Research Article

The optimization of tissue culture and phytochemical study of insulin plant (*Costus pictus* D. Don)

Maryam Jariteh[1], Elahe Vatankhah[2*], Afagh Hosseini[2], Mahnaz Vafadar[2]
[1.] Paya danerost plant biotechnology Co., Tehran, Iran
[2.] Department of Biology, Faculty of Science, University of Zanjan, Iran

Abstract
Costus pictus D. Don, commonly known as insulin plant, is used for the treatment of diabetes in southern India. In recent years this plant is cultivated in some greenhouses in Iran and is propagated by cutting. Therefore, the present study was carried out to optimization of tissue culture and evaluation of phytochemical compounds in this plant. Among different explants including leaf, node and internode and different hormone treatments, the best results were observed for node explants and treatments with BA (3.5 mg/l) and NAA (0.5 mg/l). To access phytochemical properties of *in vivo* and *in vitro* leaves, the contents of photosynthetic pigments, soluble sugar, phenol, flavonoid and protein were measured. The results showed that all of these parameters with the exception of phenol and protein in *in vivo* leaves were significantly higher than *in vitro* leaves. Also, phytochemical analyses of *in vivo* leaves and rhizomes revealed that leaves were rich in flavonoid, soluble sugar, caffeic acid and quercetin whereas rhizomes were rich in phenol and protein. Mineral elements analyses indicated that the concentrations of Ca, K, Mn and Sr of leaves were higher while higher concentrations of Al, Fe, Na, Cr and Zn were observed in rhizomes. In conclusion, presented micropropagation protocol in this study, in addition to accelerate large scale multiplication and conservation of *C. pictus*, would be important economically. Also, leaves of this plant, are rich in quercetine (an antidiabetic compound), could be considered as a potential candidate for phytochemical and medical studies.

Keywords: Phytochemical analysis, Micropropagation, Phenolics, Insulin plant.

* Corresponding Author: elahe_vatankhah@znu.ac.ir

Copyright©2017, University of Isfahan. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (http://creativecommons.org/licenses/BY-NC-ND/4.0), which permits others to download this work and share it with others as long as they credit it, but they cannot change it in any way or use it commercially.
DOI. 10.22108/ijpb.2020.119122.1173

زیست‌شناسی گیاهی ایران، سال دوازدهم، شمارهٔ چهل و سوم، بهار ۱۳۹۹، صفحهٔ ۲۳-۳۶
تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۸/۰۶/۲۰
تاریخ بررسی مجدد: ۱۳۹۹/۰۱/۱۲و ۱۳۹۹/۰۱/۲۷
تاریخ پذیرش نهایی: ۱۳۹۹/۰۲/۰۸

مقاله پژوهشی

بهینه‌سازی کشت بافت و مطالعهٔ فیتوشیمیایی گیاه انسولین (*Costus pictus* D. Don)

مریم جریته[۱]، الهه وطن‌خواه[۲*]، آفاق حسینی[۲]، مهناز وفادار[۲]
[۱] شرکت زیست‌فناوری گیاهی پایا دانه‌رست، تهران، ایران
[۲] گروه زیست‌شناسی، دانشکدهٔ علوم، دانشگاه زنجان، ایران

چکیده

گیاه *Costus pictus* D. Don معروف به گیاه انسولین به‌منظور درمان بیماری دیابت در جنوب هند استفاده می‌شود؛ این گیاه در سال‌های اخیر به ایران آورده و در برخی گلخانه‌ها از طریق قلمه تکثیر شده است. مطالعهٔ حاضر به‌منظور بهینه‌سازی کشت بافت و ارزیابی ترکیبات فیتوشیمیایی گیاه *Costus pictus* D. Don انجام شد. از میان قطعه‌های جداکشت مانند برگ، گره و میانگره و تیمارهای هورمونی مختلف، بهترین نتیجه برای قطعهٔ گره و تیمار واجد بنزیل‌آمینوپورین و نفتالن‌استیک‌اسید به‌ترتیب با غلظت‌های ۳/۵ و ۰/۵ میلی‌گرم‌درلیتر مشاهده شد. به‌منظور بررسی صفت‌های فیتوشیمیایی برگ‌های گلدانی و برگ‌های درشیشه، میزان رنگیزه‌های فتوسنتزی، قندهای محلول، فنل، فلاونوئید و پروتئین اندازه‌گیری شد. نتایج نشان دادند همهٔ صفت‌های یادشده به‌جز فنل و پروتئین در برگ‌های گلدان به‌طور معناداری بیشتر از برگ درشیشه هستند. بررسی‌های فیتوشیمیایی برگ و ریزوم گلدان نشان دادند برگ غنی از فلاونوئید، قند، کافئیک‌اسید و کوئرستین و ریزوم غنی از فنل و پروتئین است. تجزیه‌وتحلیل عناصر معدنی نیز نشان داد میزان عناصر کلسیم، پتاسیم، منگنز و استرانسیم در برگ‌های گلدان بیشتر از ریزوم‌های گلدان و میزان عناصر آلومینیوم، آهن، سدیم، کروم و روی در ریزوم‌های گلدان بیشتر از برگ‌های گلدان است. درمجموع، روش ریزازدیادی پیشنهادشده در پژوهش حاضر علاوه‌بر تسریع تکثیر در مقیاس انبوه و حفظ گیاه *C. pictus*، ازنظر اقتصادی نیز مقرون‌به‌صرفه است؛ همچنین برگ‌های غنی از کوئرستین (ترکیب ضددیابتی) این گیاه را می‌توان نامزد بالقوه‌ای برای پژوهش‌های فیتوشیمیایی و پزشکی در نظر گرفت.

واژه‌های کلیدی: تجزیه‌وتحلیل فیتوشیمیایی، ریزازدیادی، فنل‌ها، گیاه انسولین

* نگارندهٔ مسؤول: نشانی پست الکترونیک: elahe_vatankhah@znu.ac.ir، شمارهٔ تماس: ۰۲۴۳۳۰۵۲۵۴۳

Copyright©2017, University of Isfahan. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (http://creativecommons.org/licenses/BY-NC-ND/4.0), which permits others to download this work and share it with others as long as they credit it, but they cannot change it in any way or use it commercially.

مقدمه

برخی سردهٔ *Costus* را از تیرهٔ Costaceae و برخی از تیرهٔ Zingiberaceae معرفی کرده‌اند؛ گیاهان گل‌دار، علفی و چندساله‌ای که به‌علت داشتن آرایش برگی مارپیچی از سردهٔ زنجبیل (*Zingiber* Mill) تشخیص داده می‌شوند و ازاین‌رو، زنجبیل مارپیچ (spiral ginger) نیز نامیده می‌شوند (Hegde *et al*., 2014; Ramasubramaniyan *et al*., 2015). گیاه انسولین با نام علمی *Costus pictus* D. Don، بومی برزیل و جنوب کشور هند است و به‌تازگی در آمریکا نیز یافت شده است (Jose and Reddy, 2010; Hegde *et al*., 2014). افراد مبتلا به دیابت در جنوب هند از برگ گیاه انسولین برای تنظیم سطح قند خون استفاده می‌کنند و در طب سنتی هندی به گیاه ضددیابت معروف است؛ به‌همین‌علت، گونه‌های این سرده به نام گیاه انسولین نام‌گذاری شده‌اند.

