«پژوهشگر گرامی»

صفحاتی راکه مشاهده می فرمائید، گزیده ای محدود از یک سند پژوهشی طولانی است که شامل :

- صفحه روی جلد
- چکیده فارسی و انگلیسی
- صفحه اول مقدمه
- منابع
- فهرست مطالب
- پیشنهادات

برای مشاهده فرمت دیجیتالی پایان نامه ها / رساله ها می توانید به آدرس ذیل مراجعه کنید:

http://lib.uok.ac.ir:8080

در صورت به وجود آمدن هرگونه مشکل و پرسش در زمینه دسترسی، تهیه و استفاده از منابع الکترونیکی و دیجیتال به بخش پایان نامه ها و منابع دیجیتال کتابخانه مرکزی و مرکز اسناد مراجعه نموده و تماس بگیرید!

شماره تماس ۰۸۷-۳۳۶۲۴۰۰۶

دانشگاه کردستان
دانشکده کشاورزی
گروه علوم و مهندسی باغبانی

پایان‌نامه کارشناسی ارشد رشته علوم و مهندسی باغبانی
گرایش گیاهان دارویی

عنوان

تأثیر سدیم پیرووات و گلوکز بر خصوصیات مورفو-فیزیولوژیکی و فیتوشیمیایی پینه زعفران زاگرسی (*Crocus cancellatus* subsp. *damascenus*) در شرایط درون شیشه‌ای

پژوهشگر
فرزانه نوری

اساتید راهنما
دکتر علی اکبر مظفری
مرحوم دکتر ناصر قادری

استاد مشاور
دکتر جلال خورشیدی

آذر ۱۴۰۰

بسم الله الرحمن الرحيم

دانشگاه کردستان

دانشکده کشاورزی

گروه علوم و مهندسی باغبانی

پایان‌نامه کارشناسی ارشد رشته علوم و مهندسی باغبانی گرایش گیاهان دارویی

عنوان

تأثیر سدیم پیرووات و گلوکز بر خصوصیات مورفو-فیزیولوژیکی و فیتوشیمیایی پینه زعفران زاگرسی (*Crocus cancellatus* subsp *damascenus*) در شرایط درون شیشه‌ای

پژوهشگر

فرزانه نوری

اساتید راهنما

دکتر علی اکبر مظفری

مرحوم دکتر ناصر قادری

استاد مشاور

دکتر جلال خورشیدی

آذر ۱۴۰۰

دانشگاه کردستان
دانشکده کشاورزی
گروه علوم و مهندسی باغبانی

پایان‌نامه کارشناسی ارشد رشته مهندسی علوم و مهندسی باغبانی
گرایش گیاهان دارویی

عنوان

تأثیر سدیم پیرووات و گلوکز بر خصوصیات مورفو- فیزیولوژیکی و فیتوشیمیایی پینه زعفران زاگرسی (*Crocus cancellatus* subsp *damascenus*) در شرایط درون شیشه‌ای

پژوهشگر
فرزانه نوری

در تاریخ ۱۴۰۰/۹/۲۴ توسط کمیته تخصصی و هیأت داوران زیر مورد بررسی قرار گرفت و با درجه **عالی** به تصویب رسید.

هیأت داوران	نام و نام خانوادگی	مرتبه علمی	امضاء
۱- استاد راهنما اول	دکتر علی اکبر مظفری	دانشیار	
۲- استاد راهنما دوم	مرحوم دکتر ناصر قادری	دانشیار	
۳- استاد مشاور	دکتر جلال خورشیدی	استادیار	
۴- داور داخلی	دکتر فرزاد نظری	دانشیار	
۵- داور خارجی	دکتر یاور وفایی	دانشیار	

مهر و امضای معاون آموزشی و تحصیلات تکمیلی دانشکده

دانشکده کشاورزی
معاونت آموزشی و تحصیلات تکمیلی

چکیده

زعفران زاگرسی (*Crocus cancellatus* subsp *damascenus*) متعلق به خانواده زنبق (*Iridaceae*) است. مهم‌ترین ترکیبات زعفران شامل کروسین (عامل رنگ)، پیکروکروسین (عامل طعم) و سافرانال (عامل عطر) می‌باشد. با توجه به اهمیت این ترکیبات در صنایع غذایی و داروسازی هدف از این پژوهش بررسی اثر سدیم پیرووات و گلوکز بر خصوصیات مورفو- فیزیولوژیکی و کمیت و کیفیت متابولیت‌های ثانویه پینه زعفران زاگرسی در شرایط درون شیشه‌ای بود. این تحقیق در قالب ۳ آزمایش طراحی و اجرا گردید. آزمایش اول جهت بهینه‌سازی محیط کشت پایه به صورت فاکتوریل بر پایه طرح کاملاً تصادفی با دو فاکتور محیط کشت (MS، نیم غلظتMS، نیم غلظت B_5 ، B_5) و ترکیبات تنظیم کننده رشدی شامل: اکسین‌ها (NAA (۳ و ۵ میلی گرم در لیتر)، IBA (۳ و ۵ میلی گرم در لیتر) و 2,4-D (۲ میلی گرم در لیتر) و یک نوع سیتوکینین BA (نیم میلی گرم در لیتر) اجرا شد. نتایج نشان داد که بهترین محیط کشت پایه جهت پینه‌زایی زعفران، محیط کشت نیم غلظتMS است. آزمایش دوم جهت دستیابی به بهترین ترکیبات تنظیم کننده رشدی جهت پینه‌زایی، واکشت و نگهداری پینه‌ها، بر پایه طرح کاملاً تصادفی طراحی گردید. نتایج مشخص نمود که ترکیب تنظیم کننده رشدی (۳ میلی گرم در لیتر) NAA و (نیم میلی گرم در لیتر)BA با ۶۹/۰۴ درصد بهترین بود. آزمایش سوم به صورت فاکتوریل بر پایه طرح کاملاً تصادفی با دو عامل سدیم پیرووات (صفر، ۱۰، ۲۰، ۵۰ و ۱۰۰ میکرومولار) و گلوکز (۱۵، ۳۰، ۶۰ و ۹۰ گرم در لیتر) در ۳ تکرار انجام گرفت. نتایج نشان داد تیمارهای سدیم پیرووات و گلوکز باعث افزایش وزن تر، وزن خشک و فلاونوئید کل پینه نسبت به شاهد شد. بیشترین فعالیت ضد اکسایشی کل پینه (۱۰/۱ میلی‌گرم عصاره تر در گرم وزن تر) در تیمار ۱۰ میکرومولار سدیم پیرووات و۶۰ گرم گلوکز مشاهده گردید. در تیمار ۲۰ میکرومولار سدیم پیروات و۹۰ گرم گلوکز بیشترین مقدار فنل کل پینه با (۱۱۷/۷ میلی‌گرم گالیک اسید در گرم وزن تر) بود. همچنین با توجه به نتایج حاصل از تجزیه و تحلیل کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC) بیشترین مقدار کروسین ۳۰ میلی‌گرم در گرم وزن خشک پینه در تیمار۵۰ میکرومولار سدیم پیرووات و ۳۰ گرم در لیتر گلوکز و بیشترین مقدار پیکروکروسین ۲۷ میلی‌گرم در گرم وزن خشک پینه در تیمار ۱۰ میکرومولار سدیم پیرووات و ۱۵ گرم در لیتر گلوکز بدست آمد. همچنین براساس آنالیز HPLC مقدار سافرانال در هیچ کدام از تیمارها به دست نیامد.

کلمات کلیدی: پینه، زعفران زاگرسی، سدیم پیرووات، گلوکز، متابولیت‌های ثانویه.

