نشریه پژوهش‌های تولید گیاهی
جلد بیست و هشتم، شماره دوم، ۱۴۰۰
۱۸۳-۲۰۲
http://jopp.gau.ac.ir
DOI: 10.22069/jopp.2021.18663.2756

مطالعه اثر برخی محرک‌های غیرزیستی بر خصوصیات ریخت‌شناسی و فیتوشیمیایی کارلا

زینب محکمی[۱]، محسن ثانی‌خانی*[۲]، عزیزاله خیری[۲]، عباس بهاری[۳] و مهدی توکلی‌زاده اصفهانی[۴]

[۱]مربی پژوهشی دانشگاه زابل و دانش‌آموخته دکتری فیزیولوژی و اصلاح گیاهان دارویی، گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زنجان، ایران،
[۲]استادیار گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زنجان، ایران،
[۳]استادیار گروه علوم بیوتکنولوژی، پژوهشکده زیست فناوری، دانشگاه زنجان، ایران،
[۴]استادیار گروه فارماکگنوزی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی زنجان، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۰۹/۲۹؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۱۱/۲۹

چکیده

سابقه و هدف: گیاه دارویی کارلا (*Momordica Charantia* L.) یک سبزی گرمسیری با ارزش غذایی و دارویی بالاست. این گیاه متعلق به خانواده کدوئیان و دارای خاصیت ضددیابتی ارزشمند است. کاربرد محرک‌های زیستی در راستای تولید فرآورده‌های زیستی سازگار با محیط زیست و در پیوند با کشاورزی نوین می‌تواند سبب افزایش رشد کیفی و کمی گیاهان و کاهش اثرات تنش‌های محیطی بر آن‌ها شود. این پژوهش با هدف بررسی اثرات تهییج با محرک‌های غیرزیستی بر خصوصیات کارلا رقم Hybrid Baby Doll صورت گرفت.

مواد و روش‌ها: پژوهش حاضر به‌صورت فاکتوریل بر پایه طرح کاملاً تصادفی در سه تکرار انجام شد. در این آزمایش اثر ساده محرک‌های غیرزیستی براسینواستروئید (۰/۱، ۰/۵ و ۱ میلی‌مولار)، کاراگینان (۲۰۰، ۴۰۰ و ۶۰۰ میلی‌گرم بر لیتر)، اترل (۱۰۰، ۳۰۰ و ۶۰۰ میکرومولار) و شاهد (عدم تهییج با محرک) بر کارلای Hybrid Baby Doll به تعداد ۳۰ واحد آزمایشی در محیط کشت MS جامد محتوی ۳ درصد ساکارز مورد بررسی قرار گرفت. گیاهچه‌ها پس از طی دوره رشدی یک ماهه در مرحله ۴ تا ۶ برگی به گلخانه اتوماتیک دانشگاه زنجان انتقال یافت. تأثیر این ترکیبات بر خصوصیات ریخت‌شناختی (طول برگ، عرض برگ، سطح برگ، طول و قطر میوه، وزن تر و خشک میوه و عملکرد بوته) و فیتوشیمیایی (محتوای فنل کل، فلاونوئید کل، فعالیت آنتی‌اکسیدانی، رنگیزه‌های فتوسنتزی و متابولیت‌های ضددیابت موموردیسین و کارانتین) کارلا ارزیابی شد.

یافته‌ها: نتایج تجزیه واریانس داده‌ها بیانگر وجود اختلاف آماری معنی‌دار ($P<0/05$) بین تیمارهای آزمایش بر صفات ریخت‌شناسی و فیتوشیمیایی کارلا بود. در این مطالعه بیش‌ترین سطح برگ (۷۲/۵۲ سانتی‌متر)، کلروفیل کل (۲۸/۹ میلی‌گرم/ گرم بافت تازه) و فلاونوئید کل (۴/۹۹ میلی‌گرم کوئرستین/ گرم وزن خشک) از گیاهان تهییج‌شده با اترل سنجش شد. بیش‌ترین طول میوه (۳۵/۴ میلی‌متر)، کارتنوئید (۱/۸ میلی‌گرم/ گرم بافت تازه)، فنل کل (۳۵/۱۷ میلی‌گرم گالیک اسید/ گرم ماده خشک)، فعالیت آنتی‌اکسیدانی (۷۹/۳۱ درصد) و موموردیسین (۲۲/۶۴ میکروگرم/ گرم ماده خشک) از گیاهان تهییج شده با کاراگینان حاصل شد. بیش‌ترین وزن تر میوه (۲۳/۹۵ گرم)، عملکرد میوه (۱۳۰۵ گرم) و کارانتین (۵۸/۳۸ میکروگرم/ گرم ماده خشک) از گیاهان تهییج‌شده با براسینواستروئید حاصل شد.

* مسئول مکاتبه: sani@znu.ac.ir

نتیجه‌گیری: نتایج آزمایش ما بیانگر آن بود که تهییج با اترل منجر به افزایش شاخص‌های ریخت‌شناختی و فیتوشیمیایی مانند سطح برگ، طول میوه، کلروفیل b، کلروفیل کل و فلاونوئید گردید. درحالی‌که که بیش‌ترین میزان عملکرد و تجمع متابولیت کارانتین از تیمار تهییج با براسینواستروئید حاصل شد. محرک کاراگینان نیز بر میزان فنل کل، فعالیت آنتی‌اکسیدانی و متابولیت ثانویه موموردیسین بیش از سایر تیمارها مؤثر بود. استفاده از ترکیبات محرکی مانند اترل، کاراگینان و براسینواستروئید، یک راهبرد مهم جهت تولید محصول کارلا با عملکرد ریخت‌شناختی و فیتوشیمیایی بالا محسوب می‌شود.

واژه‌های کلیدی: ترکیبات محرک، ضددیابت، کارانتین، متابولیت ثانویه، موموردیسین

مقدمه

کارلا (*Momordica Charantia* L.) گیاهی بالارونده متعلق به تیره کدوئیان (Cucurbitaceae) می‌باشد که در مناطق گرمسیر و نیمه‌گرمسیر جهان پراکنش دارد (۱۳). این گیاه در مناطق گرمسیر آسیا، آمازون، آفریقا و آمریکا برای مصرف به‌عنوان سبزی یا دارو کشت می‌گردد (۱۰). مطالعات متعددی نشان داده که کارلا دارای اثرات مفید بسیاری برای سلامتی انسان مانند ضدسرطان، ضدویروس، ضدمیکروب، ضددرد، کاهش چربی خون و کاهش قند خون می‌باشد. این گیاه در بسیاری از کشورها مصارف دارویی دیگری مانند درمان کولیک روده، درمان موضعی زخم‌ها، درمان کرم و انگل در سیستم گوارشی دارد و میوه و بذور آن به‌طور سنتی به‌عنوان ضدویروس در درمان سرخک و هپاتیت، ضدایدز، ضدزخم، ضدالتهاب، ضدلوسمی و ضدتومور استفاده می‌شوند (۲۸). از نظر ارزش تغذیه‌ای نیز کارلا منبعی غنی از کربوهیدرات‌ها، پروتئین‌ها، عناصر معدنی نظیر آهن، کلسیم، ویتامین‌ها مخصوصا ویتامین ث و فیبر است (۱۳).

به گزارش پژوهشگران خواص دارویی گیاه کارلا به‌دلیل حضور ترکیباتی مانند تری‌ترپنوئیدها، ساپونین‌ها، فنول‌ها، فلاونوئیدها، تانن‌ها و سایر ترکیبات فنولی است (۳۰). کارانتین و موموردیسین دو ترکیب تری‌ترپنوئیدی موجود در این گیاه است که خصوصیات ضددیابتی قوی دارند (۱۶، ۱۸ و ۳۱). سیستم‌های مختلفی برای تولید ترکیبات فعال دارویی مهم به‌کار گرفته شده است. یکی از روش‌های تولید متابولیت‌های ثانویه بهره‌گیری از سیستم کشت بافت است (۱۶). استفاده از تکنیک‌های کشت بافت می‌تواند به ساخت متابولیت‌های ثانویه در زمانی کوتاه کمک نماید. افزون بر این، بر مشکلات کشت زراعی گیاهان دارویی، مانند وقوع غیرمنتظره شرایط آب و هوایی بد و بروز بیماری‌ها در گیاهان فایق آید. تاکنون کشت بافت گیاهی برای تولید ترکیبات ارزشمند داروئی مانند تاکسول، کامپتوسین، وینبلاستین و وین‌کریستین استفاده شده است (۱۳).

استفاده از محرک[1] در شرایط کشت بافت، یکی از راهبردهای مهم جهت تولید گیاهانی با عملکرد بالای ترکیبات فعال زیستی است (۲۱). محرک، مهیج یا انگیزنده به مولکول‌هایی با منشأ زیستی یا غیرزیستی گفته می‌شود (۲۴) که با تحریک سیگنال‌های سلولی و برهمکنش مولکولی میان گیرنده‌های گیاهی در سطح غشای سلولی یا سیتوپلاسمی و شناسایی آن‌ها، بیان ژن‌های مرتبط در مسیرهای بیوسنتزی را تحریک می‌نماید و موجب سنتز متابولیت‌های ثانویه در گیاهان یا محیط‌های کشت سلولی می‌گردد (۱۷). در سال‌های اخیر تهییج به‌طور گسترده‌ای به عنوان رویکردی برای شبیه‌سازی شرایط استرس در گیاهان استفاده شده که منجر به سنتز و تجمع بیشتر متابولیت‌های ثانویه گردیده‌است (۱۳).

1- Elicitor

چانگ و همکاران (۲۰۱٦) بیان نمودند که در کشت‌های تحریک‌شده کارلا توسط جاسمونیک اسید و سالسیلیک اسید مقادیر فنل کل، فلاونوئید کل، فعالیت ضدمیکروبی و ضدسرطانی در مقایسه با شاهد افزایش یافت (۱۰). در مطالعه دیگری پژوهشگران گزارش نمودند که تهییج کشت سوسپانسیون سلولی کارلا با نانوذرات نقره (۵ میلی‌گرم/ لیتر) منجر به افزایش محتوای فنل کل، فلاونوئید کل، فلاونول‌ها، هیدروکسی بنزوئیک و هیدروکسی سینامیک اسید نسبت به کشت شاهد گردید. متعاقباً با افزایش این متابولیت‌ها در کشت‌های تراریخت کارلا، فعالیت‌های فارماکولوژیکی آن مانند آنتی‌اکسیدانی، ضددیابتی، ضدباکتریایی، ضدقارچی و ضدسرطانی نیز افزایش یافت (۱۱). اگراوال و کمال (۲۰۱۳) اثر غلظت‌های مختلف اسید سالسیلیک را بر کشت درون‌شیشه‌ای کارلا در محیط MS مایع ارزیابی نمودند. نتایج آن‌ها بیانگر آن بود که تهییج محیط با اسیدسالسیلیک در غلظت ۰/۰۵ میلی‌مولار منجر بر انباشت متابولیت ثانویه دیوزجنین (۸/۹۸ میلی‌گرم/ گرم ماده خشک) در کالوس شش هفته‌ای گشت که در مقایسه با نمونه شاهد (۷/٦۱ میلی‌گرم/ گرم ماده خشک) بیش‌تر بود (۲).

