۰۴	۶	۰.۳۸۴	۰.۸۷۷	۰.۸۱۸
Within Groups	۱۶.۹۰۴	۲۱	۰.۸۰۵		
Total	۱۹.۲۰۸	۲۷			



نمودار ۱۲. مقادیر کارتنوئیدها در کشت درون شیشه ریشه گیاه گلرنگ تحت تیمار فاکتور pH. تعداد تکرار ۴ بار بوده و اختلاف میانگین موجود با توجه به جدول آنالیز واریانس مربوطه معنی دار نیست ($p > ۰.۰۵$).

نتایج مشاهده شده در جدول ۶ و نمودارهای مربوط با آن نشان می‌دهد که تولید ترکیبات رنگیزه‌های فتوسنتزی در تمام گستره‌های PH تحت تیمار صورت می‌گیرد. بررسی‌های آماری حاکی از آن است که تنها در اختلاف میانگین محتوی کل کلروفیلی تفاوت معنی‌داری دیده می‌شود ($p < 0.05$) که بیش‌ترین مقدار را در $pH = 7.5$ و به میزان $0.078 \text{ mg.g}^{-1} \text{ fw}$ داشته است.

بحث و نتیجه‌گیری

بهینه‌سازی کشت ریشه گیاه گلرنگ

کشت اندام گیاهی شامل کشت‌های استریل جنین، بساک، جوانه، گل، ریشه و سایر اندام‌های گیاه در محیطی است، که معمولاً حاوی هورمون‌های گیاهی اکسین و سیتوکنین بوده و گاهی اوقات عاری از آن‌هاست [۶]. از اواخر دهه ۶۰ میلادی، تکنولوژی کشت بافت به‌عنوان ابزاری برای مطالعه و تولید متابولیت ثانویه گیاهی معرفی شد. علاوه بر آن توسعه روش‌های بیوتکنولوژی مانند ریزازدیادی، کشت سلول، ریشه و ریشه‌های مویی یکی از مهم‌ترین شیوه‌های حل مشکلات مربوط به اثرات مخرب برداشت محصولات گیاهی با خصوصیات غذایی، صنعتی و دارویی است. در این راستا توسعه سیستم‌های سریع کشت و تکثیر ریشه فرصتی بی‌نظیر برای تولید محصولات مختلف متابولیت ثانویه در آزمایشگاه و بدون نیاز به زمین‌های قابل کشت خواهد بود [۲۹]. در این پژوهش نیز کشت ریشه گیاه گلرنگ و بهینه‌سازی شرایط آن تحت فاکتورهای نور و تاریکی و فاکتور pH انجام گرفت. بررسی در خصوص تحقیقات انجام شده در مورد کشت ریشه گیاهان مختلف حاکی از آن است که اغلب این فرایند درون ظروف شیشه‌ای ارلن با مقادیر چشمگیری از محیط کشت جامد و مایع و دستگاه‌های شیکر و سیستم‌های چرخشی و یا حتی بایوراکتورها صورت می‌گیرد که نیازمند صرف مقادیر چشمگیری از ماده و انرژی در اشکال مختلف است [۸]، [۱۲]، [۲۱]. اما در تحقیق صورت گرفته حاضر ما از ظروف شیشه‌ای بسیار ساده (Jar) و مقدار بسیار کم محیط مایع (۴ml)، بدون نیاز به آگار برای محیط جامد و شرایط کاملاً استاتیک و ثابت که نیازمند دستگاه‌های پرهزینه شیکر نیست به کشت ریشه گیاه گلرنگ دست یافتیم که این روند تلاشی قابل توجه در صرفه جویی هزینه، مواد و انرژی است. شایان ذکر است که در تحقیقات انجام شده پیشین استفاده از هورمون‌های مختلف اکسین و سیتوکنین برای القا و رشد ریشه استفاده شده بود [۲۹]، [۳۶]. اما در پژوهش انجام شده حاضر دستیابی به مقادیر چشمگیر کشت ریشه بدون استفاده از هیچ‌گونه هورمونی صورت گرفته و در نتیجه گامی دیگر در جهت کاهش هزینه‌های مرتبط است.