فهرست مطالب

عنوان | صفحه

مقدمه ۱

فصل اول (بررسی منابع) ۸

۱-۱- اهمیت کشت بافت گیاهان دارویی ۹

۱-۲- زعفران ۹

۱-۲-۱- زعفران زاگرسی ۱۰

۱-۲-۲- ترکیبات زعفران ۱۱

۱-۳- ترپن‌ها ۱۲

۱-۳-۱- کاروتنوئیدها ۱۲

۱-۳-۲- بیوسنتز کاروتنوئیدها ۱۳

۱-۴- محیط‌های کشت ۱۴

۱-۴-۱- تنظیم کننده‌های رشد ۱۵

۱-۴-۱-۱- اکسینها ۱۵

۱-۴-۱-۲- سیتوکینینها ۱۵

۱-۵- پینه‌زایی ۱۶

۱-۶- تأثیر محرک‌ها بر میزان متابولیت‌های ثانویه ۱۷

۱-۷- تأثیر گلوکز بر میزان متابولیت‌های ثانویه ۱۸

۱-۸- تأثیر پیش‌ماده بر میزان متابولیت ثانویه ۱۹

۱-۸-۱- سدیم پیرووات ۲۰

فصل دوم ۸

مواد و روش‌ها ۸

۲-۱- مکان و زمان انجام آزمایش ۲۲

۲-۲- جمع آوری نمونه گیاهی ۲۲

۲-۳- تهیه محیط کشت موراشیک و اسکوگ (MS) و گامبورک (B5) ۲۲

۲-۳-۱- تهیه محلول‌های پایه عناصر غذایی ۲۲

۲-۳-۲- تهیه محلول پایه تنظیم کننده‌های رشد گیاهی ۲۲

۲-۳-۳- تهیه محیط کشت ۲۳

۲-۴- استریلیزاسیون ۲۴

۲-۴-۱- استریلیزاسیون محیط کشت ۲۴

فهرست مطالب

عنوان **صفحه**

۲-۴-۲- استریلیزاسیون ابزار و هود لامینار ۲۴
۲-۴-۳- ضدعفونی نمونه‌های گیاهی ۲۴
۲-۵- بهینه سازی محیط کشت پایه (آزمایش اول) ۲۵
۲-۶- بهینه‌سازی ترکیبات تنظیم کننده رشد محیط کشت (آزمایش دوم) ۲۵
۲-۷- اعمال تیمارهای سدیم پیرووات و گلوکز (آزمایش سوم) ۲۶
۲-۸- طرح آزمایشی ۲۷
۲-۹- اندازه‌گیری ویژگی‌های مورفولوژیکی ۲۷
۲-۹-۱- اندازه‌گیری وزن تر و خشک پینه ۲۷
۲-۹-۲- اندازه‌گیری درصد پینه‌زایی ۲۷
۲-۱۰- اندازه‌گیری ویژگی‌های فیزیولوژیکی ۲۸
۲-۱۰-۱- استخراج عصاره ۲۸
۲-۱۰-۲- فنل کل ۲۸
۲-۱۰-۳- فلاونوئید کل ۲۹
۲-۱۰-۴- فعالیت ضد اکسایشی کل ۳۰
۲-۱۱- اندازه‌گیری ترکیبات فیتوشیمیایی ۳۰
۲-۱۱-۱- تهیه عصاره ۳۰
۲-۱۱-۲- شرایط دستگاهی HPLC برای تعیین ترکیبات زعفران ۳۱
۲-۱۱-۳- آماده سازی محلول‌های استاندارد ۳۱
۲-۱۲- تجزیه آماری داده‌ها و نرم‌افزارهای مورد استفاده ۳۳
فصل سوم ۳۶
نتایج و بحث ۳۶
۳-۱- نتایج بهینه سازی محیط کشت ۳۵
۳-۱-۱- نتایج آزمایش اول (بهینه‌سازی محیط کشت پایه) ۳۵
۳-۱-۲- نتایج آزمایش دوم (بهینه‌سازی ترکیب تنظیم کننده رشد محیط کشت) ۳۸
۳-۲- نتایج خصوصیات پینه ۴۰
۳-۲-۱- وزن تر و خشک پینه ۴۰
۳-۲-۲- خصوصیات فیزیولوژیکی ۴۶
۳-۳- خصوصیات فیتوشیمیایی ۵۵

فهرست مطالب

عنوان **صفحه**

۳-۳-۱- کروسین ۵۵

۳-۳-۲- پیکروکروسین ۵۷

۳-۳-۳- سافرانال ۶۴

۳-۴- نتیجه‌گیری کلی ۶۴

۳-۵- پیشنهادات ۶۵

منابع ۳۱

پیوست ۸۵

دانشگاه کردستان University of Kurdistan

فهرست جداول

عنوان **صفحه**

جدول۲-۱: ترکیب و غلظت عناصر موجود در چهار محلول پایه مورد استفاده برای تهیه محیط کشت ۲۳

جدول۲-۲: محیط کشت پایه و ترکیبات تنظیم کننده رشد ۲۵

جدول۲-۳: ترکیبات تنظیم کننده رشد ۲۶

جدول۲-٤: تیمارهای سدیم پیرووات و گلوکز ۲۶

جدول۳-۱: تجزیه واریانس داده‌های مربوط به درصد پینه‌زایی گیاه زعفران زاگرسی تحت تأثیر محیط کشت و ترکیبات تنظیم کننده رشد ۳۶

جدول۳-۲: تجزیه واریانس داده‌های درصد پینه‌زایی تحت تأثیر ترکیبات تنظیم کننده رشد در محیط کشت نیم غلظت MS ۳۸

جدول۳-۳: تجزیه واریانس داده‌های مربوط به وزن تر پینه زعفران زاگرسی تحت تأثیر سدیم پیرووات و گلوکز ۴۱

جدول۳-٤: تجزیه واریانس داده‌های مربوط به وزن خشک پینه زعفران زاگرسی تحت تأثیر سدیم پیرووات و گلوکز ۴۳

جدول۳-۵: تجزیه واریانس داده‌های مربوط به فنل کل پینه زعفران زاگرسی تحت تأثیر سدیم پیرووات و گلوکز ۴۶

جدول۳-٦: تجزیه واریانس داده‌های مربوط به فلاونوئید پینه زعفران زاگرسی تحت تأثیر سدیم پیرووات و گلوکز ۴۹

جدول۳-۷: تجزیه واریانس داده‌های مربوط به فعالیت ضد اکسایشی پینه گیاه زعفران زاگرسی تحت تأثیر سدیم پیرووات و گلوکز ۵۲

جدول۳-۸: تجزیه واریانس داده‌های مربوط به کروسین پینه زعفران زاگرسی تحت تأثیر سدیم پیرووات و گلوکز ۵۵

جدول۳-۹: تجزیه واریانس داده‌های مربوط به پیکروکروسین پینه زعفران زاگرسی تحت تأثیر سدیم پیرووات و گلوکز ۵۷

جدول۳-۱۰: فرمول شیمیایی، وزن مولکولی و زمان بازداری ترکیبات زعفران ۵۹

جدول۳-۱۱: مقایسه میانگین اثر متقابل سدیم پیرووات و گلوکز بر مقدار ترکیبات پینه زعفران زاگرسی ۶۰

فهرست شکل‌ها

عنوان **صفحه**

شکل ۱-۱: چرخه بیولوژیکی زعفران.دوره جوانه زنی از اواخر مرداد تا اواسط مهر، دوره گلدهی اواخر مهر تاآبان، دوره رشدی سبز اواسط آبان تا اواخر اسفند، دوره رکورد اردیبهشت تا مرداد..... ۱۰

شکل ۱-۲: خصوصیات مورفولوژیکی زعفران زاگرسی ۱۱

شکل ۱-۳: ساختار مولکولی مهم‌ترین ترکیبات زعفران (FERNANDEZ, 2006) ۱۲

شکل ۱-٤: مسیر بیوسنتزی متیل اریتریتول فسفات (MEP) و موالونات (MVA) (ESTÉVEZ ET (AL., 2000) ۱٤

شکل ۱-۵: مسیر بیوسنتز ترکیبات زعفران : کروسین (CROCIN)، پیکروسین (PICROCIN) و سافرانال (SAFRANAL) (GIULIANO ET AL., 2003). ۱٤

شکل ۲-۱: منحنی استاندارد اسیدگالیک ۲۹

شکل ۲-۲: منحنی استاندارد کاتکین ۳۰

شکل ۲-۳: منحنی استاندارد کروسین ۳۲

شکل ۲-٤: منحنی استاندارد پیکروکروسین ۳۲

شکل ۲-۵: منحنی استاندارد سافرانال ۳۲

شکل ۳-۱: مراحل تولید پینه در ریز نمونه کورم کشت شده زعفران زاگرسی روی محیط کشت پایه MS:..... ۳۵

شکل ۳-۲: مقایسه میانگین درصد پینه‌زایی تحت تأثیر ترکیبات تنظیم کننده رشد ۳۷

شکل ۳-۳: مقایسه میانگین ترکیبات تنظیم کننده رشد محیط کشت نیم غلظت MS ۳۸

شکل ۳-٤: مقایسه میانگین داده‌های مربوط یه وزن تر پینه زعفران زاگرسی تحت تأثیر سدیم پیرووات و گلوکز. ٤۲

شکل ۳-۵: مقایسه میانگین داده‌های مربوط به وزن خشک پینه زعفران زاگرسی تحت تأثیر سدیم پیرووات و گلوکز ٤٤

شکل ۳-٦: مقایسه میانگین فنل کل پینه زعفران زاگرسی تحت تأثیر سدیم پیرووات و گلوکز . ۵٤

شکل ۳-۷: مقایسه میانگین مربوط به فلاونوئید پینه زعفران زاگرسی تحت تأثیر سدیم پیرووات و گلوکز ۵٦

شکل ۳-۸: مقایسه میانگین داده‌های مربوط به فعالیت ضد اکسایشی پینه گیاه زعفران زاگرسی تحت تأثیر سدیم پیرووات و گلوکز ۵۳