بهره‌برداری بی‌رویه برای اهداف تجاری و نیاز صنایع دارویی، گیاه *C. pictus* را با خطر انقراض و نابودی روبه‌رو کرده است. تولید و تکثیر رویشی گیاه انسولین به‌علت زنده‌مانی ضعیف بذر، کم‌بودن درصد جوانه‌زنی بذر و ریشه‌زایی ضعیف قلمه‌های رویشی مشکل است و ازاین‌رو، استفاده از روش‌های تکثیر جایگزین ازجمله کشت بافت برای سرعت‌بخشیدن به تکثیر در مقیاس وسیع و بهبود و حفظ گیاه مفید است (Bakrudeen Ali Ahmad and Arun Kumar, 2009). برخی پژوهشگران ریزازدیادی *C. pictus* با استفاده از تنظیم‌کننده‌های مختلف رشد گیاهی مانند ۶- بنزیل‌آمینوپورین (BAP)، کینتین (KIN) و ایندول۳- استیک‌اسید (IAA) و قطعه‌های جداکشت مختلف مانند نوک ساقه، برگ، گره و ریزوم را بررسی کرده‌اند (Punyarani and Sharma, 2012; Jadhav *et al*., 2015) و کشت بافت را روش منحصربه‌فردی برای کشت سریع و حفاظت از *C. pictus* دانسته‌اند؛ بنابراین باتوجه‌به اینکه گیاه دارویی انسولین بومی ایران نیست، کشت بافت و ریزازدیادی به‌عنوان مکملی برای روش‌های سنتی (قلمه‌زدن) تکثیر این گیاه در مقیاس انبوه ضروری به نظر می‌رسد؛ همچنین بررسی‌های بیوشیمیایی و فیتوشیمیایی انجام‌شده در زمینهٔ گیاه *C. pictus* نشان می‌دهند نه‌تنها به‌شکل گیاه زینتی رشد می‌کند، برگ‌های آن برای مکمل غذایی استفاده می‌شوند و اثر ضددیابتی دارند (Jayasri *et al*., 2008). در پژوهش‌های فیتوشیمیایی مختلف، وجود کربوهیدرات‌ها، تری‌ترپنوئیدها، پروتئین‌ها، آلکالوئیدها، تانن‌ها، ساپونین‌ها، فلاونوئیدها، استروئیدها و مقادیر مناسبی از عناصر کمیاب در این گیاه نشان داده شده است (Hegde *et al*., 2014).

گیاه دارویی انسولین به‌تازگی از هند به ایران آورده و به‌طور بسیار محدود در چند گلخانهٔ کوچک کشت شده است. ازآنجاکه روش تکثیر استفاده‌شده در ایران، قلمه‌زدن است و تعداد محدودی قلمه از هر گیاه گرفته می‌شود، استفاده از روش کشت بافت جایگزین بسیار مناسبی است؛ از سوی دیگر، برگ‌های این گیاه دارویی به‌طور تازه مصرف می‌شوند و ازاین‌رو، تولید گیاهان سالم و بدون ویروس که تنها به روش کشت بافت

امکان‌پذیر است، ضروری به نظر می‌رسد. باتوجه‌به مطالب یادشده، بهینه‌سازی کشت بافت گیاه انسولین و تولید آن در مقیاس وسیع هدف پژوهش حاضر است؛ همچنین برخی ترکیبات و مواد مؤثرهٔ بیوشیمیایی مانند قندهای محلول، پروتئین‌ها، ترکیبات فنلی، فلاونوئیدها و همچنین عناصر معدنی در گیاهان گلدانی و گیاهان حاصل از کشت بافت بررسی می‌شوند.

مواد و روش‌ها

کشت بافت: گیاه انسولین به‌شکل گلدانی از گلخانهٔ شخصی در کرج تهیه و به آزمایشگاه منتقل شد. گیاه گلدانی حاصل از کاشت قلمه برای کشت بافت استفاده شد.

انتخاب قطعهٔ جداکشت مناسب: در آزمایش اول که به‌منظور انتخاب قطعهٔ جداکشت مناسب انجام شد، قطعه‌های برگ، گره و میانگره انتخاب شدند. به‌منظور استریل‌کردن سطحی، برگ‌ها از ساقه‌ها جدا و ساقه‌ها نیز قطعه‌قطعه شدند و پس‌از شستشو با آب جاری، در وایتکس ۱۰ درصد غوطه‌ور و سپس سه بار با آب مقطر استریل زیر لامینار شستشو شدند. به‌منظور کشت برگ، نمونه‌ها با اسکالپل استریل به قطعه‌های کوچک حدود ۱ سانتی‌مترمربع بریده، ساقه‌ها قطعه‌قطعه و میانگره و گره کشت شدند. تیمار استفاده‌شده، ۱/۶ میلی‌گرم‌درلیتر ۶- بنزیل‌آمینوپورین یا بنزیل‌آدنین (BA) و ۰/۲ میلی‌گرم‌درلیتر نفتالن‌استیک‌اسید (NAA) بود که بر اساس مقاله‌ها (Jadhav *et al*., 2015; Ramasubramaniyan *et al*., 2015) انتخاب شد.

انتخاب تیمار هورمونی مناسب برای جوانه‌زنی: در آزمایش دوم، تنها گره به‌عنوان قطعهٔ جداکشت انتخاب شد و تیمارهای هورمونی مختلف مقایسه شدند (جدول ۱). محیط‌کشت استفاده‌شده در هر دو آزمایش، (Murashige MS and Skoog, 1962) بود که ۳۰ گرم‌درلیتر ساکارز به آن اضافه و اسیدیتهٔ آن روی ۵/۸ تنظیم شد و با ۲ گرم‌درلیتر ژلریت به‌شکل جامد درآمد.

جدول ۱- تیمارهای هورمونی به‌کاررفته برای جوانه‌زنی

کد تیمار	BA (mg/l)	NAA (mg/l)	IAA (mg/l)
T1	۳/۵	۰	۰/۵
T2	۲/۵	۰	۰/۵
T3	۳/۵	۰/۵	۰
T4	۲/۵	۰/۵	۰

انتقال جوانه‌ها به محیط ریشه‌زایی: دو ماه پس‌از کشت، ریزنمونه‌هایی که به تیمارها پاسخ داده بودند برای ریشه‌زایی به محیط MS دارای ۰/۱ میلی‌گرم‌درلیتر ایندول۳- بوتیریک‌اسید (IBA) منتقل شدند. پس‌از ایجاد ریشه‌های فراوان، گیاهچه‌های دارای ریشه و ساقه از شرایط کشت خارج و پس‌از شستشو با آب جاری و حذف کامل مواد ژله‌ای‌کننده به محیط سازگاری وارد شدند.

سازگاری گیاهچه‌ها با محیط: گیاهچه‌ها به‌منظور سازگاری با محیط در لیوان‌های درپوش‌دار دارای پیت و پرلیت به نسبت ۷۰ به ۳۰ کشت شدند. یک هفته بعد، روزی چند ساعت در ظرف برداشته می‌شد و این زمان هر سه روز افزایش می‌یافت تا اینکه در کاملاً باز گذاشته شد؛ پس‌ازآن، انتقال به گلدان انجام شد. مشاهده‌ها پس‌از دو ماه ثبت شدند.