۱. بهینه سازی کشت ریشه گیاه گلرنگ تحت تیمار نور و تاریکی: نور به‌عنوان یک فاکتور محیطی مهم نقش ویژه‌ای در تنظیم فرایند نمو گیاهی و پارامترهای مورفولوژیکی داراست. مثلاً نور منجر به افزایش وزن خشک

ریشه و ساقه گیاهان گوجه فرنگی^۱ و کلم^۲ می‌گردد. البته باید این نکته را اذعان داشت که رشد ریشه‌های گیاهان مختلف تحت شرایط نور و تاریکی متفاوت است. برای نمونه در خصوص گیاه برنج رشد ریشه‌ها در تاریکی به مراتب بیش‌تر از رشد آن‌ها در شرایط نوری است [۲۵]. در این پژوهش نیز بیش‌ترین میزان کشت و نیز وزن تر و خشک ریشه‌های گیاه گلرنگ مربوط به شرایط نوری (شدت نوری ۲۳۰۰ لوکس به همراه فتوپریود ۱۶ ساعت) بوده است و ریشه‌هایی که به طور کامل با فویل پوشیده شده بودند میانگین رشد کم‌تری را نشان دادند که اختلاف موجود در خصوص وزن خشک ریشه‌های کشت شده معنی‌دار بوده و می‌توان چنین نتیجه‌گیری کرد که شرایط نوری منجر به افزایش بیومس و ماده‌سازی در ریشه‌های گیاه گلرنگ شده است.

۲. بهینه‌سازی کشت ریشه گیاه گلرنگ تحت فاکتور pH: pH محیط فاکتور مهمی دیگر است که فرایند رشد و نمو گیاهان را تحت تأثیر قرار می‌دهد. بر طبق "فرضیه رشد اسیدی" تنظیم انبساط سلول‌ها از طریق اصلاح pH پیرامون دیواره سلولی صورت می‌گیرد، در نتیجه انبساط یافتگی سلول‌ها تحت pH های پایین افزایش می‌یابد [۱۱]. شواهد فراوانی این فرضیه را در خصوص کلنوپتیل‌های ساقه یا انبساط برگ‌ها تأیید می‌کند [۲۴]، [۳۲]، [۳۹]. با این وجود نتایج در خصوص ریشه گیاهان چندان قطعی نیست. پایین بودن pH محیط ممکن است حتی طولی شدن ریشه‌ها را نیز در پی داشته باشد [۱۴]، [۱۵] و یا اینکه اثر چندانی روی آن نگذارد [۹]، [۳۲]. اگرچه "فرضیه رشد اسیدی" در خصوص ریشه شناخته شده است اما آزمایش‌های تجربی اندکی در این باره وجود دارد. در تحقیقی که کیونگ لینگ^۳ و همکاران در خصوص اثر pH (با گستره‌های ۴، ۵، ۸، ۱۰، ۱۲ و ۱۴) بر روی القا ریشه‌های ناب‌جای حاصل از قطعه جداکشت برگی گیاه اورتوسیفون استامینوس^۴ انجام دادند گرفت، pH = ۶.۵ به عنوان pH بهینه رشد معرفی شده است [۲۳]، اما از آن‌جاکه دست‌یابی به مواد مغذی ضروری در گیاهان مختلف در pH های متفاوتی صورت می‌گیرد، بنا بر این مقدار pH بهینه در گیاهان متفاوت خواهد بود. در این پژوهش برای بررسی تأثیر فاکتور pH بر روند رشد ریشه از ۷ گستره pH که شامل ۳ گستره اسیدی (۳/۵، ۴، ۴/۵)، ۳ گستره بازی (۶/۵، ۷/۵، ۸/۵) و pH خنثی (۵/۷) بود استفاده شد. رشد ریشه در تمامی pH ها صورت گرفته و در pH = ۵.۷ بیش‌ترین مقدار را داشته است اما در کل تفاوت معنی‌داری دیده نشد ($p > 0.05$).