شکل ۳-۹: مقایسه میانگین داده‌های مربوط به کروسین پینه زعفران زاگرسی تحت تأثیر سدیم پیرووات و گلوکز ۵٦

عنوان **صفحه**

شکل۳-۱۰: مقایسه میانگین داده‌های مربوط به پیکروکروسین پینه زعفران زاگرسی تحت تأثیر سدیم پیرووات و گلوکز ۵۸
شکل۳-۱۱: کروماتوگرامHPLC استاندارد پیکروکروسین ٦٣
شکل۳-۱۲: کروماتوگرامHPLC استاندارد کروسین ٦٣
شکل۳-۱۳: کروماتوگرام HPLC استاندارد سافرال ٦٣
شکل۳-۱٤: کروماتوگرامHPLC ترکیبات عصاره متانولی پینه زعفران زاگرسی ٦٤

دانشگاه کردستان
University of Kurdistan

مقدمه

کشور پهناور ایران با آب وهوای متنوع جزء مراکز مهم پراکنش بسیاری از گونه‌های گیاهی است. همچنین رویشگاه اصلی بسیاری از گونه‌های دارویی با ارزش می‌باشد که سازگاری مناسبی با محیط داشته و عملکرد و مواد موثره نسبتاً بالایی دارند. شناخت گیاهـان دارویی و اسـتفاده از آن‌هـا از قـدیم مورد توجه محققین بوده است به طوری که شناسایی و بررسی ترکیبات شیمیایی آن‌ها علاوه بر درمـان آسـان‌تر و ارزان‌تر بیماری‌ها کمک می‌کند، از خارج شدن بخشی از ثروت کشور نیز برای واردات این گونه کالاها و یا فرآورده‌های آن‌ها جلوگیری می‌کند (اسمعیل‌زاده بهابادی و شریفی، ۱۳۹۲). امروزه برای درمان و حفظ سلامتی انسان تاکید زیادی بر استفاده از داروهایی با منشأ طبیعی می‌شود (راعی و همکاران، ۱۳۹۷). مواد موثره موجود در داروهای گیاهی در بدن تجمع پیدا نمی‌کنند و اثرات جانبی از خود به جای نمی‌گذارند و این عوامل سبب برتری آن‌ها نسبت به داروهای شیمیایی شده است (قاسمی، ۱۳۹۰).

داروهای گیاهی به دلیل نزدیکی و سازگاری با فیزیولوژی بدن انسان در مقایسه با داروهای شیمیایی خطرات و اثرات جانبی کمتری دارند که این ویژگی یکی از دلایل اصلی رویکرد و تمایل دوباره مردم جهان به استفاده از آن‌ها در مقایسه با داروهای شیمیایی و سنتزی شده است (Patel and Krishnamurthy, 2013). اگر چه تقاضا برای گیاهان دارویی افزایش یافته است اما بسیاری از این گیاهان دارای زیستگاه‌های محدود هستند و تولید آنها به شدت به شرایط محیطی و قارچ‌های هم‌زیست وابسته است (امیدی و فرزین، ۱۳۹۱).

چین، یونان باستان و مصر در کاربرد گیاهان دارویی در میان ملل دیگر، سابقه طولانی‌تری دارند (رئوفی‌راد و همکاران، ۱۳۹۵). گیاهان دارویی از هزاران سال پیش به عنوان منبع درمان بیماری‌های مختلف کاربرد داشته‌اند. اگر چه مصرف گیاهان دارویی با توسعه و پیشرفت داروهایی شیمیایی که به اشکال گوناگون تولید می‌شوند محدود شده است (منصوری، ۱۳۷۲). جنس زعفران (*Crocus*) متعلق به خانواده *Iridaceae* است. این خانواده شامل ۶۰ جنس و ۱۵۰۰ گونه است (ابراهیم‌زاده و همکاران، ۱۳۸۵). زعفران گیاهی علفی، چند ساله، بدون ساقه و دارای برگ‌های باریک سوزنی شکل است (GowharAli *et al*., 2013). این جنس ۸ گونه وحشی و یک گونه زراعی دارد. زعفران مشبک زیر گونه دمشق (*Crocus cancellatus* subsp. *damascenus*) یکی از گونه‌های وحشی است که زیستگاه آن ایران، عراق و ترکیه می‌باشد.

زعفران زاگرسی(*Crocus cancellatus* subsp. *damascenus*) به ارتفاع ۱۰ سانتیمتر، ۱ تا ۳ عدد گل به رنگ سفید تا آبی سوسنی پررنگ بوده که در سطح خود رگه‌هایی به رنگ ارغوانی

تیره‌تر داشته و در اوایل پاییز ظاهر می‌شوند، تعداد برگ‌ها ۳ تا ۴ عدد می‌باشد که در زمستان و یا اوایل بهار ظاهر می‌شوند (مظفریان، ۱۳۸۷).

اگر چه منشأ زعفران ناشناخته است، اما براساس برخی شواهد و مستندات، مبدأ اولیه آن در دامنه‌های کوه الوند و زاگرس در سرزمین ماد باستان بوده که بعداً کشت آن به سایر مناطق گسترش یافته است (Abrishami, 2004). گفته می‌شود ایرانیان اولین مردمانی بوده‌اند که به کشت وکار زعفران پرداخته‌اند (دادخواه و همکاران، ۱۳۸۹). کشت این گیاه در ایران، هند، یونان، مراکش، اسپانیا، ایتالیا، ترکیه، فرانسه، پاکستان، آذربایجان، چین، مصر، ژاپن و اخیراً در استرالیا انجام می‌شود (تاجیک و همکاران، ۱۳۹۱). پراکنش جغرافیایی زعفران در ایران شامل استان خراسان (قائنات، بیرجند، گناباد)، یزد، کرمان، گیلان و مازندران است. در کشورهایی هم‌چون انگلستان، چین و هند در جشن‌ها و مراسم مذهبی در تهیه مواد غذایی رنگین و متنوع دارای اهمیت است. همچنین رومیان از آن به عنوان عطر و گل زینتی برای تزئین استفاده می‌کردند (Salehi Surmaghi, 2006).

زعفران به دلیل طعم، عطر و رنگ زرد خاصی که دارد به طور قابل ملاحظه‌ای در صنایع شرینی‌سازی، داروسازی و به عنوان گران‌بهاترین ادویه جهان کاربرد دارد، استفاده از آن به عنوان افزودنی غذا بخشی از ارزش سنتی زعفران محسوب می‌شود، و به مقدار کمتر در رنگ کردن منسوجات یا ساخت عطر استفاده می‌شود (Basker and Negbi, 1983). زعفران دارای خواصی از جمله آرام بخش، اشتهاآور، ضد اسپاسم، پیشگیری کننده از بیماری‌های قلبی بوده و در درمان بیماری‌های چشمی، بیماری آسم، عفونت ادراری، یرقان، پیش انداختن قاعدگی، رفع نفخ شکم، درمان کم خونی و درمان معده درد کاربرد دارد (Abdullaev *et al*., 2003). مهم‌ترین ترکیبات آپوکاروتنوئیدی موجود در کلاله زعفران شامل کروسین (عامل رنگ)، پیکروکروسین (عامل طعم) و سافرانال (عامل عطر) می‌باشند (ابراهیم‌زاده و همکاران، ۱۳۸۵).

تأثیر عصاره زعفران علیه طیف وسیعی از تومورها در موش و سلول‌های انسانی گزارش شده است (Nair et al., 1995). گزارش شده که عامل سقط جنین است (Sampathu et al., 1984). یافته‌های پژوهش‌های جدید نشان داده‌اند که استفاده از زعفران همراه با داروی‌های شیمیایی ضد افسردگی نتایج بهتری را در بهبود افسردگی به دست می‌دهد (Lopresti, 2017). نقش حفاظتی آن در برابر آسیب‌های کروموزومی گزارش شده است (Premkumar *et al*., 2001). در غرب ایران قسمت زیرزمینی (کورم) زعفران زاگرسی، به عنوان گیاه خوراکی خودرو به صورت سرخ شده، کباب شده و آب‌پز مصرف می‌شود (Masoumi, 2001).

گیاهان عالی، علاوه بر متابولیت‌های اولیه ضروری (مانند کربوهیدارت‌ها، لیپیدها و آمینواسیدها)، مقادیر وسیعی از ترکیبات با وزن مولکولی پایین تولید می‌کنند که متابولیت‌های ثانویه نامیده می‌شوند (محمدی فارسانی و قاسمی پیربلوطی، ۱۳۹۲). متابولیت‌های ثانویه، مواد آلی شیمیایی پیچیده‌ای هستند که در فرآیندهای اولیه‌ی حیات گیاه نقش قابل توجهی ندارند، اما در سازگاری آن با محیط پیرامون دارای نقش هستند (Oksman-Caldentey and Inze, 2004). متابولیت ثانویه گروه بزرگ و متنوعی از مواد آلی هستند که پراکنش محدودی در سلسله‌های گیاهی دارند (اسمعیل‌زاده بهابادی و شریفی،۱۳۹۲) و از متابولیت‌های اولیه که برای حفظ حیات موجود ضروری هستند، تولید می‌شوند. گزارش شده این محصولات ثانویه برای گیاهان و جانورانی که آنها را سنتز می‌کنند، مفید هستند (Facchini and Pierre, 2005). این ترکیبات منحصر به گونه، نژاد و اغلب در طی یک دوره رشد و نموی خاص در گیاه تولید می‌شوند و دارای عملکردهای اکولوژیکی مهم در گیاهان هستند (Wink., 2010).