اندازه‌گیری صفت‌های فیتوشیمیایی: برخی صفت‌های بیوشیمیایی مانند رنگیزه‌های فتوسنتزی، قند محلول، پروتئین، فنل کل و فلاونوئید در برگ درشیشه اندازه‌گیری شدند. علاوه‌بر صفت‌های بررسی‌شده در برگ درشیشه، عناصر معدنی، محتوای کوئرستین و کافئیک‌اسید در نمونه‌های گلدانی (برگ و ریزوم) اندازه‌گیری شدند. گفتنی است گیاهان گلدانی (حاصل از کاشت قلمه) و گیاهان درشیشه (حاصل از کشت بافت) که برای تجزیه‌وتحلیل فیتوشیمیایی استفاده شدند، تقریباً هم‌سن بودند.

اندازه‌گیری رنگیزه‌های فتوسنتزی: اندازه‌گیری کلروفیل a، b و کلروفیل کل و کاروتنوئیدها به روش Lichtenthaler و Wellburn (۱۹۸۳) انجام شد؛ به‌این‌ترتیب که ۰/۲ گرم بافت تر برگ درون‌شیشه و برگ گلدان در ۲۰ میلی‌لیتر استن ۸۰ درصد ساییده شد و محلول حاصل با کاغذ صافی صاف و حجم نهایی آن به ۲۰ میلی‌لیتر رسانده شد. جذب محلول‌ها به طور جداگانه در طول موج‌های ۶۶۳ نانومتر برای کلروفیل a، ۶۴۵ نانومتر برای کلروفیل b و ۴۷۰ نانومتر برای کاروتنوئیدها با دستگاه اسپکتروفتومتر خوانده شد؛ درنهایت، میزان کلروفیل a، b، کلروفیل کل و کاروتنوئیدها با استفاده از روابط زیر و بر حسب میلی‌گرم‌برگرم وزن تر نمونه محاسبه شد. در این روابط، A برابر میزان جذب در طول موج مدنظر، V حجم محلول صاف‌شده بر حسب میلی‌لیتر و W وزن تر نمونه بر حسب گرم است.

$$\text{Chl. a (mg/g FW)} = (12.25\ A_{663.2} - 2.79\ A_{646.8})\ V/1000W$$
$$\text{Chl. b (mg/g FW)} = (21.50\ A_{646.8} - 5.10\ A_{663})\ V/1000W$$
$$\text{Chl. T (mg/g FW)} = \text{Chl. a} + \text{Chl. b}$$
$$\text{Car (mg/g FW)} = 1000\ A_{470} - 1.82\ \text{Chl. a} - 85.02\ \text{Chl. b}\ /198$$

اندازه‌گیری میزان قند محلول: قندهای محلول با استفاده از معرف آنترون و بر اساس روش Roe (۱۹۵۵) سنجیده و مقادیر قند محلول نمونه‌ها با استفاده از نمودار استاندارد گلوکز بر اساس میلی‌گرم‌برگرم وزن تر محاسبه شدند.

اندازه‌گیری میزان پروتئین محلول: به‌منظور سنجش پروتئین از معرف برادفورد (Bradford, 1976) استفاده و جذب عصاره در طول موج ۵۹۵ نانومتر با دستگاه اسپکتروفتومتر خوانده شد. آلبومن سرم گاوی برای رسم نمودار استاندارد استفاده و مقدار پروتئین بر حسب میلی‌گرم‌برگرم وزن تر محاسبه شد.

اندازه‌گیری عناصر معدنی: آماده‌سازی نمونه‌های گیاهی برای اندازه‌گیری عناصر با خشک‌سوزانی و انحلال خاکستر گیاهی در کلریدریک‌اسید به روش Waling و همکاران (۱۹۸۹) انجام شد. دستگاه ICP برای اندازه‌گیری غلظت عناصر استفاده و مقدار آنها بر حسب میلی‌گرم‌برگرم وزن خشک محاسبه شد.

اندازه‌گیری میزان کل ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی: به‌منظور استخراج فنل و فلاونوئید کل، ۰/۱ گرم پودر خشک برگ گلدان، برگ حاصل از کشت درشیشه و ریزوم گلدان به‌مدت ۴۸ ساعت با متانول خالص در دمای اتاق

عصاره‌گیری شد. حلال در دمای اتاق تبخیر شد و در ادامه، عصارهٔ خشک در ۴ میلی‌لیتر متانول خالص حل و برای سنجش فنل و فلاونوئید کل استفاده شد (Pourmorad *et al*., 2006). محتوای فنل کل با معرف فولین- سیوکالتو اندازه‌گیری و نمودار استاندارد گالیک‌اسید برای محاسبهٔ مقدار فنل استفاده شد. روش رنگ‌سنجی کلریدآلومینیوم برای تعیین مقدار فلاونوئیدها استفاده شد (Chang *et al*., 2002). هرکدام از عصاره‌های متانولی گیاهی (۰/۵ میلی‌لیتر) به‌طور جداگانه با ۱/۵ میلی‌لیتر متانول، ۰/۱ میلی‌لیتر کلریدآلومینیوم ۱۰ درصد، ۰/۱ میلی‌لیتر استات‌پتاسیم ۱ مولار و ۲/۸ میلی‌لیتر آب مقطر ترکیب و سپس محلول‌ها به‌مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق قرار داده شدند. جذب هر ترکیب واکنشی در ۴۱۵ نانومتر با دستگاه اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری و کوئرستین برای رسم نمودار استاندارد استفاده شد. مقدار فنل و فلاونوئید بر حسب میلی‌گرم‌برگرم وزن خشک گزارش شد.

استخراج و بررسی کافئیک‌اسید و کوئرستین با HPLC: دستگاه کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC) برای اندازه‌گیری غلظت کافئیک‌اسید و کوئرستین برگ و ریزوم گلدان استفاده شد. به‌منظور اندازه‌گیری کافئیک‌اسید، مقدار ۰/۲ گرم بافت خشک از هر نمونه با ۶ میلی‌لیتر متانول ساییده و به‌مدت ۲ ساعت در حمام فراصوت و پس‌ازآن، ۳۰ دقیقه روی شیکر قرار داده شد. پس‌از سانتریفیوژ با دور ۱۳۰۰۰ به‌مدت ۱۰ دقیقه، روشناورها جدا و درظرف درباز ریخته شدند و برای خروج (تبخیر) متانول زیر هود قرار گرفتند. به‌منظور استخراج کوئرستین، مقدار ۰/۲ گرم بافت خشک از هر نمونه با ۲ میلی‌لیتر متانول اسیدی ۴۰ درصد (حاوی ۰/۵ درصد استیک‌اسید) ساییده و به‌مدت ۴ ساعت روی شیکر قرار داده شد. پس‌از سانتریفیوژ با دور ۱۳۰۰۰ به‌مدت ۱۰ دقیقه، روشناورها جدا و درظرف درباز ریخته شدند و برای خروج (تبخیر) متانول زیر هود قرار گرفتند. به‌منظور تزریق، نمونه‌ها در ۵۰۰ میکرولیتر متانول HPLC حل شدند. عصاره‌های حاصل برای سنجش غلظت کافئیک‌اسید و کوئرستین به دستگاه HPLC (Knauer) تزریق شدند و غلظت آنها به کمک کروماتوگرام استاندارد محاسبه شد. سیستم HPLC شامل پمپ Knauer-K1001، یک ستون C18 (4.6×250 mm) و یک دتکتور Knauer-UV K2501 برای تجزیه‌وتحلیل استفاده شد. جداسازی کافئیک‌اسید به روش ایزوکراتیک با استفاده از فاز متحرک فسفریک ۰/۱ درصد- استونیتریل (۲۰-۸۰) و جریان ۱ میلی‌لیتردردقیقه با تعیین جذب UV در ۲۸۰ نانومتر انجام شد. کوئرستین هم به روش ایزوکراتیک با استفاده از فاز متحرک متانول B- فسفریک‌اسید ۰/۳ گرم‌برلیتر (اسیدیتهٔ ۲) A و جریان ۱/۳ میلی‌لیتردردقیقه با تعیین جذب UV در ۳۷۰ نانومتر جداسازی شد (Ahmadi-Sakha *et al*., 2018).