مطالعه مشابهی اثر جاسمونیک اسید و آلومینیوم را بر افزایش آلکالوئیدهای تروپانی در کشت ریشه موئینه گیاه شیپور فرشته[1] آشکار ساخت (۲۷). سیواناندان و همکاران (۲۰۱٤) اثر پارامترهای متعددی مانند منابع کربن، سرعت هم‌زدن، مواد آلی و عصاره جلبک دریایی به‌عنوان محرک در سیستم کشت سوسپانسیون سلولی گیاه دارویی پنیرباد را ارزیابی نمودند و نتیجه گرفتند که بیش‌ترین وزن تر و خشک بیومس، بیش‌ترین میزان بیوسنتز ویتانولوئید، ویتافرین و ویتانون در کشت‌های تحریک‌شده توسط عصاره جلبک دریایی *Gracilaria edulis* در سطح ٤۰ درصد حاصل شد (۲۸).

کوهساری و همکاران (۲۰۲۰) اثر نوع ریزنمونه و هورمون‌های مختلف را بر میزان تولید زیست توده و تجمع متابولیت‌ها در گیاه دارویی کاسنی ارزیابی نمودند. نتایج پژوهش آن‌ها نشان داد که بیش‌ترین میزان فنل و فلاونوئید در کشت‌های محتوی بنزیل‌آدنین با غلظت ۰/۵ میلی‌گرم/ لیتر مشاهده گردید (۱۵).

به‌دلیل اهمیت متابولیت‌های ثانویه گیاه دارویی کارلا، در کنترل بیماری‌های مختلف مخصوصاً دیابت، استفاده از روش‌های نوین برای تولید اقتصادی این ترکیبات دارای اهمیت است. کشت درون‌شیشه‌ای یک روش مناسب و مهم برای تولید متابولیت‌های ثانویه با ارزش در اکثر گیاهان تحت شرایط کنترل‌شده فیزیکی و شیمیایی است. مطالعه حاضر برای نخستین بار اثر تحریک کشت بافت گیاه دارویی کارلا با اترل، کاراگینان و براسینواستروئید بر تولید بیومس، محتوای فنل کل، فلاونوئید کل، فعالیت آنتی‌اکسیدانی و متابولیت‌های ثانویه موموردیسین و کارانتین را ارزیابی نمود.

مواد و روش‌ها

بذور کارلا واریته Hybrid Baby Doll مورد استفاده در این آزمایش از کلکسیون گیاهان دارویی پژوهشکده کشاورزی دانشگاه زابل تهیه شد. پوسته بذور (جهت رفع خواب بذر) کاملاً جداسازی شد. بذور فاقد پوسته به مدت ۹۰ ثانیه با الکل ۷۰ درصد و پس از شستشو با آب مقطر استریل با هیپوکلریت سدیم ۵ درصد به مدت ۲ دقیقه ضدعفونی گردیدند. در پایان چند مرتبه با آب مقطر استریل شستشو شدند. اعمال تیمارهای آزمایش به محیط‌های کشت پس از اتوکلاوشدن (۱۲۱ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰ دقیقه) و انتقال شیشه‌های کشت به زیر هود لامینار و هم‌دما شدن شیشه‌ها با دمای اتاق و قبل از انجماد محیط کشت، توسط فیلتر سرسرنگی ۰/٤۵ میکرون صورت گرفت. سپس بذور ضدعفونی‌شده روی محیط کشت موراشیگ و اسکوگ[2] (MS) جامد

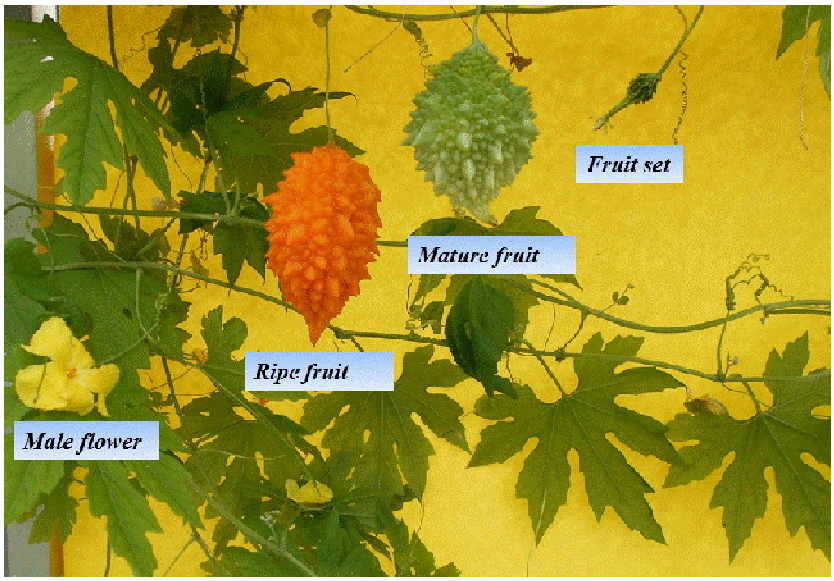
۱- Candida × Brugmansia هیبریدی متعلق به خانواده سولاناسه و تیره داتوره، با گل‌های شیپوری معطر

2- Murashige and Skoog medium

محتوی ۰/۶ درصد آگار و ۳ درصد ساکارز کشت گردید. شیشه‌های کشت‌شده به مدت ۲۴ ساعت در شرایط تاریکی و دمای ٤ درجه سانتی‌گراد یخچال نگهداری شدند (این شوک سرمایی و تاریکی خروج ریشه‌چه را تسریع نمود). سپس در قفسه‌های نوری با شرایط ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی و دمای معمولی اتاق (۲ ± ۲۵ درجه سانتی‌گراد) قرار گرفتند. پس از گذشت ۲ ± ۳۰ روز گیاهچه‌ها به گلدان‌های حاوی کوکوپیت: پرلیت: خاک باغچه (۱:۱:۱) استریل انتقال یافته و در گلخانه با شرایط ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی، دمای روزانه ۲ ± ۲۸ و دمای شبانه ۲ ± ۱۸، غلظت CO_2 ۳۰۰ پی‌پی‌ام و رطوبت نسبی ۶۰ درصد قرار گرفتند. عملیات داشت نظیر آبیاری و قیم‌زنی به صورت منظم صورت گرفت.

شکل ۱- گیاهچه‌های بذری کارلا پس از تهییج در شرایط کشت درون‌شیشه‌ای.

Fig. 1. Elicitated seedlings of bitter melon under in vitro condition.



شکل ۲- مراحل مختلف نمو میوه و گل نر کارلا رقم Hybrid baby doll در شرایط گلخانه.

Fig. 2. Different fruit maturity stages and male flower of bitter melon Hybrid baby doll under greenhouse condition.

ارزیابی صفات ریخت‌شناختی: صفات ریخت‌شناختی مانند تعداد گل نر، تعداد گل ماده، نسبت جنسی گل‌ها، تعداد میوه در هر برداشت، عملکرد تر میوه شمارش و محاسبه گردید. هم‌چنین اندازه‌گیری طول برگ، عرض برگ، طول و قطر میوه با کمک کولیس دیجیتال صورت گرفت (۵).

ارزیابی صفات فیتوشیمیایی

تعیین میزان رنگیزه‌های فتوسنتزی: برای تعیین مقادیر کلروفیل a، b و کلروفیل کل، مقدار ۰/۵ گرم از بافت سبز برگ‌های بالغ جوان به همراه ۱۰ میلی‌لیتر استون ۸۰ درصد ساییده شد. سپس نمونه‌ها به‌مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ٦۰۰۰ دور سانتریفوژ شدند و پس از آن به‌طور جداگانه مقادیر کلروفیل a در طیف جذبی ٦٦۳ و کلروفیل b در ٦٤٥ نانومتر با دستگاه اسپکتروفتومتر مدل Unic, UV, 2100 قرائت شد. جهت تنظیم دستگاه، استون ۸۰ درصد مورد استفاده قرار گرفت. غلظت رنگیزه‌ها با استفاده از روابط موجود و بر حسب میلی‌گرم بر گرم وزن تر نمونه محاسبه شد (١٤). هم‌چنین جهت سنجش کاروتنوئید کل از ۰/۵ گرم گوشت میوه کاملاً رسیده (در مرحله تغییر رنگ کامل میوه از سبز به نارنجی) و طول موج ٤٧۰ نانومتر استفاده گردید (١٤ و ١٩).

تهیه عصاره هیدروالکلی جهت سنجش فنل کل، فلاونوئید کل و فعالیت آنتی‌اکسیدان: میوه‌ها در مرحله بلوغ سبز برداشت شده، به قطعات کوچک خرد شده و به مدت ۷۲ ساعت در آون با دمای ٤٥ درجه سانتی‌گراد خشک گردید. میوه خشک شده به کمک آسیاب برقی پودر گردید. عصاره متانولی از پودر میوه با روش ماسراسیون سرد و با نسبت ۱۰:۱ (V/W) ماده خشک گیاهی و حلال متانول ۷۰ درصد تهیه گردید. نمونه‌ها به مدت ٤٨ ساعت درون حلال و روی شیکر با سرعت ۱۲۰ دور در دقیقه در دمای اتاق خیسانده شد. از این عصاره جهت استفاده در سنجش میزان فنل کل، فلاونوئید کل و فعالیت آنتی‌اکسیدانی استفاده گردید (۷، ۱۲ و ۲۰).

سنجش میزان فنل کل: مقادیر ترکیب‌های فنلی در عصاره متانولی میوه به روش معرف فولین سیوکالتو سنجش شد (١٤ و ١٨). طبق این روش مقدار ۲۰۰ میکرولیتر از عصاره متانولی، در لوله‌های آزمایش ریخته شد. ٤۰۰ میکرولیتر معرف فولین سیوکالتو (رقیق شده با آب مقطر به نسبت ۱ به ۱۰) و ٤۰۰ میکرولیتر کربنات سدیم ۷ درصد به مخلوط فوق اضافه گردید. بعد از ۳۰ دقیقه نگهداری در دمای محیط، جذب نوری آن توسط اسپکتروفتومتر مدل Unic, UV, 2100 در طول موج ۷٦٥ نانومتر قرائت شد. داده‌ها معادل میلی‌گرم گالیک اسید بر گرم وزن خشک گیاه (میلی‌گرم اکی‌والان گالیک‌اسید/ گرم وزن خشک) بیان شد.

سنجش فلاونوئید کل: محتوای فلاونوئیدی عصاره متانولی میوه کارلا به روش رنگ‌سنجی آلومینیوم کلرید اندازه‌گیری شد. در این روش به ۵۰۰ میکرولیتر از عصاره متانولی، ۱۰۰ میکرولیتر محلول آلومینیوم کلرید (۱۰ درصد)، ۱۰۰ میکرولیتر محلول استات پتاسیم یک مولار و ۲/۸ میلی‌لیتر آب مقطر اضافه گردید. نمونه‌ها به مدت ٤۰ دقیقه در دمای اتاق نگهداری شده و سپس جذب مخلوط واکنش در طول موج ٤١٥ نانومتر توسط اسپکتوفتومتر مدل Unic, UV, 2100 اندازه‌گیری شد. میزان فلاونوئید معادل میلی‌گرم کوئرستین در هر گرم وزن خشک گیاه محاسبه گردید (۹).