گیاهان فاقد حرکت هستند، بنابراین برای حفظ حیات خود بایستی استراتژی‌هایی را به کارگیرند. تولید متابولیت ثانویه یکی از این استراتژی‌ها است که در گیاهان نقش حفاظتی در مقابل علف‌خواران و عوامل بیماری‌زای میکروبی و قارچی دارند (عنبری و همکاران، ۱۳۹۴). همچنین باعث جذب حشرات گرده افشان می‌شوند و کاربردهای تجاری فراوانی به عنوان دارو، رنگ، حشره‌کش و چاشنی از لحاظ طعم و بو دارند (Zaho *et al*., 2005). تولید این ترکیبات بسیارکم است (کمتر از یک درصد وزن خشک گیاه) و به مراحل تکامل و فیزیولوژیک گیاه بستگی دارد (Oksman-Caldentey and Inze, 2004). علاوه بر فرآیندهای اولیه بیوسنتز قند و آمینواسید، سه مسیر اصلی بیوسنتز متابولیت‌های ثانویه وجود دارد که شامل: مسیرهای مالونات، موالونات و اسید شیکمیک است (Dewick, 2009). طبقه‌بندی متابولیت‌های ثانویه گیاهان براساس مسیرهای بیوسنتز آنها صورت می‌گیرد (Christen, 2000). متابولیت‌های ثانویه در سه خانواده مولکولی بزرگ، گروه ترکیبات نیتروژن‌دار، ترپن‌ها و فنل‌ها قرار می‌گیرند (Bourgaud *et al*., 2001).

متابولیت‌های ثـانویه عمدتاً به منظور دفع آفات، جذب حشرات گرده افشان و مبارزه با بیماری‌های میکروبی در گیاه تولید می‌شوند. مواد معطر، مواد موثره دارویی، چاشنی‌ها، شیرین کننده‌های طبیعی، فرمون‌ها، حشره‌کش‌ها، علف‌کش‌ها، قارچ‌کش‌ها، تنظیم کننده رشدهای گیاهی و مواد آللوپاتیک از این جمله می‌باشند (امیدی و فرزین، ۱۳۹۱). بـا توجـه بـه اهمیت اقتصادی متابولیت‌های ثـانویه، غلظت پایین این ترکیبات در گیاه و نیـز محدود بـودن گونه‌های

گیاهی در رویشگاه‌های طبیعی (Wink, 2010) و از طرفی دیگر به دلیل برداشت بی‌رویه گیاهان دارویی از رویشگاه‌ها جهت استحصال ترکیبات مؤثره دارویی سبب شده برخی از این گیاهان در معرض انقراض قرار گیرند. بنابراین تولید این فرآورده‌ها از طریق سایر تکنیک‌ها امری اجتناب ناپذیر است. یکی از مهم‌ترین این تکنیک‌ها استفاده از فناوری‌های زیستی مانند کشت بافت است (عنبری و همکاران، ۱۳۹۴).

کشت بافت در زمینه گیاهان دارویی کاربردهای متعددی دارد که مهم‌ترین آنها عبارتند از: تکثیر انبوه و سریع گیاهان دارویی یکنواخت از لحاظ محتوای ژنتیکی و کیفی، حفظ گونه‌های گیاهی در حال انقراض از طریق نگهداری در شرایط انجماد و تولید متابولیت‌های ثانویه در شرایط درون شیشه‌ای از طریق کشت سوسپانسیون سلولی، پینه و اندام (Mulabagal and Tsay, 2004). تولید این فرآورده‌ها از طریق کشت سلول‌های گیاهی و پینه به صورت یک رویکرد مهم در تحقیقات کشت بافت در آمده‌است، به طوری که در بعضی موارد میزان متابولیت‌های ثانویه موجود در سلول‌های کشت شده از بافت، خیلی بیشتر از میزان آن در گیاه کامل است و یا گاهی سلول‌های کشت شده، متابولیت‌هایی تولید می کنند که درگیاه اولیه تولید نمی‌شود (Mewis *et al*, 2011). با توجه به اینکه در طبیعت سرعت تولید متابولیت‌های ثانویه کند می‌باشد، استفاده از تکنیک‌های کشت سلول گیاهی و پینه در شرایط درون شیشه‌ای این موقعیت را فراهم می کند که تولید در شرایط کنترل شده و در زمان کوتاه‌تری انجام گیرد (Ravishankar and Ramachandra, 2000). روش‌های مختلفی به منظور افزایش تولید متابولیت‌های ثانویه در کشت بافت گیاهی استفاده می‌شوند که شامل استفاده از محرک‌ها، افزودن پیش‌ماده‌ها، بهینه‌سازی محیط کشت، کشت ریشه‌های موئین و مهندسی متابولیت است (Raoa and 2002 .(Ravishankar,

به دلیل این که کاروتنوئیدها ترکیبات رنگی مهمی در گل‌ها، غذاها و میوه‌ها هستند و نیز به دلیل خاصیت ضد اکسایشی، مسیر بیوسنتزی آنها مورد توجه مهندسان متابولیت قرار دارد (حسین پور آزاد و همکاران، ۱۳۹۵). آپوکاروتنوئیدها حاصل از شکست اکسیداتیوی کارتنوئیدهای C40 بوده و متابولیسم آنها در گل‌های زعفران درکروموپلاست‌های کلاله اتفاق می‌افتد. ولی در دیگر گیاهان این عمل در کلروپلاست‌ها رخ می‌دهند. در کلاله مخلوط پیچیده‌ای از ترکیبات فرار و غیر فرار که نقش عمده‌ای در تعیین عطر و طعم دارند، وجود دارد (Gomez *et al*., 2010).

ترپنوئیدها در گیاهان از دو مسیر، موالونات (MVA) با پیش‌ماده استیل کوآنزیم A و مسیر مستقل از موالونات (MEP) با دو پیش‌ماده پیرووات وگلیسرآلدئید-۳- فسفات در گیاهان سنتز

با توجه به آزمایشات انجام شده مناسب‌ترین نوع ریزنمونه، قطعات جدا شده از دیواره کورم بود که حاوی مریستم است. بهترین ترکیبات تنظیم کننده رشد جهت القا و واکشت برای نگهداری و تکثیر پینه، ترکیبات NAA(3)+ BA(0.5) بود. در توضیح این یافته می‌توان گفت از یک طرف، گلوکز با ایجاد تنش اسمزی در سلول‌ها و از طرف دیگر سدیم پیرووات با تاثیر بر آنزیم‌های مسیر بیوسنتز متابولیت‌های ثانویه و در ادامه فعال کردن آن‌ها، باعث افزایش ترکیبات فنلی، فلانوئیدی و فعالیت ضد اکسایشی می‌گردد.

یافته دیگر حاصل از تجزیه و تحلیل داده‌ها این بود که سدیم پیرووات از طریق تولید NADH انرژی تولید می‌کند و با اثر ترکیبی گلوکز (محصول نهایی فتوسنتز و تامین کننده انرژی سلول‌ها) باعث افزایش وزن تر و خشک زعفران زاگرسی می‌شود. بهترین اثر ترکیبی، ۳۰ گرم گلوکز و ۵۰ میکرومولار سدیم پیرووات جهت افزایش متابولیت ثانویه کروسین بود و همچنین غلظت ۱۰ میکرومولار سدیم پیرووات و ۱۵ گرم گلوکز، بهترین غلظت جهت افزایش پیکروکروسین بود.

۳-۵- پیشنهادات

- با توجه به اینکه پژوهش حاضر بر پینه روی محیط کشت جامد انجام شد، ادامه این پژوهش در سوسپانسیون سلولی جهت دستیابی به نتایج دقیق‌تر پیشنهاد می‌گردد.
- نظر به اینکه کلاله زعفران قسمت با ارزش و اقتصادی است و متابولیت‌های ثانویه مهم آن در کلاله وجود دارد، تولید ساختارهای کلاله مانند در شرایط درون شیشه‌ای پیشنهاد می‌شود.
- بررسی اثر سدیم پیرووات و گلوکز بر ویژگی‌های مورفو- فیزیولوژیکی و فیتوشیمیایی سایر گونه‌های زعفران
- بررسی اثر سایر پیش‌سازها و محرک‌ها بر ویژگی‌های مورفو- فیزیولوژیکی زعفران زاگرسی
- بررسی و مقایسه متابولیت‌های ثانویه زعفران زاگرسی با زعفران زراعی تحت تأیر سدیم پیرووات و گلوکز
- نظر به اینکه ترکیب سافرانال در هیچ کدام از تیمارها مشاهده نگردید، پیشنهاد می‌شود در پژوهش‌های بعدی این ترکیب با کرماتوگرافی گازی GC-MS اندازه‌گیری شود.