تولید رنگدانه‌های گیاه گلرنگ در کشت ریشه آن

بررسی پژوهش‌های انجام شده در مورد تولید رنگدانه‌های مختص گیاه گلرنگ حاکی از آن است که تولید رنگدانه‌های کارتامین و سافلور زرد در گل‌های کوچک [۱۶]، گلبرگ‌ها [۱۰] و کشت‌های سلولی این گیاه [۱۸] صورت گرفته است اما هیچ گزارشی در خصوص تولید این ترکیبات در کشت ریشه این گیاه وجود ندارد. در پژوهشی که چاو و همکاران (۲۰۰۰) انجام دادند تبدیل آنزیمی پرکارتامین^۶ به کارتامین از طریق آنزیم

۱. *Lycopersicon esculentum*

۲. *Brassica oleracea* L.

۳. Kiong Ling

۴. *Orthosiphon stamineus*

۵. Cho, M.H

۶. Precarthamin

خالص‌سازی شده از گلبرگ‌های زرد گیاه گلرنگ بررسی شد [۱۰]. فتاحی و همکاران به سال ۲۰۰۹ اثر فاکتورهای خارجی مختلف مانند نور، دما و pH را بر حفظ ماهیت شیمیایی رنگدانه‌های گلچه‌های گلرنگ بررسی کردند [۱۶]. در تحقیق حاضر نیز دستیابی به ترکیبات رنگدانه‌های گیاه گلرنگ (رنگدانه قرمز در طول موج ۵۱۷ نانومتر و رنگدانه زرد در طول موج‌های ۴۰۳ و ۳۲۱ نانومتر) در کشت ریشه آن انجام شده است. نکته قابل توجه دیگر این است که ریشه‌هایی که حاوی این ترکیبات بوده‌اند به‌طور کاملاً مستقل کشت شده‌اند و هیچ‌گونه ارتباط و وابستگی به بخش‌هایی هوایی گیاه نداشته‌اند.

۱. تولید رنگدانه‌های گیاه گلرنگ تحت تأثیر تیمار نور و تاریکی: نور از جمله مؤثر بر فعالیت آنزیم‌های بیوسنتزی در مسیر تولید ترکیبات ثانویه، مقدار لیگنین و ترکیبات فنلیک است. برای مثال نشان داده شده است که تولید ترکیب ثانویه آنتوسیانین در گیاه رافانوس ساتیوس^۱ تحت تأثیر شرایط نوری صورت گرفته و به نسبت شرایط تاریکی چشمگیرتر بوده است و چنین تصور می‌شود که تشکیل رنگدانه تحت شرایط نوری تنظیم شده است [۸]. در این پژوهش نیز تولید ترکیبات رنگدانه‌ای مختص گیاه (رنگدانه قرمز در طول موج ۵۱۷ نانومتر و رنگدانه زرد در طول موج‌های ۴۰۳ و ۳۲۱ نانومتر) تحت شرایط نوری صورت گرفته و در قیاس با شرایط تاریکی تفاوت قابل توجهی داشته است. به‌گونه‌ای که میانگین تولید رنگدانه‌ها در حضور نور بیش‌تر بوده و اختلاف موجود بین آن‌ها در مورد تولید رنگدانه زرد در طول موج‌های ۴۰۳ و ۳۲۱ نانومتر از لحاظ آماری معنی‌دار است ($p < 0.05$). چنان‌که عنوان شد تصور می‌شود که نور منجر به فعال‌سازی آنزیم‌های مؤثر در مسیر بیوسنتزی تولید رنگدانه‌های مختص گیاه شده است. معرفی نوع آنزیمی‌های مربوطه و چگونگی سنتز آن‌ها در مسیرهای بیوسنتزی نیازمند انجام تحقیقات تخصصی بیش‌تر در این زمینه است.

۲. تولید رنگدانه‌های گیاه گلرنگ تحت تأثیر فاکتور pH: فتاحی، کاراپتین و حیدری به سال ۲۰۰۹ در پژوهشی در خصوص تأثیر فاکتور pH بر پایداری رنگدانه‌های کارتامین و سافلور زرد در گلچه‌های گیاه گلرنگ چنین عنوان کردند: pH‌های اسیدی به نسبت pH‌های بازی در روند تجزیه کارتامین مؤثرتر عمل می‌کنند. اما سافلور زرد در pH‌های اسیدی ثابت و پایداری بیش‌تری دارد [۱۶]. در تحقیق حاضر تولید رنگدانه‌های گیاه گلرنگ در تمامی گستره‌های pH مورد بررسی صورت می‌گیرد. اگر چه در مورد تولید رنگدانه زرد در طول موج ۴۰۳ نانومتر، pH‌های گستره اسیدی و در تولید رنگدانه زرد در طول موج ۳۲۱ نانومتر، pH‌های گستره بازی موفق‌تر بوده‌اند اما آنالیزهای آماری در کل تفاوت معنی‌داری را نشان نمی‌دهد ($p > 0.05$). در خصوص رنگدانه قرمز در طول موج ۵۱۷ نانومتر نیز تولید آن در تمامی دامنه‌های pH بدون اختلاف میانگین معنی‌داری صورت می‌گیرد و از آن‌جاکه فاکتور pH عامل بسیار مهمی در اغلب مسیرهای متابولیسمی موجود در گیاه است سازگاری گیاه به گستره‌های مختلف آن امری قابل توجه و حائز اهمیت است