سنجش فعالیت آنتی‌اکسیدان: سنجش فعالیت آنتی‌اکسیدانی به روش مهار رادیکال‌های آزاد DPPH[1] صورت گرفت (٦). ۲۵۰ میکرولیتر از عصاره متانولی میوه کارلا با ۷۵۰ میکرولیتر از محلول DPPH (دو میلی‌گرم DPPH[2] در ۵۰ میلی‌لیتر متانول

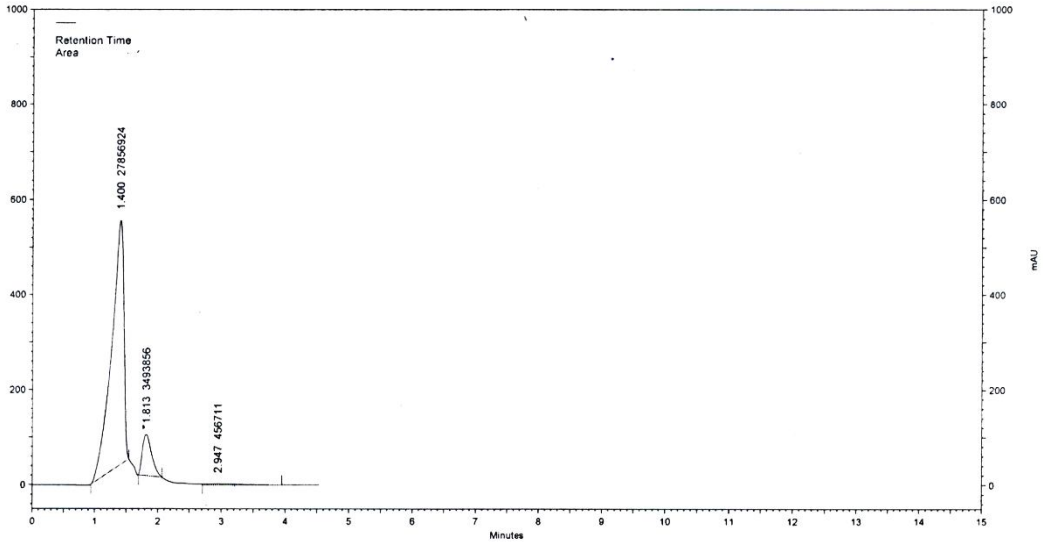
1- 2, 2- diphenyl-1-picryl-hydrazyl
2- C18H12N5O6, Merck, Germany, NO. 300267

حل شد) مخلوط گردید. میزان جذب آن در طول موج ۵۱۷ نانومتر با دستگاه اسپکتوفتومتر مدل Unic, UV, 2100 قرائت شد.

اندازه‌گیری متابولیت‌های ثانویه به کمک کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC):

عصاره‌گیری جهت سنجش مومووردیسین: جهت استخراج عصاره کارلا از روش ماسراسیون سرد استفاده گردید. بدین منظور ۰/۵ گرم از پودر میوه خشک و آسیاب شده کارلا در ۱۰ میلی‌لیتر اتانول ۸۰ درصد به مدت ۳ ساعت روی شیکر قرار گرفت. سپس به مدت ۱۵ دقیقه، با سرعت ۲۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ گردید (۲۲).

سنجش میزان مومووردیسین: ابتدا یک میلی‌لیتر دی متیل سولفوکساید[1] (DMSO) با ۹ میلی‌لیتر متانول خالص مخصوص اچ پی ال سی به حجم ۱۰ میلی‌لیتر رسید. سپس ۱۰۰ میکرولیتر از عصاره اتانولی میوه با ۹۰۰ میکرولیتر از محلول دی متیل سولفوکساید: متانول مخلوط گردید. در نهایت ۲۰ میکرولیتر از محلول آماده شده فوق به دستگاه کروماتوگرافی مایع (مرک – هیتاچی، مدل 7100 L) تزریق گردید. مشخصات دستگاه عبارت از: ستون تشخیصی C-18 به طول ۱۵۰ میلی‌متر و قطر ٤/٦ میلی‌متر، پمپ لاکروم، قطر ذرات ۵ میکرومتر بود. در سنجش مومووردیسین از فاز متحرک متانول- آب دیونایز (۷۰: ۳۰)، سرعت جریان یک میلی‌لیتر/ دقیقه و طول موج ۲٤۳ نانومتر استفاده گردید. محتوای مومووردیسین بر اساس زمان بازداری پیک استاندارد (شکل ۱)، تعیین هویت شده و مقدار آن بر اساس فرمول منحنی استاندارد تعیین گردید. مقادیر ۰، ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میکرولیتر از استوک ۱۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر مومووردیسین با محلول DMSO- متانول (۹:۱) به حجم یک میلی‌لیتر رسید و به عنوان استاندارد به دستگاه کروماتوگرافی مایع تزریق گردید و با توجه به فرمول منحنی کالیبراسیون ($y=2E+0.7x - 2E+0.7$, $R^2=0.9349$) مقادیر حقیقی مومووردیسین در تیمارهای مختلف محاسبه گردید (۱۹، ۲۲، ۳۳).

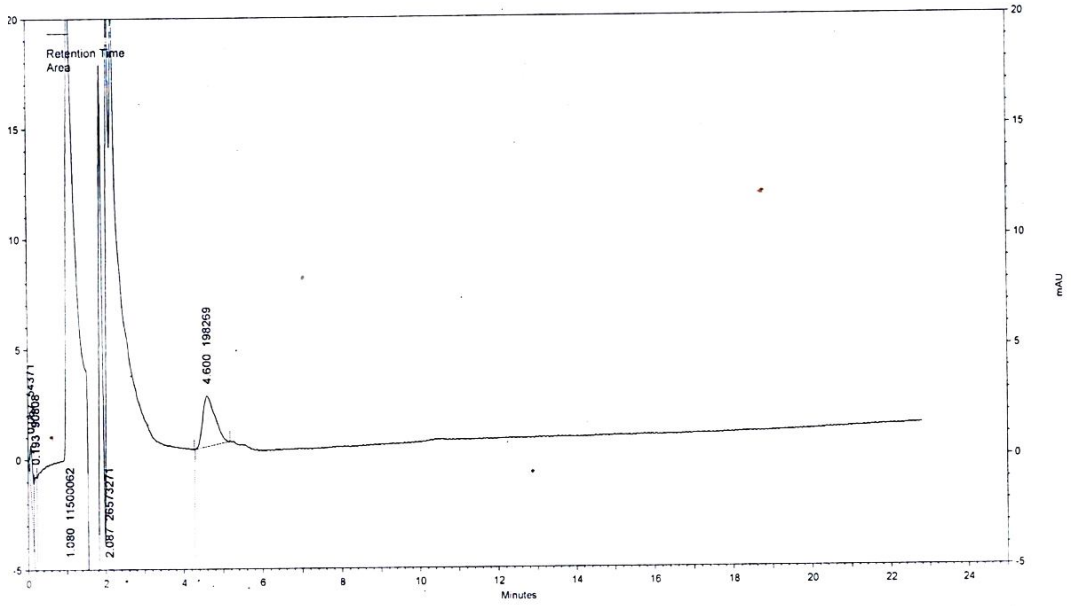


شکل ۳- کروماتوگرام استاندارد مومووردیسین در HPLC.

Fig. 3. The chromatogram of standard of Momordicin in HPLC.

1- Dimethyl sulfoxide

سنجش میزان کارانتین: برای اندازه‌گیری میزان کارانتین، ۱۰۰ میکرولیتر از عصاره اتانولی میوه به دستگاه HPLC تزریق گردید. در این سنجش از سرعت جریان یک میلی‌لیتر/ دقیقه و طول موج ۲۱۰ نانومتر استفاده گردید. محتوای کارانتین بر اساس زمان بازداری پیک استاندارد (شکل ۲)، تعیین هویت شد. ابتدا سطوح مختلف کارانتین (۰، ۲۵۰، ۵۰۰ و ۱۰۰۰ میلی‌گرم/ لیتر) به دستگاه تزریق شد و با توجه به سطوح زیر پیک این مقادیر و به کمک نرم‌افزار اکسل منحنی استاندارد ترسیم گردید. مقادیر کارانتین موجود در هر نمونه به کمک فرمول منحنی استاندارد ($y = 99135x - 97629$, $R^2 = 0.9993$) محاسبه گردید (۲۹).



شکل ٤- کروماتوگرام استاندارد کارانتین در HPLC.

Fig. 4. The chromatogram of standard of Charantin in HPLC.

داده‌ها توسط نرم‌افزار آماری SAS مورد تجزیه تحلیل قرار گرفت و برای آزمون مقایسه میانگین‌ها از آزمون چند دامنه‌ای دانکن با سطح احتمال ۵ درصد استفاده شد. تمامی نمودارها به کمک نرم‌افزار اکسل ترسیم شد.

نتایج و بحث

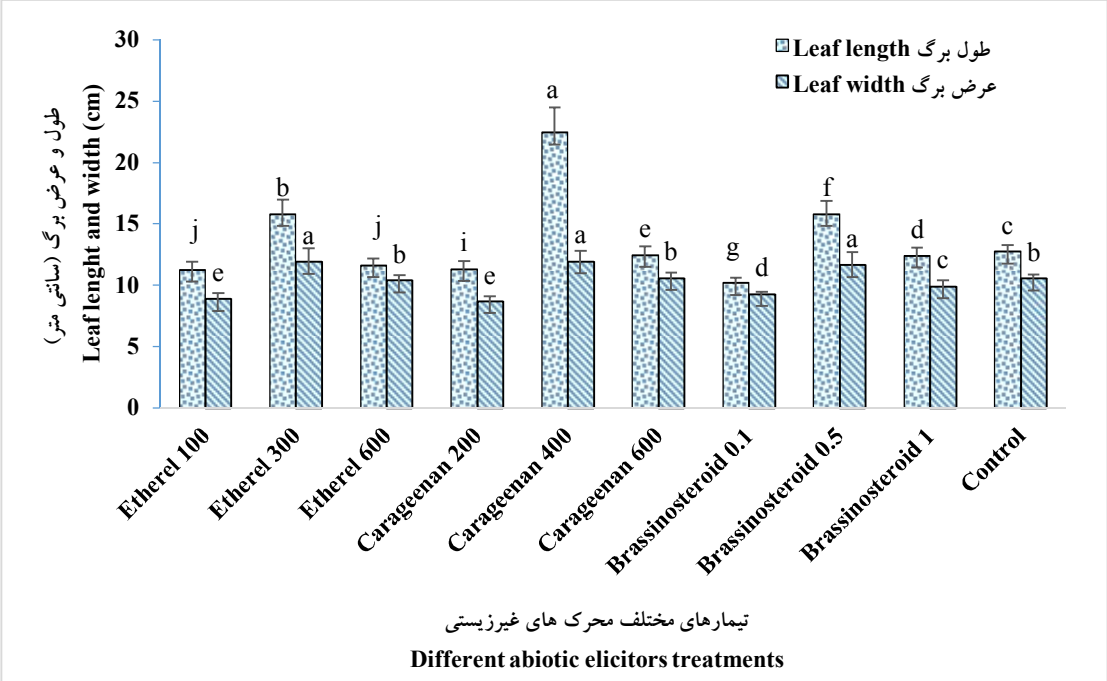
نتایج تجزیه واریانس داده‌ها بیانگر آن بود که اثر متقابل انواع محرک غیرزیستی در سطوح متفاوت بر میزان شاخص‌های ریخت‌شناختی مورد ارزیابی در این آزمایش به‌جز پارامتر قطر میوه در سطح احتمال ۵ درصد ($P<۰/۰۵$) معنی‌دار بودند (جدول ۱).