منابع

ابراهیم‌زاده، ح. رجبیان، ط. کریمیان، ر. ابریشم‌چی، پ. و صبورا، ع. ۱۳۸۵. زعفران ایران با نگاه پژوهشی. انتشارات اطلاعات، تهران، صحفه ۶۴۴.

اسمعیل‌زاده بهابادی، ص. و شریفی، م. ۱۳۹۲. افزایش تولید متابولیت‌های ثانوی گیاهی با استفاده از الیسیتورهای زیستی. مجله سلول و بافت، جلد۴، شماره ۲، صفحات ۱۲۸-۱۱۹.

اصغری، غ. و سلیمان‌ریزی، ط. ۱۳۸۷. تاثیر قندهای فروکتوز، گلوکز و ساکارز بر تولید فلاونولیگنان‌ها در کشت کالوس گیاه خارمریم. فصلنامه گیاهان دارویی، سال هفتم، دوره دوم، شماره مسلسل ۲۶.

افخمی حور، ف. زارع، ن. اصغری زکریا، ر. مهدی‌زاده، م. و فیروزی، ب. ۱۳۹۹. تأثیر امواج فراصوت،دما، نور، کیتوسان و تنظیم کننده‌های رشد گیاهی بر پینه‌زایی زعفران (*Crocus sativus* L.). نشریه زراعت و فناوری زعفران، جلد۸، شماره ۳، صفحه ۳۷۵- ۳۶۱.

امیدی، م. و فرزین، ن. ۱۳۹۱. راهکارهای بیوتکنولوژی در افزایش کارآیی گیاهان دارویی. مجله ژنتیک نوین، جلد ۷، شماره ۳، صفحات ۲۲۰-۲۰۹.

ایران بخش، ع. ۱۳۸۳. بهینه‌سازی رشد و تولید آلکالوئیدهای تروپانی درکشت سوسپانسیون سلولی گیاه تاتوره (*Datura stramonium* L.). پژوهش و سازندگی در زراعت و باغبانی، شماره۶۲، صفحات ۳۴-۲۵.

ایران‌پاک، ن. کلاته جاری، س. و کلانتری، س. ۱۳۹۱. بررسی اثر ریز نمونه و تنظیم کننده‌های رشد بر تولید پینه و شاخه‌زایی در نرگس شیراز (*Narcissus tazetta* L.). فصلنامهٔ علمی-پژوهشی تحقیقات گیاهان دارویی و معطر ایران، جلد۲۸، شماره ۲، صفحه ۳۶۹- ۳۵۶.

ایوبی، ن. حسینی، ب، و فتاحی، م. ۱۳۹۶. اثر القایی کیتوزان و کلشی سین بر تولید رزمارینیک اسید در ریشه مویین زرین گیاه (*Dracocephalum kotschyi* Boiss). پژوهش های سلولی و مولکولی (زیست شناسی ایران)، جلد۳۰، شماره۱، صفحات ۱۳-۱.

باقری، خ. پ، آ. غلامی، م. معصومی، م. ۱۳۹۶. بررسی تاثیر برخی تیمارهایتنظیم کننده رشدی مختلف و نوع ریز نمونه بر پینه‌زایی زعفران، زراعت و فناوری زعفران، سال ۵، شماره ۳، صفحات ۲۳۹-۲۳۱.

بیات، ح. خوشخوی، م. و عرب، م. ۱۳۸۷. بررسی انگیزش پنبه از ریزنمونه‌های برگ در زنبق مردابی بومی ایران. کنفرانس بین‌المللی بیولوژی، دانشگاه تهران، تهران، صفحات ۳۲۱-۳۱۹.

پیوندی، م. مرادتهرانی، م و مجد، ا. ۱۳۸۹. کالوس‌زائی و اندام‌زائی گیاه داوودی *Chrysanthemum morifolium Ramat* L. فصلنامه علوم زیستی دانشگاه آزاد اسلامی واحد زنجان. شماره پیاپی ۹، جلد ۳، شماره ۲، صفحات ۵۹-۵۳.

تاجیک، س. زرین کمر، ف و بطحائی، س، ز. ۱۳۹۱. بررسی میزان رنگیزه کاروتنوئیدی کروسین، پیکروکروسین و سافرانال در گونه زعفران (*Crocus sativus* L) در مناطق قائن و طبس، مجله زیست شناسی ایران، جلد ۲۵، شماره۳، صفحات ۴۲۹-۴۲۳.

حبیبی خانیانی، ب. معینی، ا. و عبدالهی، م. ۱۳۸۴. تولید متابولیت‌های ثانویه و مواد دارویی از طریق کشت بافت و سلول های گیاهی. فصلنامه گیاهان داروئی، سال ۴، شماره ۱۴، صفحات ۶-۱.

حسین پور آزاد، ن. نعمت زاده، ق. جولیانوو، ج. رنجبر، غ. و یامچی، ا. ۱۳۹۵. شناسایی ایزومرهای آپوکاروتنوئید کروسین و کروستین موجود در عصاره خام زعفران از طریق کروماتوگرافی مایع مجهز به طیف سنجی جرمی. نشریه زراعت و فناوری زعفران، جلد۴، شماره۴، صفحات ۳۰۰-۲۹۱.

حسنلو، ط. رضازاده، ش. و رهنما، ح. ۱۳۸۷. ریشه‌های موئین منبعی برای تولید ترکیبات با ارزش دارویی. فصلنامه گیاهان دارویی، شماره۲۹، صفحات ۱۷-۱.

حضرتی جهان، ر. زارع، ن. دژستان، س. شیخ زاده مصدق، پ و فرجامی نژاد، م. ۱۳۹۶. تأثیر تنظیم کننده‌های رشد گیاهی بر رشد درون شیشه‌ای فندق (*Corylus avellana*) و تولید تاکسول در پینه. مجله پژوهش‌های گیاهی (مجله زیست شناسی گیاهی)، جلد۳۰، شماره۳، صفحات ۵۵۹ – ۵۵۱.

دادخواه، م، ر. احتشام، م. و فکرت، ح. ۱۳۸۹. زعفران ایران گوهری ناشناخته (کاشت، داشت، برداشت و فرآوری)، چاپ دوم، انتشارات شهرآشوب، صفحه ۱۶۰.

راعی، م. اثنی عشری، م. و خدایاری، م. ۱۳۹۷. الیستورهای غیر زیستی و بیوتکنولوژی گیاهان دارویی. مجله سلول و بافت، جلد۷، شماره۴، صفحات ۳۴۲-۳۳۳.

رحیمی آشتیانی، س. حسنلو، ط. و بی‌همتا، م. ۱۳۸۸. به کارگیری عصاره مخمر به عنوان یک راهکار به منظور افزایش محتوی فلاونولیگنان در کشت تعلیقی سلولی خار مریم از طریق مکانیزم تحریک. فصلنامه گیاهان دارویی، شماره۳۲، صفحات ۱۱۹- ۱۰۸.

رئوفی‌راد، و.، ابراهیمی، ع. و ارزانی، ح. ۱۳۹۵. استخراج و شناسایی ترکیبات شیمیایی اسانس گیاه بومادران. فصلنامه اکوسیستم‌های طبیعی ایران، جلد ۷، شماره ۲۲، صفحات ۹-۱.

ریاحی مدورا، ع. جدید بنیاد، ف. رضایی، ف. ملکی، م. قاضی زاده احسایی، م. ۱۳۹۹. تأثیر محرک‌های ساکارز وکیتوزان بر بیان ژن کنترل کننده آنزیم و محتوی سولفورافان در گیاهچه‌های ازمک. مجله بیوتکنولوژی کشاورزی، دروه ۱۲، شماره ۲، ۸۰-۶۴.

سجادی فرد، م. و پژوهنده، م. ۱۳۹۴. بررسی تأثیر نوع ریز نمونه و هورمون برکالوسزایی و باززایی زعفران(*Crocus sativus* L). نشریه زراعت و فناوری زعفران، جلد۳، شماره۳، صفحات ۲۰۲-۱۹۵.

صفرنژاد، ع. علمداری، س. درودی، ه. و دلیر، م. ۱۳۹۵. اثرتنظیم کننده رشدهای مختلف بر پینه‌زایی، باززایی و تکثیر کورم زعفران (*Crocus sativus* L.). زراعت و فناوری زعفران، جلد۴، شماره۲، صحفات ۱۵۴-۱۴۳.