تجزیه‌وتحلیل آماری: محاسبهٔ میانگین‌ها و بررسی معناداربودن اختلاف‌ها با نرم‌افزار SPSS، نسخهٔ ۱۷ انجام شد. مقایسهٔ میانگین داده‌های مربوط به کشت بافت با آزمون دانکن در سطح احتمال ۵ درصد و مقایسهٔ میانگین‌های مربوط به

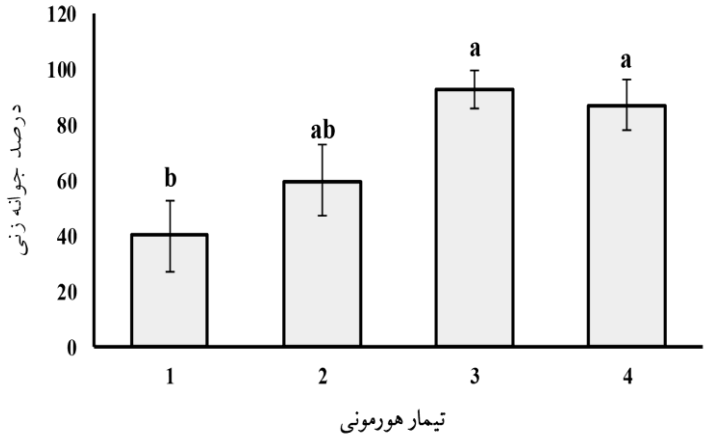
صفت‌های فیتوشیمیایی با آزمون t-test انجام شد. رسم نمودارها با نرم‌افزار Excel 2013 انجام شد.

نتایج

نتایج آزمایش اول کشت بافت: در آزمایش اول، قطعه‌های جداکشت مختلف شامل برگ، گره و میانگره در تیمار هورمونی مشابهی کشت شدند تا شیوهٔ پاسخگویی آنها به تیمار هورمونی بررسی شود. نتایج نشان دادند برگ و میانگره هیچ‌گونه اندام‌زایی را نشان نمی‌دهند، ولی گره در بیشتر نمونه‌ها جوانه‌زنی را نشان می‌دهد (شکل ۱، A)؛ بنابراین تصمیم گرفته شد تنها از قطعه‌های گره برای بهینه‌سازی ریزازدیادی گیاه انسولین استفاده شود.

نتایج آزمایش دوم کشت بافت: نتایج نشان دادند اثر تیمار هورمونی بر درصد جوانه‌زنی در کشت گرهٔ گیاه انسولین در سطح ۱ درصد معنادار است. اختلاف معناداری بین دو نوع اکسین مشاهده شد و درصد جوانه‌زنی در حضور NAA بیشتر از IAA بود، ولی اختلاف معناداری بین دو غلظت سیتوکینین وجود نداشت (شکل ۲).

شکل ۱- مراحل جوانه‌زنی گرهٔ *C. pictus* در محیط‌کشت تا سازگاری در گلدان؛ A. جوانه‌زایی قطعهٔ جداکشت گره در محیط‌کشت، B. ایجاد ریشه‌ها از نوساقه‌ها در محیط ریشه‌زایی، C. سازگاری در لیوان‌های شفاف



شکل ۲- اثر تیمارهای هورمونی مختلف بر درصد جوانه‌زنی میانگرهٔ *C. pictus*؛ ۱. BA (3.5 mg/l), IAA (0.5 mg/l)، ۲. BA (2.5 mg/l), IAA (0.5 mg/l)، ۳. BA (3.5 mg/l), NAA (0.5 mg/l)، ۴. BA (2.5 mg/l), NAA (0.5 mg/l). حرف‌های متفاوت، اختلاف معنادار در سطح احتمال ۱ درصد را با آزمون دانکن نشان می‌دهند.

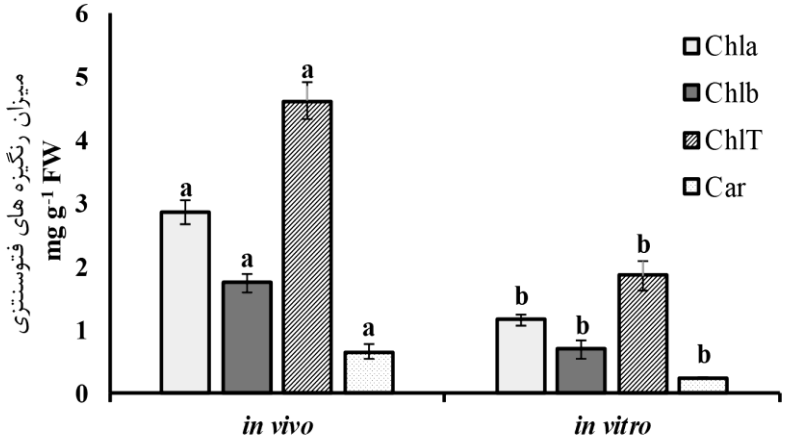
دو ماه پس‌از کشت، ریزنمونه‌هایی که به تیمارها پاسخ داده بودند (شکل ۱، A) برای ریشه‌زایی به محیط MS دارای ۰/۱ میلی‌گرم‌درلیتر IBA منتقل شدند. تمام نمونه‌هایی که به محیط ریشه‌زایی منتقل شدند، بسیار زود شروع به ریشه‌زایی کردند (شکل ۱، B) و پس‌از حدود یک ماه، آمادهٔ انتقال به شرایط سازگاری (لیوان درپوش‌دار) بودند (شکل ۱، C). پس‌از طی شرایط سازگاری، گیاهچه‌ها به گلدان منتقل شدند و به رشد خود در شرایط معمولی ادامه دادند.

رنگیزه‌های فتوسنتزی: مقایسهٔ میزان رنگیزه‌های فتوسنتزی برگ درشیشه با برگ گلدان گیاه انسولین اختلاف معنادار آنها را نشان داد؛ به‌طوری‌که بیشترین میزان در برگ گلدان مشاهده شد (شکل ۳).