^۱. *Raphanus sativus* L.

و تولید ترکیبات رنگدانه‌ای گیاه گلرنگ در ریشه آن نیز این مشخصه را داراست.

تولید رنگیزه‌های فتوسنتزی در کشت ریشه تحت تأثیر تیمار نور و تاریکی

نور از جمله عوامل بسیار مهم انجام فعالیت‌های فتوسنتزی در گیاهان است. کیفیت، کمیت و مدت زمان قرارگیری نمونه‌ها در مقابل نور از جمله فاکتورهای دیگری است که روند فتوسنتز را تحت تأثیر دارد. در پژوهشی که در خصوص اثر طول موج نوری بر محتوی رنگدانه‌ای بافت‌های گیاه کاتلا اینترمدیا^۱ صورت گرفته، از ۳ طول موج نوری قرمز، آبی و سفید استفاده شده که محتوی کل کلروفیل و کارتنوئیدها در کشت‌هایی که در مجاورت نور سفید بودند بیش‌ترین مقدار را داشته و از نور آبی به قرمز و قرمز دور به تدریج روند کاهشی دیده شده است [۱۲]. در این پژوهش نیز تولید رنگیزه‌های فتوسنتزی (Chla، Chlb، محتوی کل کلروفیل و کارتنوئیدها) تحت شرایط نوری صورت گرفته و در قیاس با شرایط تاریکی تفاوت چشمگیری داشته است. به گونه‌ای که میانگین تولید ترکیبات در شرایط نوری بیش‌تر از تاریکی بوده و اختلاف میانگین موجود در خصوص تولید کلروفیل a و محتوی کل کلروفیل معنی‌دار بوده ($p < 0/05$) اما مقادیر کارتنوئیدی با این‌که بیش‌تر از نمونه‌های تیمار تاریکی است ولی تفاوت معنی‌داری را نشان نداده‌اند. بنا بر این می‌توان چنین نتیجه‌گیری که شرایط نوری اگرچه سبزشدگی ریشه‌ها را در بر نداشته اما عاملی برای تولید بیش‌تر ترکیبات رنگدانه‌های فتوسنتزی بوده است.

تولید رنگیزه‌های فتوسنتزی در کشت ریشه تحت تأثیر فاکتور pH

چنان که می‌دانیم pH فاکتور بسیار مهمی است که در بسیاری از مسیرهای متابولیکی مانند نقل و انتقال الکترون، فرایند تنفس و جذب آب نقش دارد و ریشه‌های کشت شده باید توانایی چشمگیری در زمینه سازگاری با آن و یا تنظیم محدوده‌های مختلف آن را داشته باشند [۴۳]. در پژوهش حاضر نیز تولید رنگیزه‌های فتوسنتزی در تمامی گستره‌های pH (۳.۵، ۴، ۴.۵، ۵.۷، ۶.۵، ۷.۵، ۸.۵) بررسی شده است. بررسی‌های آماری حاکی از آن است که تنها در اختلاف میانگین محتوی کل کلروفیلی (ChlT) تفاوت معنی‌داری دیده می‌شود ($P < 0.05$) که بیش‌ترین مقدار در pH= ۷.۵ و به میزان $0.078 \text{ mg.g}^{-1} \text{ fw}$ بوده است.