جدول ۱- تجزیه واریانس صفات ریخت‌شناختی کارلا رقم Hybrid baby doll تحت تیمارهای مختلف محرک غیرزیستی.

Table 1. Analysis of variance of morphological traits of bitter melon, Hybrid baby doll cultivar, under different abiotic elicitors treatments.

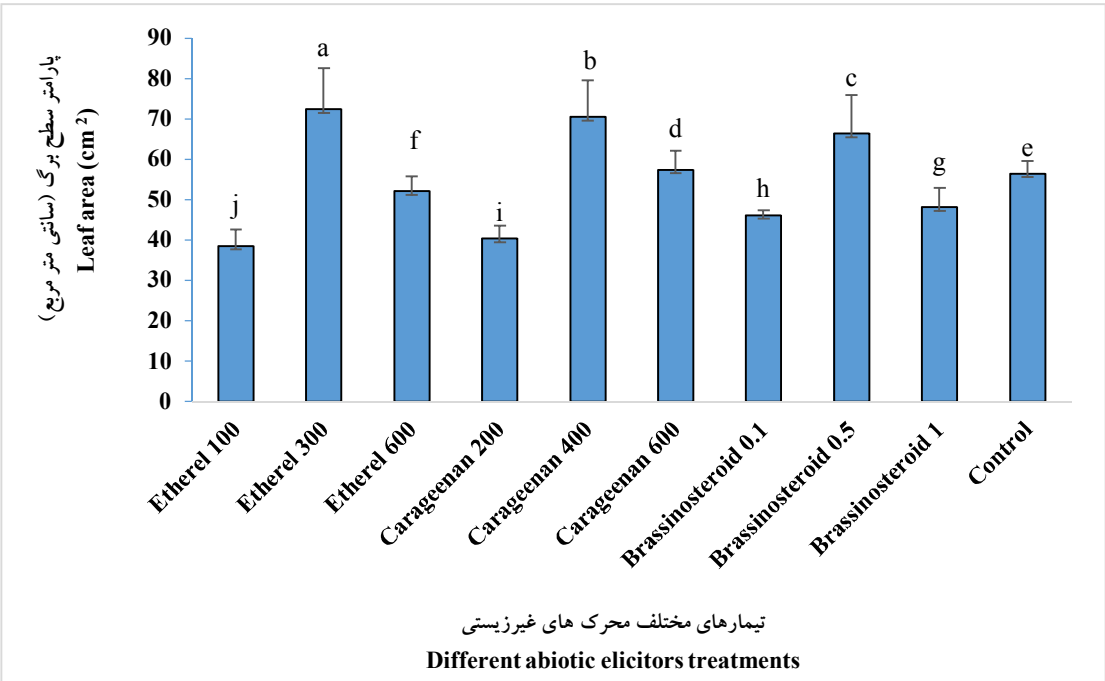
منابع تغییرات S. O. V	درجه آزادی DF	طول برگ Leaf leanght	عرض برگ Leaf wide	سطح برگ Leaf area	قطر میوه Friut diameter	طول میوه Friut lenght	وزن میوه Friut weight	عملکرد میوه Friut yeild
محرک غیرزیستی Abiotic elicitor	9	24.89*	12.87*	1302.13*	26.88ns	26.88**	8.02**	20356.94ns
غلظت محرک Concentration	2	8.26**	15.60*	1107.48*	11.31ns	11.31ns	3.37ns	8569.56ns
اثر متقابل نوع محرک × غلظت Interaction of elicitor × concentration	18	27.71*	13.25*	1320.56*	70.06ns	70.06*	20.92*	53056.96*
خطا Error	-	1.86	0.13	0.28	22.86	7.75	2.46	12700.3
ضریب تغییرات C.V.	-	12.16	3.46	0.97	9.52	7.41	6.98	10.72

نتایج تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که محرک‌های مختلف غیرزیستی و غلظت‌های مختلف محلول‌پاشی آن‌ها بر عوامل طول، عرض و سطح برگ در سطح احتمال ۵ درصد (P<۰/۰۵) معنی‌دار بودند (جدول ۱). به طوری که بالاترین طول (۲۲/٤٦ سانتی‌متر) و عرض برگ (۱۱/۹۷ سانتی‌متر) در تیمار کاراگینان با غلظت ٤۰۰ میلی‌گرم بر لیتر مشاهده گردید (شکل ۵). در حالی‌که بیش‌ترین توسعه سطح برگ (۷۲/۵۲ سانتی‌مترمربع) در تیمار اترل با غلظت ۳۰۰ میکرومولار بر لیتر اندازه‌گیری شد (شکل ٦). شفیک و همکاران (۲۰۱٦) اثر محرک جیبرلین و اترل را بر خصوصیات ریخت‌شناختی کدو تابستانه (*Cucurbita pepo* L.) ارزیابی نمودند. در مطالعه آن‌ها هر دو تنظیم‌کننده رشد نسبت به تیمار شاهد گیاهان بلندتری تولید نمودند که تعداد بیش‌تری برگ و شاخه جانبی در بوته را داشتند. هم‌چنین بیش‌ترین وزن تر و خشک برگ در تیمارهای جیبرلین (٦۰ میلی‌گرم در لیتر) و اترل (۱۵۰ میلی‌گرم در لیتر) به‌دست آمد. در این مطالعه بیان نمود که افزایش صفات رشدی در کدوی تابستانه تحت‌تأثیر این تنظیم‌کننده‌های رشد، با افزایش انعطاف‌پذیری دیواره سلولی مرتبط است. به‌طوری‌که از طریق افزایش هیدرولیز نشاسته به قندهای ساده، میزان جذب آب از فضای بین سلولی افزایش یافته و جذب آب به درون سلول منجر به کشیدگی آن می‌گردد (۲٦).



شکل ۵- تأثیر محرک‌های غیرزیستی مختلف در غلظت‌های متفاوت بر طول و عرض برگ کارلا رقم Hybrid baby doll.

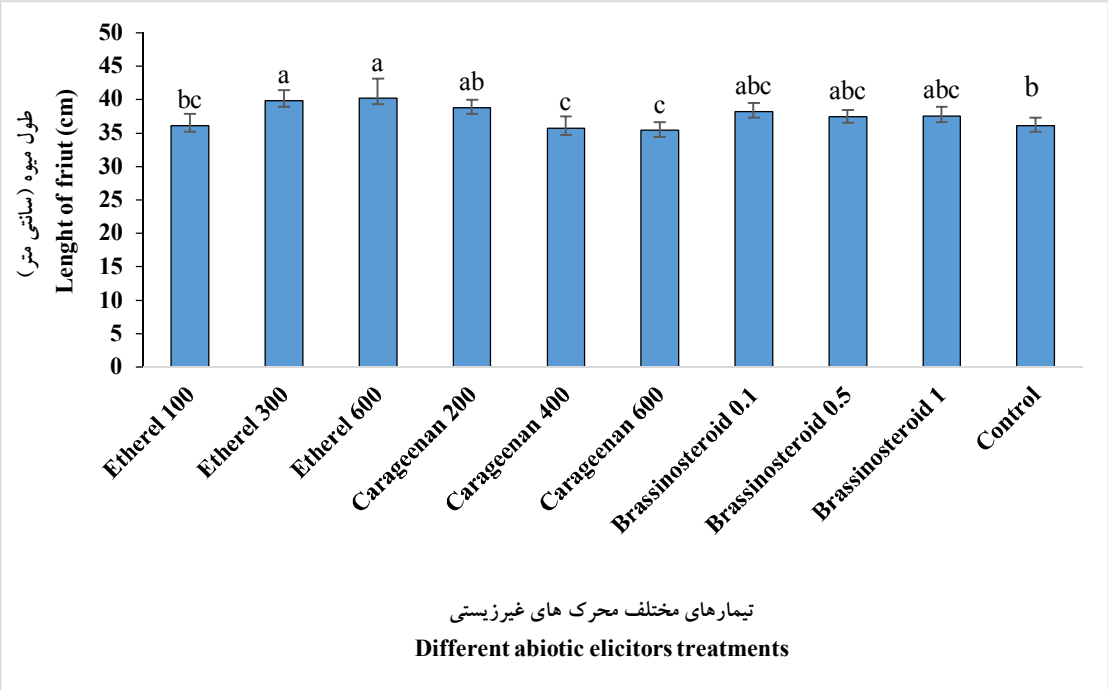
Fig. 5. Effects of different abiotic elicitors in various concentrations on leaf length and width of bitter melon Hybrid baby doll cultivar.



شکل ٦- تأثیر محرک‌های غیرزیستی مختلف در غلظت‌های متفاوت بر سطح برگ کارلا رقم Hybrid baby doll.

Fig. 6. Effects of different abiotic elicitors in various concentrations on leaf area of bitter melon Hybrid baby doll cultivar.

در این آزمایش، اگرچه تأثیر محرک‌های غیرزیستی مختلف با غلظت‌های متفاوت بر پارامتر قطر میوه معنی‌دار نبود (جدول ۱). اما بیش‌ترین قطر میوه (۵۲/۸۸ میلی‌متر) در تیمار محلول‌پاشی با اترل در غلظت ۶۰۰ میکرومولار بر لیتر مشاهده گردید. تیمارهای محرک درآزمایش ما بر طول میوه کارلا رقم Hybrid baby doll مؤثر بودند (جدول ۱). به‌طوری‌که بیش‌ترین طول میوه (۴۰/۲۶ میلی‌متر) از تیمار تهییج توسط اترل در سطح ۶۰۰ میکرومولار حاصل شد. کم‌ترین میزان طول میوه (۳۵/۴ میلی‌متر) در تیمار تهییج توسط کاراگینان ۶۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر سنجش گردید (شکل ۷). در مطالعه ساندرا و همکاران (۲۰۱۵) بیش‌ترین طول میوه (۱۵/۷۱ سانتی‌متر) در محلول‌پاشی بوته‌های کارلا با اترل در غلظت ۵۰ پی‌پی‌ام حاصل شد (۲۵). نتایج مشابهی توسط سایر پژوهشگران ارائه شد که با محلول‌پاشی اسید ایندول استیک و اسید جیبرلیک ، طول میوه کارلا افزایش یافته است (۳). پژوهشگران بیان نمودند که کاربرد اترل با غلظت ۱۰۰ پی‌پی‌ام، دو روز پس از گرده‌افشانی در گوجه‌فرنگی منجر به افزایش طول میوه، وزن میوه و عملکرد بوته گردید. به عبارت دیگر اتیلن فرآیند انتقال از تقسیم سلولی به طویل شدن سلول را تنظیم می‌نماید. افزون بر این تقسیم سلولی فقط زمانی خاتمه می‌یابد که اتیلن درون‌زا، به پایین‌ترین سطح خود کاهش یافته باشد و اجازه می‌دهد که بزرگ شدن سلولی نسبت به تقسیم سلولی تسلط یابد. نتایج مشابهی در کاربرد زودهنگام آمینواکسی استیک اسید[1] (AOA) مشاهده شد (۴).