صفت‌های فیتوشیمیایی برگ درشیشه و برگ گلدان: نتایج آزمون t-test برای مقایسهٔ میزان صفت‌های فیتوشیمیایی برگ گلدان و برگ درشیشه نشان دادند پروتئین در سطح ۵ درصد معنادار است، اما سایر صفت‌های اندازه‌گیری‌شده در سطح ۱ درصد معنادارند (جدول ۲). نتایج نشان دادند میزان قند محلول و فلاونوئید به‌طور معناداری در برگ گلدان بیشتر است؛ درحالی‌که میزان فنل کل و پروتئین در برگ درشیشه بیشتر است.

جدول ۲- آزمون مقایسهٔ میانگین‌های t-test روی برخی صفت‌های فیتوشیمیایی برگ گلدان و برگ درشیشه *C. pictus*

	برگ گلدان	برگ درشیشه	Df	t	P
قند محلول (mg g^{-1} FW)	۸/۶۲۹ ± ۰/۱۴۴	۵/۸۷۹ ± ۰/۱۰۵	۴	۱۵/۴۰۷	۰/۰۰۰
پروتئین (mg g^{-1} FW)	۰/۰۳۲ ± ۰/۰۱۵	۰/۰۸۹ ± ۰/۰۰۷	۴	-۳/۳۲۹	۰/۰۲۹
فنل کل (mg g^{-1} DW)	۷/۲۹۲ ± ۰/۱۹۴	۱۵/۰۴۹ ± ۰/۱۱۰	۴	-۳۴/۸۲۲	۰/۰۰۰
فلاونوئید (mg g^{-1} DW)	۵/۱۱۹ ± ۰/۱۲۴	۱/۸۶۰ ± ۰/۰۵۳	۴	۲۴/۱۶۹	۰/۰۰۰



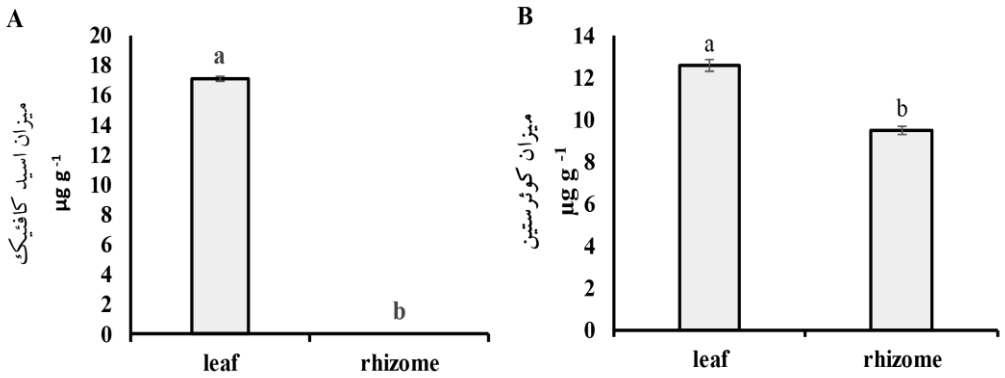
شکل ۳- مقایسهٔ میزان رنگیزه‌های فتوسنتزی در برگ گلدان (*in vivo*) و برگ درشیشه (*in vitro*) گیاه *C. pictus*. حرف‌های متفاوت، اختلاف معنادار در سطوح احتمال ۱ (Chla، Chlb و ChlT) و ۵ درصد (Car) را با استفاده از آزمون t-test نشان می‌دهند.

صفت‌های فیتوشیمیایی برگ و ریزوم گلدان: میزان صفت‌های فیتوشیمیایی برگ و ریزوم گلدان با آزمون t-test بررسی شد. نتایج نشان دادند میزان قند محلول، پروتئین و فلاونوئید در سطح ۱ درصد و میزان فنل کل در سطح ۵ درصد معنادار است (جدول ۳). مطابق جدول ۳، میزان فنل کل و پروتئین به‌طور معناداری در ریزوم بیشتر از برگ گلدان است؛ درحالی‌که میزان قند محلول و فلاونوئید در برگ گلدان بیشتر و ازنظر آماری معنادار است.

نتایج بررسی میزان کافئیک‌اسید (اسید فنلی) و کوئرستین (فلاونوئید) برگ و ریزوم گلدان گیاه انسولین به روش HPLC نشان داد کافئیک‌اسید تنها در برگ گلدان مشاهده می‌شود و وجود آن در ریزوم دیده نمی‌شود (شکل ۴، A) و میزان کوئرستین در برگ گلدان در مقایسه با ریزوم گلدان بیشتر است (شکل ۴، B).

جدول ۳- آزمون مقایسهٔ میانگین‌های t-test روی برخی صفت‌های فیتوشیمیایی برگ گلدان و ریزوم گلدان *C. pictus*

	برگ گلدان	ریزوم گلدان	Df	t	P
قند محلول ($mg\ g^{-1}$ FW)	۸/۶۳۰ ± ۰/۱۴۴	۱/۷۲۵ ± ۰/۰۳۰	۴	۴۶/۷۵۵	۰/۰۰۰
پروتئین ($mg\ g^{-1}$ FW)	۰/۰۳۲ ± ۰/۰۱۵	۰/۲۱۲ ± ۰/۰۱۲	۴	−۹/۲۸۹	۰/۰۰۱
فنل کل ($mg\ g^{-1}$ DW)	۷/۲۹۲ ± ۰/۱۹۴	۸/۱۴۷ ± ۰/۰۶۵	۴	−۴/۱۸۳	۰/۰۱۴
فلاونوئید ($mg\ g^{-1}$ DW)	۵/۱۱۹ ± ۰/۱۲۴	۱/۴۸۰ ± ۰/۰۲۶	۴	۲۸/۷۳۱	۰/۰۰۱



شکل ۴- مقایسهٔ میزان کافئیک‌اسید (A) و کوئرستین (B) برگ و ریزوم گلدان. حرف‌های متفاوت، اختلاف معنادار در سطح احتمال ۱ درصد را با آزمون t-test نشان می‌دهند.

مطابق نتایج مقایسهٔ عناصر معدنی در برگ گلدان و ریزوم گلدان، تنها ۱۲ عنصر از ۲۴ عنصر بررسی‌شده در هر دو اندام شناسایی شدند و تنها اختلاف ۹ عنصر باتوجه‌به آزمون t-test معنادار بود (جدول ۴) و اختلاف سه عنصر باریم، مس و منیزیم با اطمینان ۹۵ درصد معنادار نبود. میزان عناصر کلسیم، پتاسیم، منگنز و استرانسیم در برگ گلدان بیشتر از ریزوم گلدان بود؛ درحالی‌که میزان بیشتری از عناصر آلومینیوم، آهن، سدیم، کروم و روی در ریزوم گلدان مشاهده شد (جدول ۴).