طاهرخانی، ت. اصغری زکریا، ر. امیدی، م. و زارع، ن. ۱۳۹۷. تاثیر آبسیزیک اسید بر محتوای کروسین و سافرانال و بیان ژن‌های کنترل کننده در کشت سوسپانسیونی زعفران (*Crocus sativus* L.). مجله ژنتیک نوین، دوره سیزدهم، شماره ۱، صفحات ۱۸-۱۱.

عنبری، س. توحیدفر، م. و حسینی، ر. ۱۳۹۴. تولید انبوه متابولیت ثانویه از طریق کشت بافت. مجله زیتون، شماره۱۹۰، صفحات ۱۷-۱۲.

عنبرا، ح. شهروز، ر. مظفری، ع، ا. ملکی نژاد، ح. مروتی، ح. شیبانی، م، ت. سعادتی، ص. ۱۳۹۷. نقش محافظتی اتیل پیرووات و ویتامین E در برابر سمیت کلیوی ناشی از فنیل هیدرازین در موش سفید کوچک آزمایشگاهی. فصلنامه علمی- پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی لرستان. یافته، دوره بیستم، شماره۱، مسلسل۷۵، صفحات ۵۲ تا۶۷.

فارسی، م. ذوالعلی، ج. ۱۳۸۵. اصول بیوتکنولوژی گیاهی، انتشارات دانشگاه فردوسی مشهد، چاپ دوم، ۴۹۵ صفحه.

قاسمی، ع. ۱۳۹۰. گیاهان دارویی و معطر، شناخت و بررسی اثرات آن‌ها. انتشارات دانشگاه آزاد اسلامی شهرکرد، صفحات ۴۷۶- ۴۷۴.

کافی، م.، زند، ا.، کامکار، ب.، شریفی، ح. وگلدانی، م. ۱۳۸۲. چاپ دوم، انتشارات جهاد دانشگاهی مشهد، صفحه ۳۷۹.

محمدی فارسانی، م. و قاسمی پیربلوطی، ع. ۱۳۹۲. کاربرد امحرکها در افزایش تولید متابولیت‌های ثانویه در سوسپانسیون‌های کشت سلول و اندام گیاهی. فصلنامه داروهای گیاهی، سال پنجم، شماره ۳، صفحات ۱۲۰-۱۱۳.

مظفریان، و. ا. ۱۳۸۷. فلور استان ایلام، انتشارات فرهنگ معاصر، صفحه ۶۸۷.

منصوری، احمد. ۱۳۷۲. بررسی فیتوشیمیایی چهار گونه از جنس Alicaea جمع‌آوری شده از اصفهان. دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، دانشکده داروسازی. پایان نامه جهت دریافت درجه دکترای داروسازی.

هوشیار، ر. بطحایی، س، ز. اعتمادی کیا، ب. ۱۳۸۹. بررسی و مقایسه‌ی کمی برخی متابولیت‌های عمده (کروسین، پیکروکروسین وسافرانال) در بسته بندی‌های مختلف زعفران ایران به روش HPLC. مجله علوم پزشکی مدرس، آسیب شناسی زیستی، دوره۱۳، شماره۲، ۷۱-۶۳.

یاسینی، س. ا. زیارت نیا، س. م. باقری، ع. ر. و کاشفی، ب. ۱۳۹۲. تولید پینه ترد و شکننده برای کشت سلولی در اثر تنظیم کننده‌های رشد بر زعفران (*Crocus sativus* L.). اولین همایش سراسری کشاورزی و منابع طبیعی پایدار، تهران، ایران.

Abrishami, MH. 2004. Saffron: from yesterday till today. An encyclopedia of its production, trade and use. Tehran: Amir Kabir.

Abdullaev, F. 2003. Crocus sativus against cancer. Archives of medical research, 4(34): p. 354.

Amorim, H. V., Dougall, D. K., and Sharp, W. R. 1977. The effect of carbohydrate and nitrogen concentration on phenol synthesis in Paul's Scarlet Rose cells grown in tissue culture. Physiologia Plantarum, 39(1), 91-95.

Andrae, U., Singh, J. and Ziegler-Skylakakis, K. 1985. Pyruvate and related α-ketoacids protect mammalian cells in culture against hydrogen peroxide-induced cytotoxicity. Toxicology letters, 28(2-3): 93-98.

Arigoni, D., Sagner, S., Latzel, C., Eisenreich, W., Bacher, A. and Zenk, M. H. 1997. Terpenoid biosynthesis from 1-deoxy-D-xylulose in higher plants by intramolecular skeletal rearrangement. Proceedings of the National Academy of Sciences, 94(20): 10600-10605.

Asdaq SMB and Inamdar MN .2010. Potential of *Crocus sativus* (saffron) and its constituent, crocin, as hypolipidemic and antioxidant in rats. Appl Biochem Biotechnol 162: 358–372.

Asadi, M. 2016. Antioxidant and antimicrobial activities in the different extracts of Caspian saffron, *Crocus caspius* Fisch and CA Mey. ex Hohen. Caspian Journal of Environmental Sciences, 14(4), 331-338.

Ascough, G. D., Erwin, J. E. and Van Staden, J. 2009. Micropropagation of Iridaceae—a review. Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC), 97(1): 1-19.

Assimopoulou AN, Sinakos Z, Papageorgiou VP. 2005. Radical scavenging activity of *crocus sativus* L. extract and its bioactive constituents. Phytother Res 19: 997–1000.

Atrashi M, Tavokoli Dinanie E, Darzi MT, Hashemi J, Rozbeh S, Masumi A. 2011. Effect of ultrasound on the production of Carvone as a secondary metabolite in callus derived from *Bunium persicum* Boiss. J Herb Med. 2(2): 129–135.

Baba, S. A., Malik, A. H., Wani, Z. A., Mohiuddin, T., Shah, Z., Abbas, N., and Ashraf, N. 2015. Phytochemical analysis and antioxidant activity of different tissue types of Crocus sativus and oxidative stress alleviating potential of

saffron extract in plants, bacteria, and yeast. South African Journal of Botany, 99, 80-87.

Babaei, S., Niknam, V., and Behmanesh, M. 2021. Nitric oxide induced carotenoid contents in *Crocus sativus* under salinity. Natural product research, 35(5), 888-892.

Basker, D. and Negbi M. (1983). ″Uses of saffron″. Econ Bot, 3: 228–235

Badihi, L., Gerami, M., Akbarinodeh, D., Shokrzadeh, M., and Ramezani, M. 2021. Physio-chemical responses of exogenous calcium nanoparticle and putrescine polyamine in Saffron (*Crocus sativus* L.). Physiology and Molecular Biology of Plants, 27(1), 119-133.

Bourgaud, F., Gravot, A., Milesi, S. and Gontier, E. 2001. Production of plant secondary metabolites: a historical perspective. Plant science, 161(5): 839- 851.

Bouvier, F. Suire, C. Mutterer, J and Camara, B. 2003. Oxidative remodeling of chromoplast carotenoids: identification of the carotenoid dioxygenase CsCCD and CsZCD genes involved in Crocus secondary metabolite biogenesis. Plant Cell 15: 47-62.

Berlin, J., Forche, E., Wray, V., Hammer, J. and Hosel, W. 1983. Formation of benzophenanthridine alkaloids by suspension cultures of Eschscholtzia californica. Zeitschrift für Naturforschung C, 38(5-6): 346-352.

Cai J, Ma Y, Hu P, Zhang Y, Chen J and Li X. 2017. Elicitation of furanocoumarins in Changium smyrnioides suspension cells. Plant Cell, Tissue Organ Cult. 130(1):1–12.

Castillo, R., Fernandez, J. A. and Gomez-Gomez, L. 2005. Implications of carotenoid biosynthetic genes in apocarotenoid formation during the stigma development of Crocus sativus and its closer relatives. Plant Physiology, 139(2): 674-689.

Castellar, M. R. and Iborra, J. L. 1997. Callus induction from explants of Crocus sativus. Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology, 6(2): 97-100.

Caballero-Ortega, H., Pereda-Miranda, R. and Abdullaev, F. I. 2007. HPLC quantification of major active components from 11 different saffron (Crocus sativus L.) sources. Food Chemistry, 100(3), 1126-1131.

Chang, J. H., Shin, J. H., Chung, I. S. and Lee, H. J. 1998. Improved menthol production from chitosan-elicited suspension culture of Mentha piperita. Biotechnology letters, 20(12), 1097-1099.

Chattopadhyay, S., Mehra, R., Srivastava, A., Bhojwani, S. and Bisaria, V. 2003. Effect of major nutrients on podophyllotoxin production in *Podophyllum hexandrum* suspension cultures. Applied microbiology and biotechnology, 60(5): 541-546.

Chen Y, Zhang H, Tian X, Zhao C, Cai L, Liu Y, Jia L, Yin HX, Chen HX. 2008. Antioxidant potential of crocins and ethanol exracts of *Gardenia jasminoides* ELLIS and *Crocus sativus* L.: a relationahip investigation between antioxidant activity and crocin content. Food Chem 109: 484–492.