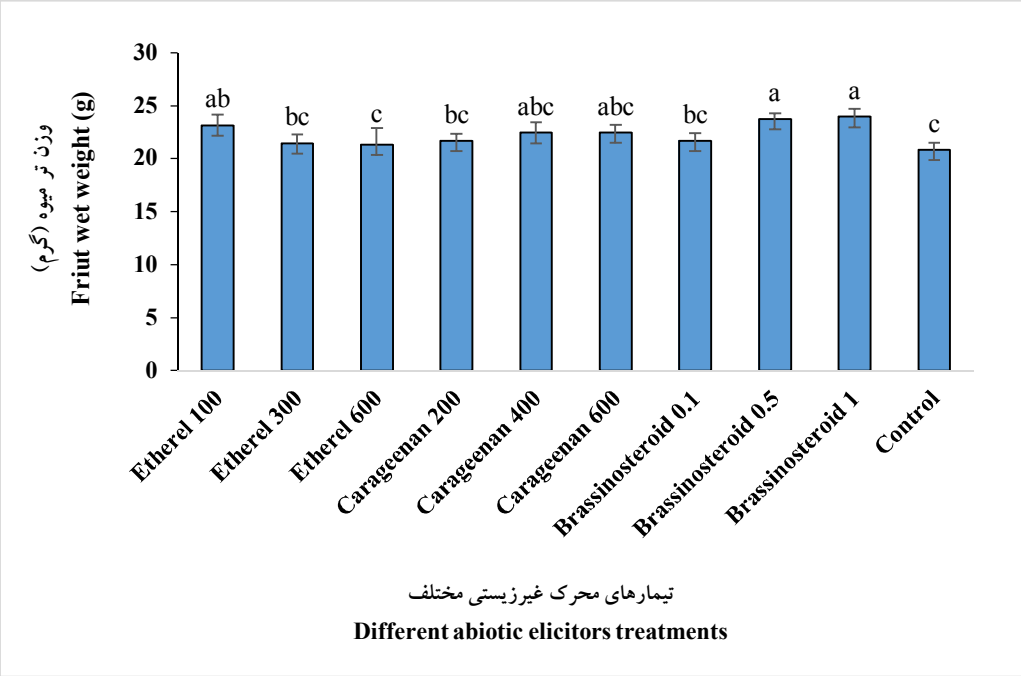


شکل ۷- تأثیر محرک‌های غیرزیستی در غلظت‌های مختلف بر طول میوه کارلا رقم Hybrid baby doll.

Fig. 7. Effects of different abiotic elicitors in various concentrations on fruit length of bitter melon Hybrid baby doll cultivar.

1- Aminooxyacetic acid

نتایج تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که محرک‌های مختلف در غلظت‌های متفاوت بر وزن تر میوه کارلا اثر معنی‌داری (P<۰/۰۵) داشت (جدول ۱). به‌طوری‌که بالاترین میزان وزن تر (۲۳/۹۵ گرم) در تیمار براسینواستروئید با غلظت ۱ میلی‌مولار مشاهده گردید و کم‌ترین مقدار آن (۲۰/۸٤ گرم) در نمونه شاهد سنجش گردید (شکل ۸).



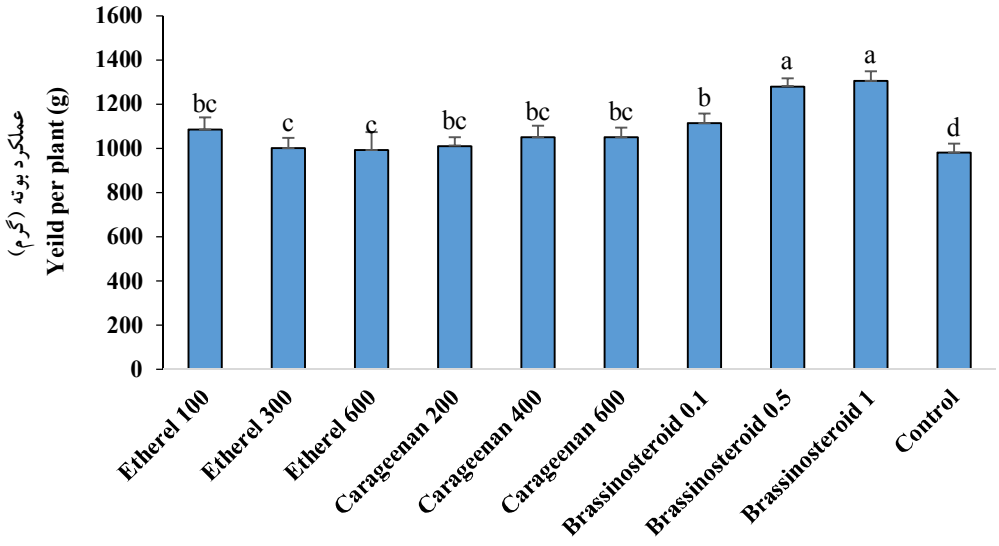
شکل ۸- تأثیر محرک‌های غیرزیستی در غلظت‌های مختلف بر وزن تر میوه کارلا رقم Hybrid baby doll.

Fig. 8. Effects of different abiotic elicitors in various concentrations on fruit weight of bitter melon Hybrid baby doll cultivar.

مشابه وزن تر میوه، عملکرد میوه در بوته نیز تحت تأثیر اثر متقابل محرک‌های مختلف غیرزیستی و غلظت آن‌ها قرار گرفت (جدول ۱). به‌طوری‌که بالاترین عملکرد میوه (۱۳۰۵ گرم) در بوته تحت تیمار براسینواستروئید با غلظت ۱ میلی‌مولار و کم‌ترین عملکرد در نمونه شاهد (۹۸۰ گرم) مشاهده گردید؛ اگرچه در سطوح مختلف هر تیمار اختلاف آماری معنی‌دار وجود نداشت (شکل ۹). براسینواستروئیدها برای بسیاری از فرآیندهای بیولوژیکی گیاهان ضروری هستند؛ با این حال، اطلاعات کمی در مورد نقش آن‌ها در نمو زودهنگام میوه در دسترس است. برای پرداختن به این موضوع، گروهی از پژوهشگران اثر کاربرد خارجی اپی‌براسینواستروئید[1] (EBR) و براسینوزول[2] (Brz: نوعی بازدارنده‌های سنتز براسینواستروئید) را بر نمو زودهنگام میوه، تقسیم سلولی و بیان ژن‌های سیکلین[3] و کینازهای وابسته به سیکلین[4] (CDKs) در دو کولتیوار خیار با ظرفیت پارتنوکارپی متفاوت بررسی نمودند. کاربرد خارجی براسینواستروئیدها باعث القاء رشد پارتنوکارپی همراه با تقسیم سلولی فعال در ارقام Jinchun No. 4 – ارقام که فاقد ظرفیت پارتنوکارپی است- گردید. درحالی‌که تیمار Brz (بازدارنده سنتز براسینواستروئید) باعث

1- 24-epibrassinolide
2- Brassinazole
3- Cyclin
4- Cyclin-dependent kinases

مهار نشست میوه[1] و متعاقباً رشد میوه در واریته Jinchun No. 2 – ارقام با ظرفیت پارتنوکارپی طبیعی– گردید. از طرفی، اثر بازدارندگی براسینوزول توسط کاربرد EBR نجات یافت. نتایج آن‌ها قویاً تأیید می‌کند که براسینواستروئیدها نقش مهمی در نمو میوه خیار دارد (۲۳). در مطالعه دیگری اثر کاربرد کود آلی و غیرآلی بر صفات ریخت‌شناختی کارلا ارزیابی شد. نتایج آزمایش آن‌ها نشان داد که بیش‌ترین عملکرد میوه کارلا (۱۵/۷۳ کیلوگرم/ کرت) از کاربرد توأم کود آلی و غیرآلی به‌دست آمد و کم‌ترین عملکرد میوه (۵/۰۶ کیلوگرم/ کرت) از تیمار شاهد حاصل شد (۱). پژوهشگران بیان نمودند که محلول‌پاشی بوته‌ها با تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی اسید نفتالین استیک (۱۰۰ پی‌پی‌ام)، اسید ایندول استیک (۱۰۰ پی‌پی‌ام) و مالیک هیدرازید (۵۰ پی‌پی‌ام) باعث بازدارندگی در ظهور گل‌های نر و افزایش تعداد گل ماده در خیار شد. متعاقباً باعث افزایش درصد فروت‌ست و عملکرد در هکتار گردید (۸). در مطالعه ساندرا و همکاران (۲۰۱۵) جیبرلیک اسید (۵۰ پی‌پی‌ام) منجر به افزایش فروت ست (۱۲/٤–۱۲) و وزن میوه (۹۰/٤–۱۰۹/۹ گرم) گردید و پس از آن محلول‌پاشی اترل با غلظت ۵۰ پی‌پی‌ام بهترین اثر را روی تعداد میوه در بوته و وزن تر میوه (۱۱/۳–۱۱ میوه/ بوته و ۹۴/۹–۹۳/۱ گرم) داشت (۲۵). البته رقم Hybrid baby doll که مطالعه حاضر روی آن انجام شد جزو ارقام تیپ کوچک و مثلثی کارلاست به همین دلیل پارامترهای ریخت شناختی میوه نسبت به مطالعات مشابه در سایر ارقام هندی یا پاکستانی مقادیر کم‌تری را از خود نشان داد. افزایش عملکرد میوه در کدوئیان به‌واسطه محلول‌پاشی با تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی ظاهراً به‌دلیل افزایش سوخت‌وساز کربوهیدرات و انباشت کربوهیدرات‌هاست (۲۶).



شکل ۹- تأثیر محرک‌های غیرزیستی در غلظت‌های مختلف بر عملکرد میوه در بوته کارلا رقم Hybrid baby doll.

Fig. 9. Effects of different abiotic elicitors in various concentrations on fruit yield per plant of bitter melon.

1- Fruit set

نتایج تجزیه واریانس داده‌ها بیانگر آن بود که اثر متقابل نوع محرک و غلظت محرک بر صفات فیتوشیمیایی مورد ارزیابی در این آزمایش شامل: کلروفیل a، کلروفیل b، کارتنوئید، محتوای فنل کل، محتوای فلاونوئید کل، فعالیت آنتی‌اکسیدانی و میزان متابولیت‌های ثانویه موموردیسین و کارانتین در سطح احتمال ۵ درصد (P<۰/۰۵) معنی‌دار بود (جدول ۲).