جدول ۴- آزمون مقایسهٔ میانگین‌های t-test بر میزان برخی عناصر معدنی (mg g^{-1} DW) برگ و ریزوم گلدان *C. pictus*

	برگ گلدان	ریزوم گلدان	Df	t	p
آلومینیوم	۴/۹۳۰ ± ۰/۲۴۸	۶/۵۲ ± ۰/۱۵۶	۴	−۵/۴۲۴	۰/۰۰۶
باریم	۰/۰۱۸ ± ۰/۰۰۰۶	۰/۰۱۷ ± ۰/۰۰۰۶	۴	۰/۶۱۲	۰/۵۷۳
کلسیم	۴۷/۸۲ ± ۱/۱۵۵	۱۹/۷۶ ± ۱/۵۳۶	۴	۱۴/۶۰۶	۰/۰۰۰
مس	۰/۱۹۲ ± ۰/۰۰۳	۰/۱۹۹ ± ۰/۰۰۳	۴	−۱/۷۱۵	۰/۱۶۲
کروم	۰/۰۰۴ ± ۰/۰۰۰۳	۰/۰۰۷ ± ۰/۰۰۰۳	۴	−۷/۳۴۸	۰/۰۰۲
آهن	۱/۲۰۴ ± ۰/۰۸۶	۱/۹۳۷ ± ۰/۱۱۵	۴	−۵/۰۷۸	۰/۰۰۷
پتاسیم	۵۲/۴۰ ± ۱/۱۵۵	۴۵/۹۸ ± ۰/۸۶۶	۴	۴/۴۴۸	۰/۰۱۱
منیزیم	۱۳/۷۴ ± ۰/۸۶۶	۱۳/۸۹ ± ۰/۸۶۶	۴	−۰/۱۲۲	۰/۹۰۸
منگنز	۰/۲۴۰ ± ۰/۰۰۹	۰/۰۹۷ ± ۰/۰۰۱	۴	۱۶/۲۸۸	۰/۰۰۰
سدیم	۶/۰۸۵ ± ۰/۲۸۹	۱۴/۲۹ ± ۰/۵۷۷	۴	−۱۲/۷۱۹	۰/۰۰۰
استرانسیم	۰/۳۳۴ ± ۰/۰۲۲	۰/۱۴۰ ± ۰/۰۱۴	۴	۷/۳۷۵	۰/۰۰۲
روی	۰/۳۶۶ ± ۰/۰۰۶	۲/۲۷۳ ± ۰/۱۱۵	۴	−۱۶/۴۹۶	۰/۰۰۰

بحث

نتایج نشان دادند از میان قطعه‌های جداکشت استفاده‌شده، گره مناسب‌ترین اندام برای کشت بافت گیاه انسولین است. Biradar و همکاران (۲۰۱۳) نیز در مطالعهٔ مشابهی به مقایسهٔ ریزوم، چشم ریزوم، رأس ساقه و گره پرداختند و گره را مناسب‌ترین قطعهٔ جداکشت برای جوانه‌زنی معرفی کردند؛ البته در آزمایش‌های تکمیلی، کشت ریزوم نیز انجام شد، ولی ازآنجاکه ریزوم‌ها درون خاک قرار دارند و آلودگی بسیار زیادی دارند، باوجود به‌کارگیری روش‌های مختلف استریل‌کردن، هر بار تمام نمونه‌ها آلودگی نشان دادند.

در مطالعه‌هایی که روی کشت بافت این گونه و گونه‌های دیگر سردهٔ *Costus* انجام شده‌اند، تنوع زیادی از انواع اکسین و سیتوکینین دیده شده است. Jadhav و همکاران (۲۰۱۵) ترکیبی از سه نوع اکسین و دو نوع سیتوکینین را به کار بردند و موفق به جوانه‌زنی شدند. Ramasubramaniyan و همکاران (۲۰۱۵) نیز در مطالعهٔ مشابهی روی گونه *C. igneus*، ترکیبی از BAP، KIN، IAA و NAA را در جوانه‌زنی گره‌ها مؤثر دانستند. باتوجه‌به اینکه هدف پژوهش حاضر، تکثیر این گیاه در سطح تجاری است و بایستی با کمترین هزینه به بهترین نتیجه رسید، استفاده از هورمون‌های کمتر و رسیدن به درصد زیادی از جوانه‌زنی مقرون‌به‌صرفه خواهد بود که مطابق نتایج، تیمار واجد BA و NAA بر جوانه‌زنی مؤثر است. Robinson و همکاران (۲۰۰۹) نیز با کشت جداکشت گره از گونهٔ *C. igneus* در محیط‌کشت MS و با استفاده از تنظیم‌کننده‌های رشد مختلف مشاهده کردند پس‌از گذشت ۵ هفته از کشت با هر تیمار هورمونی، ساقه ایجاد می‌شود. در محیط‌کشت دارای غلظت‌های مختلف BAP و Kin، ساقه‌های زیادی تشکیل شدند و با افزایش غلظت سیتوکینین، کالوس هم افزایش یافت. در محیط‌کشت دارای غلظت زیاد IAA دیده شد رشد ساقه‌ها متوقف و تعداد کمتری

ساقه تولید می‌شود، اما ریشه‌زایی در غلظت‌های مختلف IAA و IBA بیشتر می‌شود و طول ریشه تا حد زیادی افزایش می‌یابد. در غلظت ۰/۲ میلی‌گرم‌درلیتر IBA، طول ریشه کاهش یافت و در محیط‌کشت حاوی IBA، ریشه‌ها سه هفته زودتر از محیط‌کشت حاوی IAA ایجاد شدند. Jadhav و همکاران (۲۰۱۵)، گرهٔ ساقه را برای ریزازدیادی *C. pictus* مناسب دانستند و بیشترین میزان ریزازدیادی (۸۰ درصد) را در تیمار هورمونی واجد BAP و IAA به‌ترتیب با غلظت‌های ۳ و ۰/۵ میلی‌گرم‌درلیتر گزارش کردند. Punyarani و Sharma (۲۰۱۲) بیشترین تولید جوانه از قطعهٔ جداکشت گرهٔ *C. pictus* را در تیمار حاوی ۰/۶ میکرومولار NAA و ۳ میکرومولار BAP گزارش کردند. نتایج پژوهش حاضر نیز ترکیب هورمونی BA و NAA به‌ترتیب با غلظت‌های ۳/۵ و ۰/۵ میلی‌گرم‌درلیتر با درصد جوانه‌زنی ۹۳/۳ درصد را بهترین تیمار برای جوانه‌زنی معرفی کردند.