Christen, P. 2000. Tropane alkaloids: old drugs used in modern medicine: Studies in natural products Chemistry, 22: 717-749.

Chen, Y., Li, F. and Wurtzel, E. T. 2010. Isolation and characterization of the Z-ISO gene encoding a missing component of carotenoid biosynthesis in plants. Plant Physiology, 153(1): 66-79.

Chen, S.A., Wang, X., Zhao, B., Yuan, X. and Wang, Y. 2003. Production of crocin using *Crocus sativus* callus by two-stage culture system. Biotechnology Letters, 25(15): 1235-1238.

Chen, S., Zimei, L., Cui, J., Jiangang, D., Xia, X., Liu, D., Yu, J., 2011. Alleviation of chilling-induced oxidative damage by salicylic acid pretreatment and related gene expression in eggplant seedlings. Plant Growth Regul. 65, 101–108.

Constabel, F. 1968. Gerbstoffproduktion der Calluskulturen von *Juniperus communis* L. Planta, 79(1), 58-64.

Chu, Y. H., Chang, C. L., Hsu, H. F. 2000. Flavonoid content of several vegetables and their antioxidant activity. J Sci Food Agric. 80, 561-566.

Cui, X. H., Murthy, H. N., Wu, C. H., and Paek, K. Y. 2010. Sucrose-induced osmotic stress affects biomass, metabolite, and antioxidant levels in root suspension cultures of *Hypericum perforatum* L. Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC), 103(1), 7-14.

Cossignani, L., Urbani, E., Simonetti, M. S., Maurizi, A., Chiesi, C. and Blasi, F. 2014. Characterisation of 336 secondary metabolites in saffron from central Italy (Cascia, Umbria). Food chemistry, 143, 446-337.

Davis, E.M. and Croteau, R. 2000. Cyclization enzymes in the biosynthesis of monoterpenes, sesquiterpenes, and diterpenes. In Biosynthesis, 209: p. 53-95.

Davidson, D., Weiss, M., and Jelling, M. 1937. The action of ammonia on benzoin. The Journal of Organic Chemistry, 2(4), 328-334.

Desjardins, Y., Hdider, C., De riek, J. 1995. Carbon nutrition in vitro regulation and manipulation of carbon assimilation in micropropagated systems. In: Aitken-Christie J, Kozai T, Smith ML, Editors. Automation and Environmental Control in Plant Tissue Culture, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands; 1995. pp. 441-471.

Dewick, PM. 2009. Medicinal Natural Products, A Biosynthetic Approach, 3rd Edition. formerly University of Nottingham, UK, John Wiley & Sons Ltd.

Dhiman N, Patial V, Bhattacharya A. 2018.The current status and future applications of hairy root cultures. In: Kumar N (ed) Biotechnological approaches for medicinal and aromatic plants. Springer, Singapore, pp 87–155.

DiCosmo, F. et al. 1992. 2nd National Cancer Inst. Workshop on Taxol and Taxus, Sep. 23-24, Alexandria, V.A., U.S.

Dixon, R.A., and Gonzales, R.A. 1996. Plant Cell Culture: A Practical Approach. 2nd Ed. IRL Press, pp. 1-230.

Dong, J., Wan, G., Liang, Z., 2010. Accumulation of salicylic acid-induced phenolic compounds and raised activities of secondary metabolic and antioxidative enzymes in *Salvia miltiorrhiza* cell culture. J. Biotechnol. 148, 99–104.

Dornenburg H, Knorr D. 1997. Evaluation of elicitor- and high-pressure-induced enzymatic browning utilizing potato (*Solanum tuberosum*) suspension cultures as a model system for plant tissues. J Agric Food Chem. 45(10):4173–4177.

Estévez JM, Cantero A, Romero C, Kawaide H, Jiménez LF, Kuzuyama T, Seto H, Kamiya Y and León P. 2000 Analysis of the expression of CLA1, a gene that encodes the 1-deoxyxylulose 5 phosphate synthase of the 2-C-methyl-D-erythritol-phosphate pathway in Arabidopsis. Plant Physiol, 124: 95-104.

Fernandez, J. A. 2006. Anticancer properties of saffron, *Crocus sativus* L. Advances in Phytomedicine, 2, 313-330.

Furumoto, T., Yamaguchi, T., Ohshima-Ichie, Y., Nakamura, M., Tsuchida-Iwata, Y., Shimamura, M., Ohnishi, J., Hata, Sh., Gowik, U., Westhoff, P., Bra

utigam, A., Weber, A.P.M. and Izui, K. 2011. A plastidial sodium-dependent pyruvate transporter. Macmillan Publishers Limited. 476 (7361): 472.

Gangopadhyay M, Dewanjee S, Bhattacharya S .2011. Enhanced plumbagin production in elicited Plumbago indica hairy root cultures. J Biosci Bioeng 111:706–710.

George, P. S., Visvanath, S., Ravishankar, G. A. and Venkataraman, L. V. 1992. Tissue culture of saffron (*Crocus sativus* L.): somatic embryogenesis and shoot regeneration. Food biotechnology, *6*(3): 217-223.

Goleniowski, M. E., Silva, G. L. and Trippi, V. S. 1990. Sesquiterpene lactone production in callus culture of Ambrosia tenuifolia. Phytochemistry, 29(9): 2889-2891.

Giuliano, G. Al-Babili, S. and Von Lintig, G. 2003. Carotenoid oxygenases: cleave it or leave it. TRENDS in Plant Science, 8(4): 145-149.

Giandomenico, A. R., Cerniglia, G. E., Biaglow, J. E., Stevens, C. W. and Koch, C. J. 1997. The importance of sodium pyruvate in assessing damage produced by hydrogen peroxide. Free Radical Biology and Medicine, 23(3): 426-434.

Ghasemzadeh, A., Jaafar, H. Z., and Karimi, E. 2012. Involvement of salicylic acid on antioxidant and anticancer properties, anthocyanin production and chalcone synthase activity in ginger (*Zingiber officinale* Roscoe) varieties. International journal of molecular sciences, 13(11), 14828-14844.

Gomez-Gomez, L. Moraga, A.R. and Ahrazen, O. 2010. Understanding carotenoid metabolism in saffron stigmas, unraveling aroma and color formation. Functional Plant Science 4: 56-63.

GowharAli, A.M., Iqbal, A.M., Nehvi, F.A., Sheikh Sameer, S., Shaheena, N., Sabeena, N. and Niyaz, A.D. 2013. Prospects of clonal selection for enhancing productivity in saffron (*Crocus sativus* L.). 8: 5. 460-467.

Gundluch, H., Muller, M. J., Kutchan, T. M. and Zenk, M. H. 1992. Jasmonic acid is a signal transducer in elicitor induced plant cell Cultures. Proceeding of the National Academy of Sciences USA 98: 389-2393.

Guo R, Yuana G, Wang Q. 2011. Effect of sucrose and mannitol on the accumulation of health-promoting compounds and the activity of metabolic enzymes in broccoli sprouts. Sci Hortic 128, 159-165.

Hill, G. 1967. Morphogenesis of shoot primordia in cultured stem tissue of a garden rose. Nature, 216 (5115): 596-597.

Himeno, h and sano, k. 1987. synthesis of crocin, picrocrocin and safranal by saffron stigma-like sturctures proliferated in vitro. Agric.biol.chem. 51:2395-240

Horton, P., Ruban, A. V. and Walters, R. G. 1996. Regulation of light harvesting in green plants. Annual Review of Plant Biology, 47(1): 655-684.

Holleman, MAF. 1994. Notice sur l'action de l'eau oxygenee sur les ace toniques etsur le dicetones 1.2. Recl Trav Chim Pays-bas Belg; 23: 169–171.

Hossain, M. A., Kim, S., Kim, K. H., Lee, S. J., and Lee, H. 2009. Flavonoid compounds are enriched in lemon balm (*Melissa officinalis*) leaves by a high level of sucrose and confer increased antioxidant activity. Hortscience, 44(7), 1907-1913.

Hsia, C., and Korban, SS. 1996, Organogenesis and somatic embryogenesis in callus cultures of Rosa hybrida and Rosa chinensis minima. Plant Cell Tissue and Organ Culture, 44(1): 1-6.

Hussein, E. A., and Aqlan, E. M. 2011. Effect of mannitol and sodium chloride on some total secondary metabolites of fenugreek calli cultured in vitro. Plant Tissue Culture and Biotechnology, 21(1), 35-43.

Huang, R.-H., Liu, J.-H., Lu, Y.-M., Xia, R.-X. 2008. Effect of salicylic acid on the antioxidant system in the pulp of 'Cara cara'navel orange (*Citrus sinensis* L. Osbeck) at different storage temperatures. Postharvest Biol. Technol. 47, 168–175.

Ibrahim Zadeh H, Rajabian T, Karamian R, Abrishamchi P, Saboora O. 2006. Persian saffron according to research outlook. Tehran: Ettelaat Press.