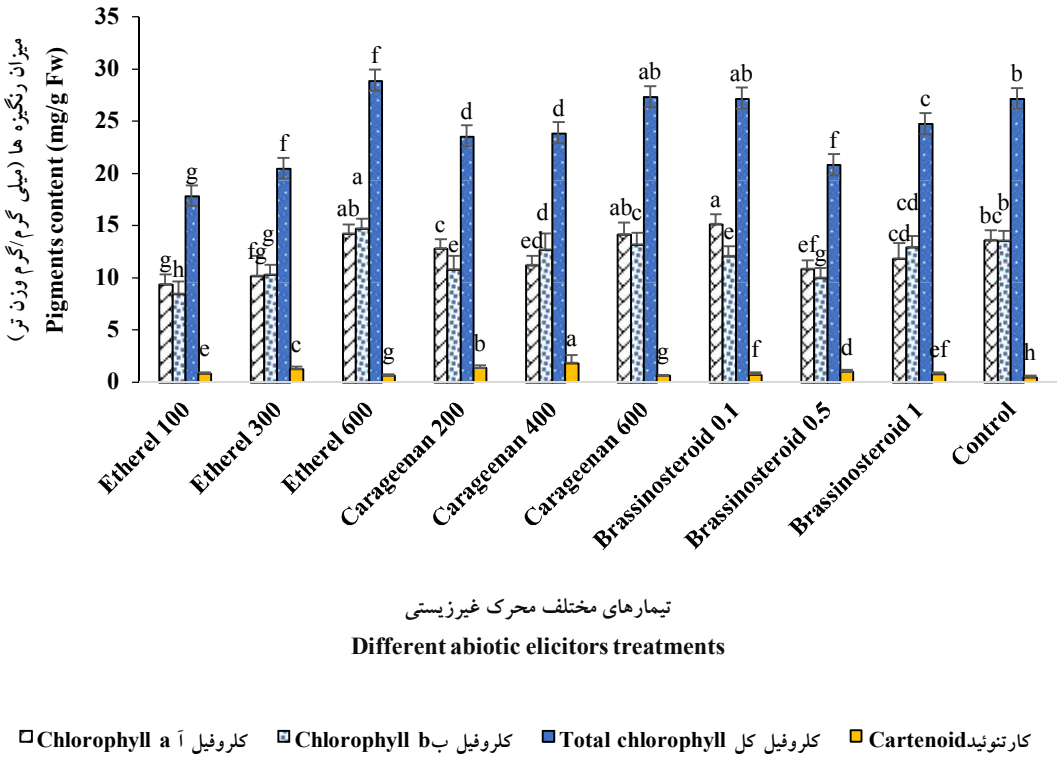
جدول ۲- تجزیه واریانس صفات فیتوشیمیایی کارلا رقم Hybrid baby doll تحت تیمارهای مختلف محرک‌های غیرزیستی.

Table 2. Analysis of variance of phytochemical traits of bitter melon, hybrid baby doll cultivar, under different abiotic elicitors treatments.

منابع تغییرات S.O.V	درجه آزادی DF	کلروفیل a Cholorophyll a	کلروفیل b Cholorophyll b	کاروتنوئید Cartenoid	فنل کل Total phenol	فلاونوئید کل Total flavonoid	فعالیت آنتی‌اکسیدانی Antioxidant activity	موموردیسین Momordicin	کارانتین Charantine
محرک غیرزیستی Abiotic elicitor	9	33.55*	33.19*	1.52*	355.63*	9.48*	1436.56*	164.88*	360.85*
غلظت محرک Concentration of elicitor	2	62.58*	84.65*	4.47*	83.51*	0.51ns	358.97*	148.86*	587.64*
اثر متقابل نوع محرک × غلظت Interaction of elicitor × concentration	18	39.50*	27.73*	2.78*	791.55*	5.27*	218.3*	279.89*	391.83*
خطا Error	-	0.93	0.13	0.01	7.61	0.5	2.67	14.42	7.85
ضریب تغییرات C.V(٪) .	-	7.85	3.14	10.83	11.14	21.61	2.3	22.5	5.56

در مطالعه ما بیش‌ترین میزان کلروفیل a (۱۵/۱۱ میلی‌گرم/ گرم بافت تازه برگ) از تیمار تهییج توسط براسینواستروئید با غلظت ۰/۱ میلی‌مولار حاصل شد و کم‌ترین میزان آن (۹/۳۷ میلی‌گرم/ گرم بافت تازه برگ) از تیمار تهییج توسط اترل ۱۰۰ میکرومولار سنجش گردید (شکل ۱۰). هم‌چنین بیش‌ترین میزان کلروفیل b (۱٤/۷۱ میلی‌گرم/ گرم بافت تازه برگ) از تیمار تهییج توسط اترل ٦۰۰ میکرومولار به‌دست آمد. درحالی‌که کم‌ترین میزان از همان محرک اما در پایین‌ترین سطح غلظت (۱۰۰ میکرومولار) حاصل شد که بیانگر تأثیر غلظت در تجمع رنگیزه‌های فتوسنتزی در این آزمایش بود (شکل ۱۰). در این آزمایش بیش‌ترین میزان کلروفیل کل (۲۸/۹ میلی‌گرم/ گرم وزن تازه بافت) از تیمار تهییج توسط اترل با غلظت ٦۰۰ میکرومولار حاصل شد؛ در حالی‌که کم‌ترین میزان کلروفیل کل (۱۷/۸۳ میلی‌گرم/ گرم وزن تاره بافت) از تیمار تهییج توسط اترل با غلظت ۱۰۰ میکرومولار حاصل شد که خود گواه اختلاف معنی‌دار اثر غلظت محرک بر میزان تجمع کلروفیل در بافت برگ بود (شکل ۱۰). در آزمایش حاضر میزان رنگیزه کاروتنوئید در بافت گوشت میوه کارلا تحت تیمارهای مختلف محرک ارزیابی شد و نتایج بیانگر

اختلاف آماری معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد (P<۰/۰۵) بر میزان این رنگیزه بود. به‌طوری‌که بیش‌ترین میزان کارتنوئید (۱/۸ میلی‌گرم/ گرم بافت تازه) در تیمار تهییج بوته‌های کارلا توسط کاراگینان با غلظت ۴۰۰ میلی‌گرم/ لیتر بود؛ درحالی‌که کم‌ترین میزان (۰/۴۶ میلی‌گرم/گرم بافت تازه) در تیمار کنترل (عدم تهییج) به‌دست آمد (شکل ۱۰).

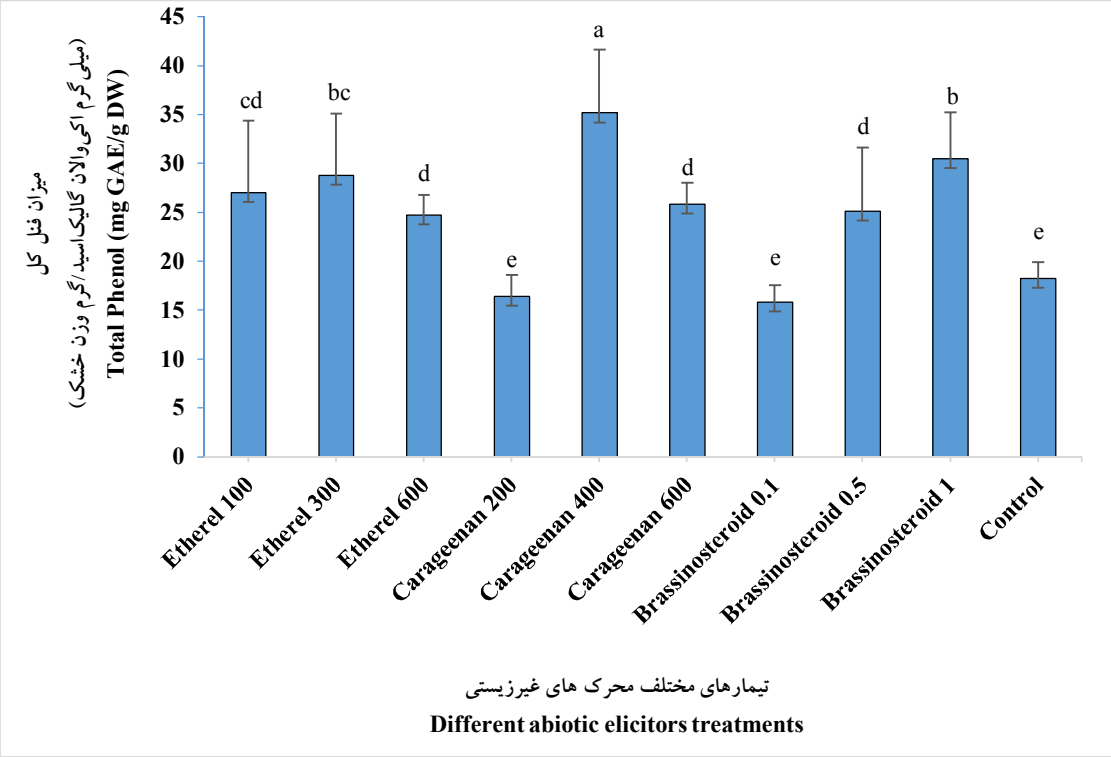


شکل ۱۰- تأثیر محرک‌های غیرزیستی در غلظت‌های مختلف بر میزان رنگیزه‌ها در کارلا رقم Hybrid baby doll.

Fig. 10. Effects of different abiotic elicitors in various concentrations on pigments content of bitter melon.

نتایج تجزیه واریانس داده‌ها بیانگر وجود اختلاف آماری معنی‌دار (P<۰/۰۵) بین تیمارهای مختلف محرک و سطوح آن بر محتوای فنل کل در عصاره هیدروالکلی میوه کارلا رقم hybrid baby doll بود (جدول ۲). در آزمایش حاضر بیش‌ترین میزان فنل کل (۳۵/۱۷ معادل میلی‌گرم گالیک اسید/ گرم وزن خشک) در تیمار تهییج توسط کاراگینان با غلظت ۴۰۰ میلی‌گرم/ میلی‌لیتر بود؛ درحالی‌که کم‌ترین غلظت (۱۵/۸۳ معادل میلی‌گرم گالیک اسید/ گرم وزن خشک) در تیمار تهییج توسط براسینواستروئید در غلظت ۰/۱ میلی‌مولار به‌دست آمد (شکل ۱۱). چانگ و همکاران (۲۰۱۶) به نقش مثبت تهییج کشت ریشه موئینه کارلا توسط سالسیلیک اسید و جاسمونیک اسید اشاره نمودند. در مطالعه آن‌ها میزان فنل کل در تیمار تهییج توسط جاسمونیک اسید ۴/۱ (میلی‌گرم/ گرم) و در تیمار تهییج توسط اسیدسالسیلیک ۳/۷ (میلی‌گرم/گرم) سنجش گردید. مهم‌ترین ترکیبات فنولی شناسایی شده از کشت ریشه موئینه کارلا در

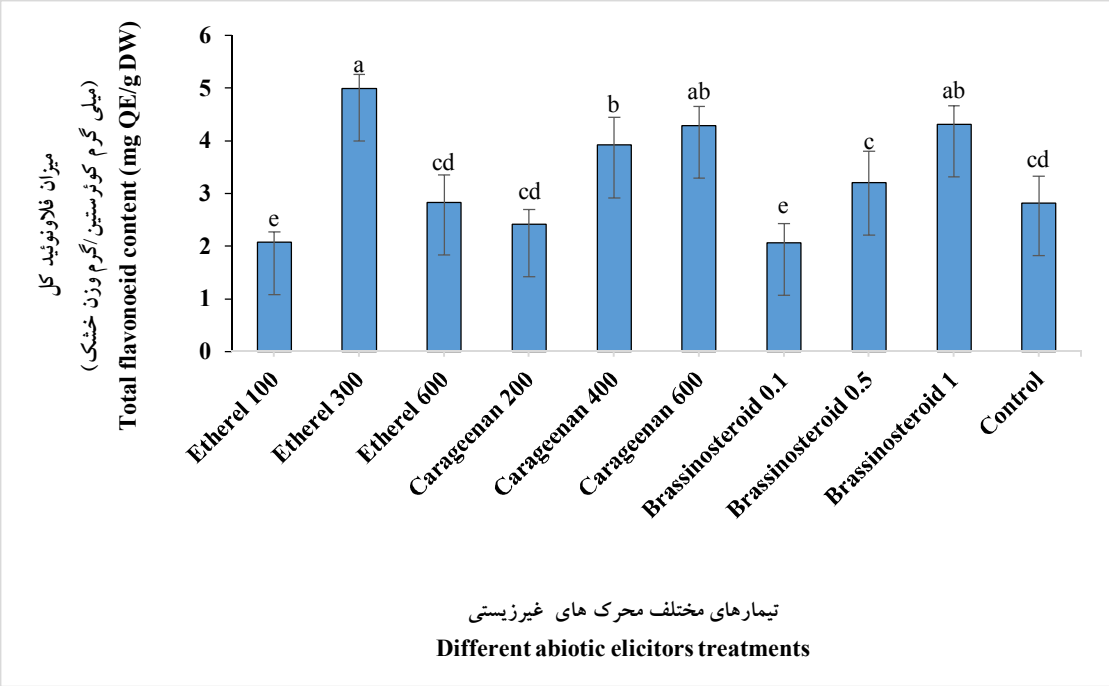
مطالعه آن‌ها توسط UHPLC، p- هیدروکسی بنزوئیک اسید، اسید گالیک، اسید پروتوکاتچیک، اسید سیرینجیک، اسید جنتسیک، اسید سالسیلیک، اسید وانیلیک، اسید بتا-رزورسیکلیک از گروه هیدروکسی بنزوئیک اسیدها؛ اسید کافئیک، p- اسید کوماریک، اسید فرولیک، اسید کلروجنیک، و اسید t-سینامیک از گروه هیدروکسی اسید سینامیک ؛ و ترکیبات متعلق به گروه فلاونول‌ها شامل: میرستین، کوئرستین، کامفرول، کاتچین، روتین، نارنجین و بیوچانین آ بودند (۱۰).