نخستین‌بار است که مقایسهٔ برگ گلدانی و برگ درشیشه *C. pictus* انجام می‌شود و تنها یک گزارش وجود دارد که گیاه وحشی *C. igneus* و کالوس حاصل از آن را باهم مقایسه کرده است (Ramasubramaniyan *et al*., 2015). گیاهچه‌های رشدیافته در شرایط درشیشه معمولاً ریخت‌شناسی، فیزیولوژی و متابولیسم غیرطبیعی را نشان می‌دهند که نتیجه‌ای از شرایط کشت درشیشه مانند رطوبت زیاد هوا، آشفتگی‌های کم هوایی، تابش کم، CO_2 کم طی دورهٔ نوری، وجود غلظت‌های زیاد قند (منبع کربن) و هورمون‌های گیاهی و تغییرات ژنتیکی و اپی‌ژنتیکی است (Kozai and Smith, 1995; Isah, 2015). محتوای کلروفیل‌ها و آنتوسیانین‌ها (فلاونوئیدها) در بافت‌های ریحان رشدیافته در شرایط درشیشه نسبت به گیاهان رشدیافته در شرایط گلخانه کاهش می‌یابد (Kiferle *et al*., 2011) که مطابق نتایج پژوهش حاضر است؛ احتمالاً این کاهش ناشی از وجود قندها در محیط‌کشت و تابش کاهش‌یافته درون ظرف‌های کشت است (Kiferle *et al*., 2011). کاربرد برون‌زای سوکروز، محتوای کلروفیل در گیاه *Solanum tuberosum* را کاهش می‌دهد (Kovač and Ravnikar, 1998). آنتوسیانین‌ها قادرند آسیب اکسایش نوری را در برگ‌ها کاهش دهند و به‌طورکلی، زمانی غلظت آنها کاهش می‌یابد که گیاهان در تابش کم رشد داده شوند (Neill and Gould, 2003). کاهش تبادل گازی در ظرف‌های کشت ممکن است به انباشتگی اتیلن و CO_2 منجر شود که تجزیهٔ رنگیزه‌های فتوسنتزی را تحریک می‌کند (Lucchesini *et al*., 2006) و بنابراین می‌توان بیان کرد کاهش رنگیزه‌های فتوسنتزی و شدت نوری در شرایط درشیشه به کاهش شدت فتوسنتز و فرآورده‌های فتوسنتزی مانند قند منجر می‌شود؛ نتایج پژوهش حاضر نیز کاهش قند محلول برگ درشیشه را در مقایسه با برگ گلدانی نشان دادند؛ همچنین مشاهده شد محتوای فنل کل در برگ درشیشه بیشتر از برگ گلدان است. مطابق نتایج پژوهش حاضر، محتوای فنل کل در گیاهان *Cucumis anguria* L. باززایی‌شده در شرایط درشیشه بیشتر از گیاهان درزیوه (*in vivo*) است (Thiruvengadam and Chung, 2015). متابولیسم

ثانوی ممکن است از طریق شرایط محیطی مصنوعی فراهم‌شده با کشت مصنوعی و ترکیب محیط رشد تغییر یابد (Kiferle *et al*., 2011). مطالعه‌ها نشان داده‌اند نوع و غلظت تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی (PGRs) به‌ویژه اکسین‌ها و سیتوکینین‌ها، مسیرهای شیکیمات/فنیل‌پروپانوئید را که به سنتز اسیدهای فنلی منجر می‌شوند، تغییر می‌دهند و این تغییر احتمالاً از طریق تنظیم فعالیت آنزیم فنیل‌آلانین‌آمونیالیاز و چالکون‌سنتاز است (Thiruvengadam and Chung, 2015). نتایج پژوهش حاضر نشان دادند محتوای پروتئین محلول تحت‌تأثیر شرایط درشیشه قرارمی‌گیرد و به‌طور معناداری افزایش می‌یابد. برخلاف نتایج پژوهش حاضر، محتوای پروتئین در آواکادوهای ریزازدیادی‌شده به‌طور معناداری کاهش می‌یابد (Premkumar *et al*., 2001) و به نظر می‌رسد شرایط کشت درشیشه تأثیر ویژهٔ گونه‌ای دارد.

ترکیبات شیمیایی مختلفی در بافت‌ها و اندام‌های مختلف گیاه وجود دارند که می‌تواند به‌علت تفاوت در سنتز و انباشتگی وابسته به بافت مواد شیمیایی، شرایط فیزیولوژیکی بخش گیاهی و سطوح هورمون‌های درون‌زا باشد (Manivannan *et al*., 2015). در برخی گزارش‌ها به وجود مواد فیتوشیمیایی در اندام‌های مختلف گونه‌های مختلف گیاه انسولین مانند برگ، ریزوم و ساقه اشاره شده است (Thomas and Devi, 2013; Waisundara *et al*, 2015). بررسی صفت‌های فیتوشیمیایی ریزوم گیاه *C. pictus* نشان داده است عصارهٔ آبی- الکلی آن حاوی کربوهیدرات‌ها، فیتواسترول‌ها، ساپونین‌های گلیکوزیدی، فلاونوئیدها و تانن‌ها است (Thomas and Devi, 2013)؛ همچنین گزارش شده است برگ‌ها و ریزوم‌های *C. pictus* مقادیر کافی از پتاسیم، کلسیم، کروم، منگنز، مس و روی دارند (Jayasri *et al*., 2008) که مطابق با نتایج پژوهش حاضر است. فلاونوئیدها و مشتقات فنلی در برگ‌ها و ریزوم *C. igneus* شناسایی شده‌اند. ترکیبات ضددیابتی مانند کوئرستین (فلاونوئید) و دیوزژنین (ساپونین استروئیدی) از ریزوم *C. igneus* جداسازی شده‌اند (Hegde *et al*., 2014)؛ درحالی‌که نتایج پژوهش حاضر نشان دادند محتوای کوئرستین در برگ نسبت به ریزوم بیشتر است. همچنین گزارش شده است برگ‌های *C. igneus* غنی از پروتئین، آهن، اجزای پاداکساینده مانند آسکوربیک‌اسید، آلفا توکوفرول، بتاکاروتن، ترپنوئیدها، استروئیدها و فلاونوئیدها هستند (Devi and Urooj, 2010; Shankarappa *et al*., 2011) و بنابراین، میزان فلاونوئیدها به گونهٔ گیاهی، اندام و مرحلهٔ نموی بستگی دارد (Petrussa *et al*., 2013). وجود فلاونوئیدها سبب ارزشمندی گیاه انسولین می‌شود؛ زیرا مشخص شده است این گروه از ترکیبات، فعالیت‌های پاداکسایشی و اثر ضددیابتی دارند و فعالیت پاداکسایشی از نیروی کاهشی و توانایی روبشگری پراکسیدهیدروژن فلاونوئیدها ناشی می‌شود؛ همچنین مشخص شده است فعالیت مهاری ۸۱/۱ درصدی آنزیم آلفاآمیلاز به‌علت وجود فلاونوئیدها است (Waisundara *et al*., 2015). فلاونوئیدها علاوه‌بر فعالیت پاداکسایشی و روبشگری رادیکال‌های آزاد، در حفاظت در برابر اشعه UV و مولکول‌های علامت‌دهنده ایفای نقش می‌کنند (Gill and Tuteja, 2010).

نتیجه‌گیری

نتایج بهینه‌سازی کشت بافت گیاه انسولین نشان دادند از میان قطعه‌های جداکشت استفاده‌شده (برگ، گره و میانگره) و تیمارهای هورمونی مختلف، گره مناسب‌ترین اندام و تیمار واجد BA و NAA به‌ترتیب با غلظت های ۳/۵ و ۰/۵ میلی‌گرم‌درلیتر مناسب‌ترین تیمار است. بررسی‌های فیتوشیمیایی انجام‌شده نیز نشان دادند میزان فلاونوئیدها که مهم‌ترین عامل ضددیابتی گیاه انسولین است، در برگ گلدان بیشتر از برگ درشیشه و ریزوم است. تجزیه‌وتحلیل عناصر معدنی نشان دادند میزان کلسیم، منگنز و استرانسیم برگ گلدان حدود ۲/۵ برابر بیشتر از ریزوم و میزان روی ریزوم حدود ۶/۳ برابر بیشتر از میزان برگ گلدان است.