منابع

۱. توکلی، افشین، بررسی اثر قطع آبیاری در مراحل مختلف رشد بر عملکرد، اجزاء عملکرد و عملکرد روغن گلرنگ. پایان نامه کارشناسی ارشد. دانشکده کشاورزی. دانشگاه تهران (۱۳۸۱).
۲. لاجوردی، ناصر؛ دانه‌های روغنی. انتشارات دانشگاه تهران (۱۳۵۹).

^۱. *Cattleya intremedia* * *C. auranttaca*

3. A. Anju, H. S. Chawla, "Organogenic plant regeneration via callus induction in chickpea (*Cicer arietinum* L.) Role of genotypes", growth regulators and explants. *Indian J. Biotechnol*, 4 (2005) 251-256.
4. Anonymous, *Carthamus tinctorius* L. In *Wealth of India*, Indian row materials. CSIR, Indian 2 (1950) 83-88.
5. D. Ba-alma, S. Uranbey, S. Mirici, O. kolsarici, "TDZ x IBA induced shoot regeneration from cotyledonary leaves and in vitro multiplication in safflower (*Carthamus tinctorius* L.)" *African Journal of Biotechnology* 17 (1998) 960-966.
6. Y.P.S. Bajaj, "Wide hybridization in legumes and oilseed crops through embryo", ovule and ovary culture. In: *Biotechnology in Agriculture and Forestry- Legumes and Oilseed Crops I*, 10 (1990) 4-37.
7. C. M. Baker, W. E. Dyer, "Improvements in rooting regenerated safflower (*Carthamus tinctorius* L.) shoots", *Plant Cell Rep.* 16 (1) (1997) 106-110.
8. F. Betsui, N. Tanaka-Nishikawa, K. Shimomura, "Anthocyanin production in adventitious root cultures of *Raphanus sativus* L. cv. Peking Koushin", *Plant Biotechnology* 21(5) (2004) 387-391.
9. K. Buntmeyer, H. Luthen, M. Bottger, "Auxin-induced changes in cell wall extensibility of maize roots", *Planta*, 204 (1998) 515-519.
10. M.H. Cho, Y.S. Paik, T.R. Hahn, "Enzymatic Conversion of Precarthamin to Carthamin by a Purified Enzyme from the Yellow Petals of Safflower", *J. Agric. Food Chem*, 48 (2000) 3917-3921.
11. D. J. Cosgrove, "Enzymes and other agents that enhance cell wall extensibility", *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 50 (1999) 391-417.
12. T. Cybularz-Urban, E. Hanus-Fajerska, A. Widerski, "Effect Of Light Wavelength On in Vitro Organogenesis Of A *Cattleia* hybrid", *Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica* 49/1(2007)113-118.
13. L. Daju, M. Mundel, *Safflower*. IPGRI Publishing (1997).
14. K.L. Edwards, T.K. Scott, "Rapid growth responses of corn root segments: effect of pH on elongation", *Planta*, 119 (1974) 27-37.
15. M.L. Evans, "A new sensitive root auxanometer", *Plant Physiology*, 58 (1976) 599-601.

16. N. Fatahi, J. Carapetian, R. Heydari, "Comparing Stability of Carthanim and Safflower Yellow Pigments at Temperature, PH and Light, from Safflower (*Carthamus tinctorius* L.) Florets", Research Journal of Biological Science 4(3) (2009) 250-253.
17. "Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO)", FAOSTAT Statistics Database (2006). available at: <http://faostat.fao.org/>.
18. W. Y. L. Gao, K. Y. Fan, Yellow and red pigment production by cell cultures of *carthamus tinctorius* in bioreactor, Reserch center for the Advanced Horticultural technology, Chungbuk National university, Cheongju (2000) 316-763.
19. N. Hanagata, H. Uehara, "Behavior of cell aggregate of *Carthamus tinctorius* L. cultured cells and correlation with red pigment formation", J. Biotechnology 30 (1993) 259-269.
20. N. Hanagata, I. Karube, "Red pigment production by *cartamin tinctorius* L. cell in a two-stage culture systems", J.Biotechnology, 31 (1994) 59-65.
21. M. I. Islam, H. Zubair, N. Imtiaz, M. F. Chauadhary, "Effect of Different Plant Growth Regulators for the Economical Production of in vitro Root Cultures of *Cicer arietinum* L. " International Journal Of Agriculture & Biology (2005) 4-621-626.
22. A. James, Duke; Handbook of Energy Crops (1983).
23. A. Kiong Ling, K. Ming Kok, H. Sobri, "Adventitious Rooting of *Orthosiphon stamineus* in Response to Sucrose Concentrations and Medium pH.", American-Eurasian Journal of Sustainable Agriculture, 3(1) (2009) 93-100.
24. T. N. Kotake, K. Nakagawa, N. Takeda, Sakurai, "Auxin-induced elongation growth and expressions of cell wall-bound exo-and endo-beta-glucanases in barley coleoptiles", Plant and Cell Physiology, 41 (2000) 1272-1278.
25. L. Kwan-Long, Hou. Chin-Ri, "Effects of Light on The Cultured Rice Roots", Bot. Bull. Academia Sinica 16 (1975) 45-54.
26. H. K. Lichtenther, "Chlorophylls and carotenoides pigments of photosynthesis", Methods in Enzymology, INRA, EDPSci, 57 (1987) 245-250.
27. A. K. A. Mandal, A. K. Chattererji, S. Gupta, "Direct somatic embryogenesis and plantlet regeneration from cotyledonary leaves of safflower", Plant cell Tissue and organ culture, 43 (1995) 287-289.