شکل ۱۱- تأثیر محرک‌های غیرزیستی مختلف در غلظت‌های متفاوت بر میزان فنل کل در میوه کارلا رقم Hybrid baby doll.

Fig. 11. Effects of different abiotic elicitors in various concentration on total phenol content of bitter melon fruits.

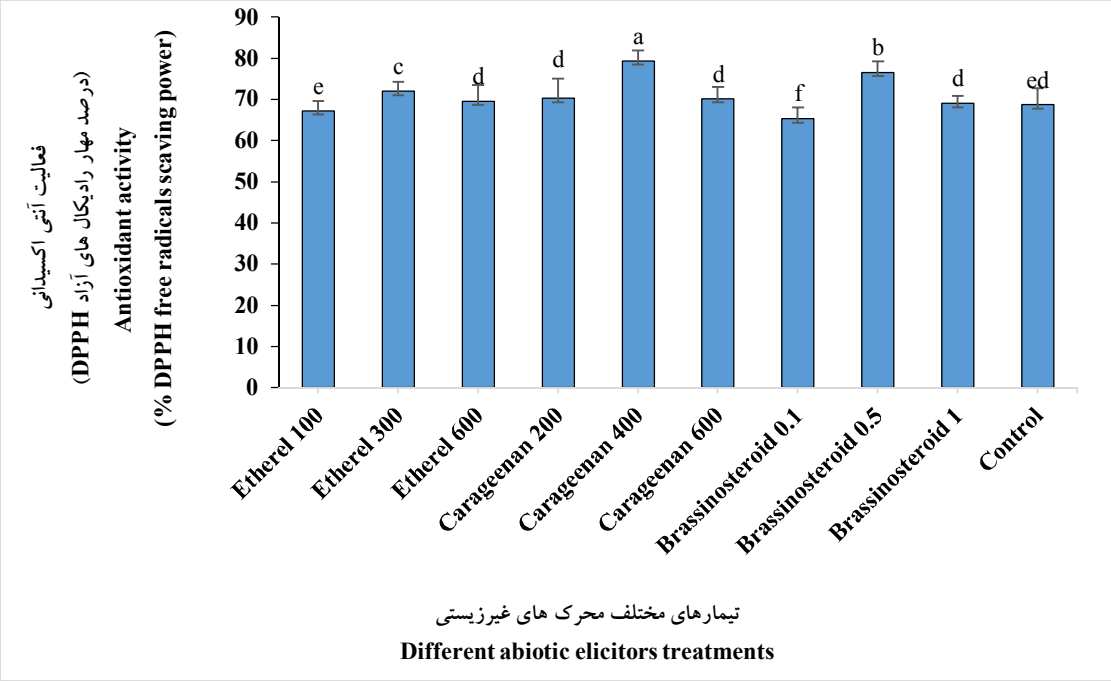
نتایج تجزیه واریانس داده‌ها بیانگر وجود اختلاف آماری معنی‌دار ($P<۰/۰۵$) بین تیمارهای مختلف محرک و سطوح آن بر محتوای فلاونوئید کل در عصاره هیدروالکلی میوه کارلا رقم hybrid baby doll بود (جدول ۲). در این آزمایش بیش‌ترین میزان فلاونوئید کل (٤/۹۹ معادل میلی‌گرم کوئرستین/گرم وزن خشک) از تیمار تهییج توسط اترل ۳۰۰ میکرومولار حاصل شد؛ درحالی‌که کم‌ترین میزان (۲/۰۷ میلی‌گرم کوئرستین/ گرم وزن خشک) از تیمار تهییج با براسینواستروئید در غلظت ۰/۱ میلی‌مولار به‌دست آمد (شکل ۱۲). در کشت تهییج‌شده ریشه موئینه کارلا توسط اسید جاسمونیک و اسید سالسیلیک، میزان فلاونوئید کل سنجش‌شده به ترتیب ۳/۵ و ۳/۲ معادل میلی‌گرم اکی‌والان کوئرستین/ گرم بود که با نتایج ما مطابقت داشت (۱۰).



شکل ۱۲- تأثیر محرک‌های غیرزیستی مختلف در غلظت‌های متفاوت بر میزان فلاونوئید کل در میوه کارلا رقم Hybrid baby doll.

Fig. 12. Effects of different abiotic elicitors in various concentrations on total flavonoids content of bitter melon.

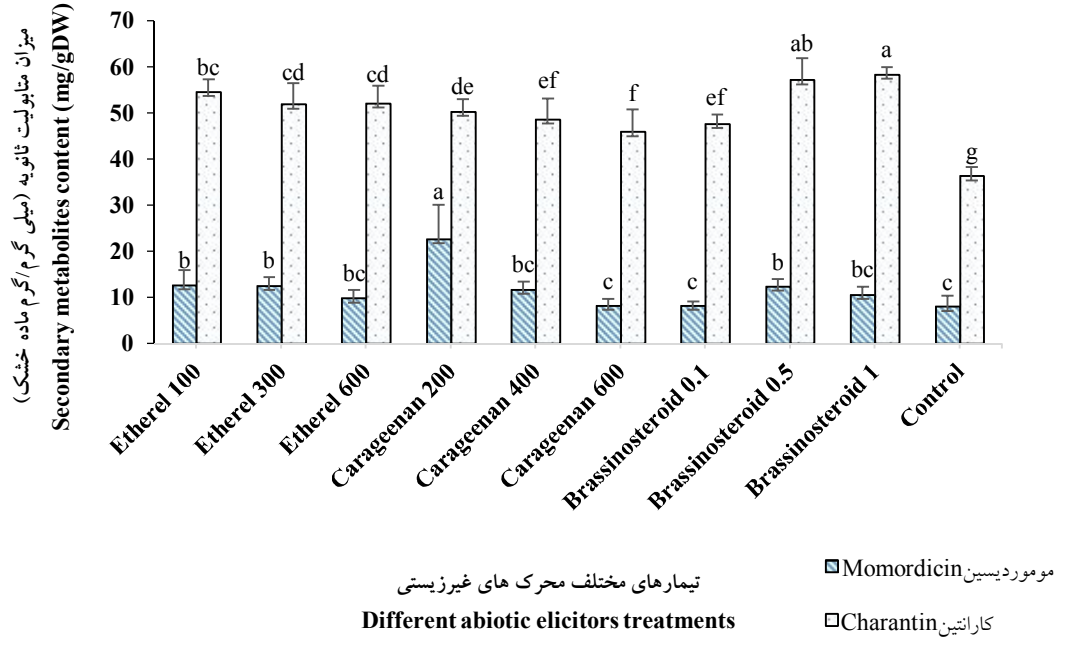
نتایج تجزیه واریانس داده‌ها حاکی از وجود اختلاف آماری معنی‌دار (P<۰/۰۵) بین تیمارهای مختلف محرک و سطوح آن بر قدرت مهار رادیکال‌های آزاد DPPH توسط عصاره هیدروالکلی میوه کارلا رقم hybrid baby doll بود (جدول ۲). در مطالعه حاضر بیش‌ترین فعالیت آنتی‌اکسیدان (۷۹/۳۱ درصد) متعلق به تیمار تهییج توسط کاراگینان با غلظت ٤۰۰ میلی‌گرم/ میلی‌لیتر بود. در حالی‌که کم‌ترین قدرت مهار رادیکال‌های آزاد در تیمار تهییج توسط اترل ۱۰۰ میکرومولار مشاهده گردید (شکل ۱۳). نتایج چانگ و همکاران بیانگر آن بود که در کشت ریشه موئینه کارلا در تهییج با اسید جاسمونیک و اسید سالسیلیک قدرت مهار رادیکال‌های آزاد (به‌ترتیب با مقادیر ۸۰ درصد و ٧٤ درصد) نسبت به تیمار شاهد (٦۲ درصد) افزایش یافته است (۱۰). پژوهشگران معتقدند حضور ترکیبات فنولی بیش‌تر ارتباط مستقیم با افزایش فعالیت آنتی‌اکسیدانی در مهار رادیکال‌های آزاد دارد (۱۰ و ۳۲).



شکل ۱۳- تأثیر محرک‌های غیرزیستی مختلف در غلظت‌های متفاوت بر فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره هیدروالکلی میوه کارلا.

Fig. 13. Effects of different abiotic elicitors in various concentrations on antioxidant activity of bitter melon fruits hydroalcholic extract.

نتایج تجزیه واریانس داده‌ها بیانگر وجود اختلاف آماری معنی‌دار ($P<۰/۰۵$) بین تیمارهای مختلف محرک و سطوح آن بر میزان تجمع متابولیت‌های ثانویه مومورديسين و کارانتین در میوه کارلا رقم hybrid baby doll بود (جدول ۲). این دو متابولیت ثانویه نقش شبه‌انسولینی در بدن دارند و اثرات ضددیابت آن‌ها به کرات گزارش شده است. در آزمایش ما بیش‌ترین میزان مومورديسين (۲۲/٦٤ میکروگرم/گرم ماده خشک) از تیمار تهییج توسط کاراگینان با غلظت ۲۰۰ میلی‌گرم/ لیتر حاصل شد؛ درحالی‌که کم‌ترین میزان آن (۸/۰۱ میکروگرم/ گرم ماده خشک) از تیمار شاهد سنجش گردید (شکل ١٤). هم‌چنین در مورد متابولیت ثانویه کارانتین بیش‌ترین میزان (۵۸/۳۸ میکروگرم/ گرم ماده خشک) از تیمار تهییج توسط براسینواستروئید یک میلی‌مولار به‌دست آمد؛ درحالی‌که کم‌ترین میزان (۳٦/۳۵ میکروگرم/ گرم ماده خشک) از نمونه شاهد سنجش گردید (شکل ١٤).