سپاسگزاری

نویسندگان از معاونت پژوهش و فناوری دانشگاه زنجان که حمایت مالی پژوهش حاضر را برعهده داشت، سپاسگزاری می‌کنند.

References

Ahmadi-Sakha, S., Sharifi, S., Niknam, V. and Ahmadian-Chashmi, N. (2018) Phenolic compounds profiling in shake flask and bioreactor system cell cultures of *Scrophularia striata* Boiss. In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant 54: 444-453.

Bakrudeen Ali Ahmad, A. and Arun Kumar, R. (2009) *In viro* propoagation of monocot (*Costus pictus* D. Don)- an antidiabetic medicinal plant. International Journal of Agricultural Technology 5: 361-369.

Biradar, S., Prasad, P. and Pandhure, N. (2013) *In vitro* propagation of *Costus pictus* (D.Don.). International Journal and Pharma Bio Science 4: 918-922.

Bradford, M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry 72: 248-254.

Chang, C., Yang, M., Wen, H. and Chern, J. (2002) Estimation of total flavonoid content in *Propolis* by two complementary colorimetric methods. Journal of Food and Drug Analysis 10: 178-182.

Devi, V. D. and Urooj, A. (2010) Nutrient profile and antioxidant components of *Costus specious* Sm. and *Costus igneus* Nak. Indian Journal of Natural Products and Resources 1: 116-118.

Gill, S. S. and Tuteja, N. (2010) Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. Plant Physiology and Biochemistry 48: 909-930.

Hegde, P. K., Rao, H. A. and Rao, P. N. (2014) A review on Insulin plant (*Costus igneus* Nak). Pharmacognosy Reviews 8: 67-72.

Isah, T. (2015) Adjusments to *in vitro* culture conditions and associated anomalies in plants. Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica 57: 9-28.

Jadhav, A., Waghmare, V. and Pandhure, N. (2015) Micro propagation studies in Insulin plant *Costus pictus* D.Don. International Journal of Advanced Research in Computer Science and Software Engineering 5: 607-609.

Jayasri, M. A., Gunasekaran, S., Radha, A. and Mathew, T. L. (2008) Anti-diabetic effect of *Costus pictus* leaves in normal and streptozotocin-induced diabetic rats. International Journal of Diabetes Metabolism 16: 117-122.

Jose, B. and Reddy, L. J. (2010) Analysis of the essential oils of the stems, leaves and rhizomes of the Medicinal plant *Costus pictus* from Southern India. International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences 2: 100-101.

Kiferle, C., Lucchesini, M., Mensuali-Sodi, A., Maggini, R., Raffaelli, A. and Pardossi, A. (2011) Rosmarinic acid content in basil plants grown *in vitro* and in hydroponics. Central European Journal of Biology 6: 946-957.

Kovač, M. and Ravnikar, M. (1998) Sucrose and jasmonic acid interact in photosynthetic pigment metabolism and development of potato (*Solanum tuberosum* L. cv. Sante) grown *in vitro*. Plant Growth Regulation 24: 101-107.

Kozai, T. and Smith, M. A. L. (1995) Environmental control in plant tissue culture general introduction and overview. In: Plant production in closed ecosystems (Eds. Goto, E., Kurata, K., Hayashi, M. and Saa, S.) 14: 301-318. Kluwer academic publishers, Dordrecht-Boston- London.

Lichtenthaler, H. K. and Wellburn, A. R. (1983) Determinations of total carotenoids and chlorophylls a and b of leaf extracts in different solvents. Biochemical Society Transactions 11: 591-592.

Lucchesini, M., Monteforti, G., Mensuali-Sodi, A. and Serra, G. (2006) Leaf ultrastructure, photosynthetic rate and growth of myrtle plantlets under different *in vitro* culture conditions. Biologia Plantarum 50: 161-168.

Manivannan, A., Sounararajan, P., Park, Y. G. and Jeong, B. R. (2015) *In vitro* propagation, phytochemical analysis and evaluation of free radical scavenging property of *Scrophularia kakudensis* Franch tissue extracts. BioMed Research International 2015: 1-11.

Murashige, T. and Skoog, F. (1962) A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture. Plant Physiology 15: 473-497.

Neill, S. O. and Gould, K. S. (2003) Anthocyanins in leaves: light attenuators or antioxidants. Functional Plant Biology 30: 865-873.

Petrussa, E., Braidot, E., Zancani, M., Peresson, C., Bertolini, A., Patui, S. and Vianello, A. (2013) Plant flavonoids-biosynthesis, transport and involvement in stress responses. International Journal of Molecular Sciences 14: 14950-14973.

Pourmorad, F., Hosseinimehr, S. J. and Shahabimaid, N. (2006) Antioxidant activity, phenol and flavonoid contents of some selected Iranian medicinal plants. African Journal of Biotechnology 5: 1142-1145.

Premkumar, A., Mercado, J. A. and Quesada, M. A. (2001) Effects of *in vitro* tissue culture conditions and acclimatization on the contents of rubisco, leaf soluble proteins, photosynthetic pigments and C/N ratio. Journal of Plant Physiology 158: 835-840.

Punyarani, K. and Sharma, J. G. (2012) Micropropagation and microrhizome induction in *Costus pictus* D. Don using *in vitro* and *ex vitro* nodal segments as explant. Notulae Scientia Biologicae 4: 72-78.

Ramasubramaniyan, M. R., Rajesh. K., Priya Dharishini, M., Krishna moorthy, M., Radha, A., Balasubramanian, K., Sai Shruti, B. and Raja Nandhini, S. (2015) Studies on optimization of medium in induction and regeneration of callus and shoot from *Costus igneus* and its phytochemical profile. Journal of Academia and Industrial Research 5: 75-80.

Robinson, J. P., Britto, S. J. and Balakrishnsn, V. (2009) Micropropagation of *Costus speciosus* (Koem. ex. retz) Sm., an anti-diabetic plant by using explants of pseudostems. Botany Research International 2: 182-185.

Roe, J. H. (1955) The determination of sugar in blood and spinal fluid with anthrone reagent. Journal of Biological Chemistry 212: 335-343.

Shankarappa, L., Gopalakrishna, B., Jagadish, N. R. and Siddalingappa, G. S. (2011) Pharmacognostic and phytochemical analysis of *Costus*

igneus. Internationale Pharmaceutica Sciencia 1: 36-41.

Thiruvengadam, M. and Chung, I. M. (2015) Phenolic compound production and biological activities from *in vitro* regenerated plants of gherkin (*Cucumis anguria* L.). Electronic Journal of Biotechnology 18: 295-301.

Thomas, S. A. J. U. and Devi, B. S. (2013) Phytochemical and in vitro anthelmintic studies of hydro-alcoholic extract of *Costus pictus* D. Don. International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences 5: 639-641.

Waisundara, V. Y., Watawana, M. I. and Jayawardena, N. (2015) *Costus speciosus* and *Coccinia grandi*: traditional medicinal remedies for diabetes. South African Journal of Botany 98: 1-15.

Waling, I., Vark, V., Houba, V. and Van Der Lee, J. (1989) Soil and plant analysis, a series of syllabi, part 7: Plant analysis procedures. Wageningen Agricultural University, Wageningen.