28. T. Murashige, F. Skoog, "A revived medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture", *Plant Physiology*, 15 (1962) 473-49.
29. S. Nandagopal, B.D. Ranjitha Kumari, Effectiveness of Auxin Induced InVtro Root Culture In Chicory *Journal Central European Agriculture* (2007) 73-80.
30. T. D. Nikam, M. G. Shitole, "In vitro culture of safflower: initiation, growth optimization and organogenesis" (2004) 15-22.
31. R. Oommen, "Production of blue pigments from the callus culture of *Lavandula agustifolia* and red pigments from the hairy root culture of *Beta vulgaris*", A thesis presented in partial fulfillment of the requirements for degree of master of technology in biotechnology, New Zealand (2009).
32. W. S. Peters, H. Luethen, M. Boettger, H. Felle, "The temporal correlation of changes in apoplast pH and growth rate in maize coleoptile segments", *Australian Journal of Plant Physiology*, 25 (1998) 21-25.
33. L. G. Ramawat, J. M. Merillon, "Biotechnology Secondary Metabolites", Science publishers, Inc. (1999) 63-66.
34. G. R. Routa, S. Sammantary, P. Dasa, "Invitro manipulation and propagation of medicinal plants", *Bio. Adu*, 18 (2002) 91-120.
35. "Safflower Pigment Institute of Tianjin", China company.
36. E. Sobrino, "In vitro root induction in hypocotyl and plumule explants of *Helianthus annuus*. *Environmental and Experimental Botany*" (1998) 271-277.
37. L. Taizo, E. Zeiger, "Plant physiology", second edition, Siaauer Associates, Inc., publishers (1998).
38. N. Toshikatsu, S. Shingo, "Studies on the synthesis of safflomin-A, a yellow pigment in safflower petals: oxidation of 3-c- β -d- glucopyranosyl-5- methylphloroacetophenone", Department of Chemistry and Chemical Engineering, Faculty of Engineering, Yamagata University, 4-3-16 Jonan, Yonezawa-Shia, Yamagata (2005) 851-992, Japan.
39. E. VanVolkenburgh, "Leaf expansion an integrating plant behavior", *Plant, Cell and Environ-ment*, 22 (1999) 1463-1473.

40. S. Wakayama, K. Kusada, T. Kanchira, Y. Yamada, K. Kawazu, A. Kobayashi, A. Kinobeon, "A novel red pigment produced in safflower tissue culture systems", Z Naturforsch C 49 (1994) 1-5.
41. Gi. Wenxuan, Zi Yaunxia, W. Daowu, "Effects of safflower yellow pigment on the blood fat and liver function of rabbits (in Chinese)" J. Lanzhou coll. of Medical Sci. 3 (1987) 57-60.
42. P. R. White, "Potentially unlimited growth of excised tomato root trip in liquid medium". Plant physiol, 9 (1934) 585-600.
43. W.u Xiaojun, "Establishment and Chemical Analysis of Hairy Roots of Eucommia Ulmoides." M. S., Shanghai University of TCM, Shanghai, P.R. China (2007).