شکل ۱۴- تأثیر محرک‌های غیرزیستی مختلف در غلظت‌های متفاوت بر میزان مومورديسين و کارانتین در عصاره هیدروالکلی کارلا.

Fig. 14. Effects of different abiotic elicitors in various concentrations on momordicin and charantin of bitter melon hydroalcholic extract.

نتیجه‌گیری کلی

محرک‌ها به‌عنوان عامل ایجاد تغییرات در گیاهان شناخته شده‌اند؛ مخصوصاً در رفتارهای گلدهی، نسبت جنسیت، افزایش فروت‌ست، طویل شدن و نمو میوه و روابط منبع-محل مصرف اسمیلات‌ها. هم‌چنین این محرک‌ها تغییرات خاصی را در طول نمو میوه و بذر سبب می‌شوند؛ از آن‌جمله تجمع بیش‌تر مواد غذایی است که منجر به حصول عملکرد بالاتر می‌شود. تهییج به‌طور گسترده‌ای در افزایش تولید متابولیت‌های ثانویه در انواع کشت سلولی یا اندام به‌کار رفته است. اگرچه کاربرد فرآیند تهییج در کشت بافت بسیار زیاد مطالعه شده است، اما سازوکار دقیق آن هنوز مشخص نیست. در مطالعه ما نیز دانهال‌های تهییج‌شده عملکرد کمی و کیفی بهتری نسبت به شاهد از خود نشان دادند. نتایج آزمایش ما بیانگر آن بود که تهییج با اترل منجر به افزایش شاخص‌های ریخت‌شناختی مانند سطح برگ و طول میوه و شاخص‌های فیتوشیمیایی کلروفیل b، کلروفیل کل و فلاونوئید گردید. درحالی‌که بیش‌ترین میزان عملکرد و تجمع متابولیت کارانتین از تیمار تهییج با براسینواستروئید حاصل شد. محرک کاراگینان نیز بر میزان فنل کل، فعالیت آنتی‌اکسیدانی و متابولیت ثانویه مومورديسين بیش از سایر تیمارها مؤثر بود. نتایج این پژوهش می‌تواند مهندسان متابولیت را ترغیب نماید که از این تکنیک جهت افزایش متابولیت‌های ارزشمند دارویی و تولید دارو در مقیاس وسیع‌تر بهره برند.

منابع

1. Abdul Momin, M., Nazrul Islam, Md. and Akand, H. 2007. Effect of growth regulators and fertilizer management practices on the flowering, fruit set and yield of bitter gourd (*Momordica charantia* L.). MS thesis, Department of horticulture and postharvest technology, Sher-E-Bangla agricultural university, Dhaka, Bangladesh.
2. Agrarwal, M. and Kamal, R. 2013. In vitro clonal propagation and phytochemical analysis of *Momordica charantia*. Linn. J. Pharmacogn. Phytochem. 2: 1. 66-77.
3. Akter, P. and Rahman, M. 2013. Effect of foliar application of IAA and GA on sex expression, yield attributes and yield of bitter gourd (*Momordica Charantia* L.). J. Biol. Sci. 5: 1. 55-62.
4. Atta-Aly, M.A., Riad, G.S. Lacheene, Z. EL-S. and EL-Beltagy, A.S. 1999. Early Application of ethrel extends tomato fruit cell division and increases fruit size and yield with ripening delay. J. Plant Growth Regul. 18: 15-24.
5. Barati, M., Khamari, I. and Solouki, M. 2014. Investigation of the effect of mycorrhizal fungi and livestock manure on yield and yield components of bitter melon (*Momordica charantia* L.). (pp. 1-7). In: International Conference on Sustainable Development, Strategies and Challenges, Iran. 264p. (In Persian)
6. Barros, L., Baptista, P. and Ferreira, I.C.F.R. 2007. Effect of fruiting body maturity stage on antioxidant activity measured by several biochemical assays *Lactarius piperatus*. Food Chem. Toxicol. 45: 9. 1731-1737.
7. Barua, R., Talukder, E., Sayedul Islam, M., Yesmin, F., Chakma, K., Kabir, G. and Bhuiyan, R.H. 2020. Nutritional analysis and phytochemical evaluation of bitter gourd (*Momordica Charantia*) from Bangladesh. Asian. J. Agric. Food Sci. 8: 2. 11-17.
8. Choudhury, B., Pahatak, S.C. and Patil, A.V. 1967. Effect of plant regulator sprays on sex, fruits set and fruit development in cucumber (*Cucumis sativus* L.). Proc. Acad. Bihar Agric. Sci. 10: 29-34.
9. Chang, C.C., Yang, M.H., Wen, H.M. and Chern, J.C. 2002. Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. J. Food Drug Anal. 10: 3. 178-182.
10. Chung, I.M., Thiruvengadam, M., Rekha, K. and Rajakumar, G. 2016. Elicitation enhanced the production of phenolic compounds and biological activities in hairy root cultures of bitter melon (*Momordica charantia* L.). Braz. Arch. Biol. Technol. 59: 3. 1-10.
11. Chung, I.M., Thiruvengadam, M., Rekha, K., Rajakumar, G. and Thiruvengadam, M. 2018. Elicitation of silver nanoparticles enhanced the secondary metabolites and pharmacological activities in cell suspension cultures of bitter gourd. Biotech. 8: 412-424.
12. Firouzkoohi, F., Esmaeilzadeh Bahabadi, S., Mohkami, Z. and Yosefzaei, F. 2018. The effect of different solvents on total phenolic, flavonoid contents and antioxidant activity of different organs of *Momordica charantia* L. cultured in Sistan region. Ecophytochem. J. Med. Plants (EJMP). 20: 4. 74-85. (In Persian)
13. Grover, J.K. and Yadav, S.P. 2004. Pharmacological actions and potential uses of *Momordica charantia*: A review. J. Ethnopharmacol. 93: 123-132.
14. Khaleghnezhad, V., Yousefi, A.R., Tavakoli, A. and Farajmand, B. 2019. Interactive effects of abscisic acid and temperature on rosmarinic acid, total phenolic compounds, anthocyanin, carotenoid and flavonoid content of dragonhead (*Dracocephalum moldavica* L.). Sci Hort. 250: 302-309.
15. Koohsari, A., Chaloui, V. and Akbarpour, V. 2020. Effect of explant type and growth regulators on callus formation and chicory secondary metabolites (*Cichorium intybus* L.). J. Plant Prod Res (JPPR). 27: 2. 59-72. (In Persian)
16. Krawinkel, M.B. and Keding, G.B. 2006. Bitter Gourd (*Momordica charantia*): A Dietary Approach to Hyperglycemia. Nutr. Rev. 64: 7. 331-337.

17. Kuan Tan, H.B. and Zhao, Y. 2003 .Automated elicitation of inclusion dependencies from the source code for database transactions. J. Softw (Malden). 15: 6. 379-392.
18. Lee, S.H., Jeong, Y.S., Song, J., Hwang, K., Noh, G.M. and Hwang, G. 2017. Phenolic acid, carotenoid composition, and antioxidant activity of bitter melon (*Momordica charantia* L.) at different maturation stages. Int. J. Food Prop. 20 (S3): S3078-S3087.
19. Lichtenthaler, H.K. 1987. Chlorophyll and carotenoids: Pigments of photosynthetic biomembrane. Methods Enzymol. 148: 350-381.
20. Lopes, A.P., Petenuci, M.E., Galuch, M.B., Schneider, V.V.A., Canesin, E.A. and Visentainer, J.V. 2018. Evaluation of effect of different solvent mixtures on the phenolic compound extraction and antioxidant capacity of bitter melon (*Momordica charantia*). Chem. Pap. 72: 2945-2953.
21. Madhava Naik, P. and Alkheiry, J.M. 2016. Abiotic and biotic elicitors–role in secondary metabolites production through in vitro culture of medicinal plants. In book: abiotic and biotic stress in plants - recent advances and future. 64p.
22. Mekuria, D.B., Kashiwagi, T., Tebayashi, Sh. and Kim, Ch. 2006. Cucurbitane glucosides from *Momordica charantia* leaves as oviposition deterrents to the leaf miner, *Liriomyza trifolii*. Z. Naturforsch C. J. Biosci. 61: 81-86.
23. Qing Fu, F., Hua Mao, W., Shi, K., Zhou, Y.H., Asam, T. and Quan Yu, J. 2008. A role of brassinosteroids in early fruit development in cucumber. J. Exp. Bot. 59: 9. 2299-2308.
24. Radman, R., Sacz, T., Bucke, C. and Keshvartz, T. 2003. Elicitation of plants and microbial cell systems. Biotechnol. Appl. Biochem. 37: 91-102.
25. Sandra, N., Basu, S., Kumar Lal, S. and Chakrabarty, S.K. 2015. Effect of plant growth regulators on sex expression, fruit setting, seed yield and quality in the parental lines for hybrid seed production in bitter gourd (*Momordica charantia*). Indian J. Agric. Sci. 85: 9. 1185-1191.
26. Shafeek, M.R., Helmy, Y.I., Ahmed. A.A. and Ghoname, A.A. 2016. Effect of foliar application of growth regulators (GA_3 and Ethereal) on growth, sex expression and yield of summer squash plants (*Cucurbita pepo* L.) under plastic house condition. Int. J. Chem. Tech. Res. 9: 6. 70-76.
27. Spollansky, T.C., Pitta-Alvarez, S.I. and Giulietti, A.M. 2000. Effect of jasmonic acid and aluminium on production of tropane alkaloids in hairy root cultures of *Brugmansia candida*. Elec. J. Biotechnol. 3: 1. 72-75.
28. Sivanandhan, G., Kapil, D.G., Jeyaraj, M., Rajesh, M., Muthuselvam, M., Selvaraj, N., Manickavasagam, M. and Ganapathi, A.A. 2013. promising approach on biomass accumulation and withanolides production in cell suspension culture of *Withania somnifera* (L.) Dunal. Protoplasm. 250: 885-898.
29. Sung Goo, K., Ashari S., Basuki, N. and Noor Sugiharto, A. 2016. The bitter gourd (*Momordica charantia* L.): morphological aspects, charantin and vitamin c contents. J. Agric. Vet. Sci. 9: 10. 76-81.
30. Tan, S.P., Kha, T.C., Parks, S.E. and Roach, P.D. 2016. Bitter melon (*Momordica charantia* L.) bioactive composition and health benefits: A review. Food Rev. Int. 32: 2. 181-202.
31. Thwe, A., Arasu, M.V., Li, X., Park, C.H., Kim, S.J., Al-Dhabi, N.A. and Park, S.U. 2016. Effect of different *Agrobacterium rhizogenes* strains on hairy root induction and phenylpropanoid biosynthesis in tartary buckwheat (*Fagopyrum tataricum* Gaertn). Front Microbiol. 7: 318.
32. Wu, S.J. and Ng, L.T. 2008. Antioxidant and free radical scavenging activities of wild bitter melon (*Momordica charantia* Linn. var. abbreviata Ser.) in Taiwan. Food Sci. Technol. 41: 2. 323-330.
33. Zhang, S., Li, H., Liang, X., Yan, Y., Xia, P., Jia, Y. and Liang, Z. 2015. Enhanced production of phenolic acids in *Salvia miltiorrhiza* hairy root cultures by combing the RNAi-mediated silencing of chalcone synthase gene with salicylic acid treatment. Biochem. Eng. J. 103: 185-192.