Ibrahim, R. K. 1987. Regulation of synthesis of phenolics. Cell Culture and Somatic Cell Genetics of plants, 4, 77-95.

Idrees, M., Naeem, M., Aftab, T., and Khan, M. M. A. 2011. Salicylic acid mitigates salinity stress by improving antioxidant defence system and enhances vincristine and vinblastine alkaloids production in periwinkle [*Catharanthus roseus* (L.) G. Don]. Acta Physiologiae Plantarum, 33(3), 987-999.

Iahi, I., Jabeen, M., and Firdous, N. 1987. Morphogenesis with saffron tissue culture. Journal of Plant Physiology, 128(3): 227-232.

Jeong, H., Sung, J., Yang, J., Kim, Y., Jeong, H. S., and Lee, J. 2018. Effect of sucrose on the functional composition and antioxidant capacity of buckwheat (*Fagopyrum esculentum* M.) sprouts. Journal of Functional Foods, 43, 70-76.

Kamo, K., Chen, J. and Lawson, R., 1990. The establishment of cell suspension cultures of gladiolus that regenerate plants. In Vitro Cellular and Developmental Biology, 26(4): 425-430.

Karuppusamy, S. 2009. A review on trends in production of secondary metabolites from higher plants by in vitro tissue, organ and cell cultures. Journal of Medicinal Plants Research, 3(13): 1222-1239.

Karimi E, Oskoueian E, Hendra R, Jaafar HZE .2010. Evaluation of *Crocus sativus* L. stigma phenolic and flavonoid compounds and its antioxidant activity. Molecules 15:6244–6256.

Kasperczyk S, Dobrakowski M, Kasperczyk J, Ostałowska A, Zalejska-Fiolka J,and Birkner E. 2014. Betacarotene reduces oxidative stress, improves glutathione metabolism and modifies antioxidant defense systems in leadexposed workers. Toxicol Appl Pharmacol. 280(1):36–41.

Kim, J. H., Yun, J. H., Hwang, Y. S., Byun, S. Y., and Kim, D. I. 1995. Production of taxol and related taxanes in Taxus brevifolia cell cultures: effect of sugar. Biotechnology letters, 17(1), 101-106.

Kim, S.-I., Choi, H.-K., Kim, J.-H., Lee, H.-S., Hong, S.-S. 2001. Effect of osmotic pressure on paclitaxel production in suspension cell cultures of *Taxus chinensis*. Enzyme Microb Technol. 28, 202-209.

Knobloch, K. H. and Berlin, J. 1980. Influence of medium composition on the formation of secondary compounds in cell suspension cultures of *Catharanthus roseus* (L.) G. Don. Zeitschrift fuer Naturforschung c, 35(7-8): 551-556.

Kosar, M., Goger, F., and Baser, K. H. C. 2011. In vitro antioxidant properties and phenolic composition of Salvia halophila Hedge from Turkey. Food chemistry, 129(2), 374-379.

Kulkarni, A.P. and Aradhya, S.M. 2005. Chemical changes and antioxidant activity in pomegranate arils during fruit development. Food Chemistry, 93: 319–324.

Lagram, K., Ben El Caid, M., Atyane, L. H., Salaka, L., El Boullani, R., El Mousadik, A. and Serghini, M. A. 2016. In vitro shoots and micro-corms

formation through indirect organogenesis of Moroccan saffron (*Crocus sativus* L.). In V International Symposium on Saffron Biology and Technology: Advances in Biology, Technologies, Uses and Market 1184 (pp. 97-108).

Lin LD, Wu JY, Ho KP, and Qi SY. 2001. Ultrasound-induced physiological effects and secondary metabolite (saponin) production in *Panax ginseng* cell cultures. Ultrasound Med Biol. 27(8):1147–1152.

Lopresti, A. L. 2017. Drummond, Efficacy of curcumin, and a saffron/curcumin combination for the treatment of major depression: A randomised, double-blind, placebo-controlled study. Journal Affect Disord, 207: 188-196.

Lozano, P., Castellar, M. R., Simancas, M. J. and Iborra, J. L. 1999. A quantitative high-performance liquid chromatographic method to analyse commercial saffron (*Crocus sativus* L.) products. Journal of Chromatography A, 830(2): 477-483.

Mahdinejad, N., Fakheri, B. A., and Ghanbari, S. 2015. Effects of Growth Regulators on In vitro Callogenesis of Taxus baccata L. In Biological Forum-An International Journal. 7(1): 142-145.

Masoumi, S. M. 2001. Introduction of Edible Wild Plants of Kermanshah Province and Suggested Methods of Cooking and Eating. Kowsar Publications, Kermanshah, Iran. p. 175.

Malarz, J., Stojakowska, A., and Kisiel, W. 2007. Effect of methyl jasmonate and salicylic acid on sesquiterpene lactone accumulation in hairy roots of Cichorium intybus. Acta Physiologiae Plantarum, 29(2), 127-132.

Maskooki AM, Mortazavi SA, and Maskooki A. 2007. Cleaning efficiency of ultrasound in various membrane modules. ISSS2007 International Symposium on Sonochemistry and Sonoprocessing. New Horizons in Sonochemistry and Sonoprocessing; Dec 6–9, 2007. Kyoto: Japan Society Sonochemistry (As poster presentation).

Matkowski, A. 2008. Plant in vitro culture for the production of antioxidants—a review. *Biotechnology advances*, 26(6), 548-560.

Mewis, I. Smetanska, IM. Muller, CT and Ulrichs, C. 2011. Specific polyphenolic compounds in cell culture of *Vitis vinifera* L. cv. Gamay Freaux. Appl Biochem Biotechnol, 2. 148-161.

Misawa, M. 1985. Production of useful plant metabolites. In Plant cell culture (pp. 59-88). Springer, Berlin, Heidelberg.

Misawa, M. 2004. Plant Tissue Culture: an alternative for production of useful Metabolites. FAO Agricultural Services, 108: chapters2.

Mihaljevic, S., Bjedou, I., Kovac, M., Levanic, D.L. and Jelaska, S. 2002. Effect of explants source and growth regulators on in vitro callus growth of Taxus baccata L. Washingtonii. Food Technology and Biotechnology, 40(4): 299-303.

Mirjalili, S.A., and Poorazizi, E. 2015. Evaluation of callus formation and embryogenesis in saffron (*Crocus sativus* L.) for flower harvesting. Journal of Biodiversity and Environmental Sciences 6 (1): 127-131.

Moradi, A., Zarinkamar, F., Caretto, S., and Azadi, P. 2018. Influence of thidiazuron on callus induction and crocin production in corm and style explants of Crocus sativus L. Acta Physiologiae Plantarum, 40(11), 1-8.

Mulabagal, V and Tsay, HS. 2004. Plant cell cultures, an alternative and efficient source for the production of biologically important secondary metabolites. Int J of Applied Sci and Eng, 2(1): 29-48.

Nair, S. C., Kurumboor, S. K. and Hasegawa, J. H. 1995. Saffron chemoprevention in biology and medicine: a review. Cancer Biotherapy and Radiopharmaceuticals, 10(4): 257-264.

Oksman-Caldentey, K. M. and Inze, D. 2004. Plant cell factories in the post-genomic era: new ways to produce designer secondary metabolites. Trends Plant Sci, 9: 433-440.

Oloumi H, Soltaninejad R, and Baghizadeh A .2015. The comparative effects of nano and bulk size particles of CuO and ZnO on glycyrrhizin and phenolic compounds contents in Glycyrrhiza glabra L. seedlings. Indian J Plant Physiol 20:157–161.

Oh, M.-M., Trick, H. N., Rajashekar, C. 2009. Secondary metabolism and antioxidants are involved in environmental adaptation and stress tolerance in lettuce. J Plant Physiol. 166, 180-191.

Okazaki, M., Hino, F., Nagasawa, K., and Miura, Y. 1982. Effects of nutritional factors on formation of scopoletin and scopolin in tobacco tissue cultures. Agricultural and Biological Chemistry, 46(3), 601-607.

Papandreou MA, Kanakis CD, Polissiou MG, Efthimiopoulos S, Cordopatis P. 2006. Inhibitory activity on amyloid-ß-aggregation and antioxidant properties of *Crocus sativus* stigma extract and its crocin constituents. J Agric Food Chem 54:8762–8768

Patel, H. and Krishnamurthy, R. 2013. Elicitors in plant tissue culture. Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry, 2(2): 60-65.

Pfander, H. and Schurtenberger, H. 1982. Biosynthesis of C20-carotenoids in *Crocus sativus*. Phytochemistry, 21(5): 1039-1042.

Plessner, O., Negbi, M., Ziv, M. and Basker, D. 1989. Effects of temperature on the flowering of the saffron crocus (*Crocus sativus* L.): induction of hysteranthy. Israel Journal of Plant Sciences, 38(1): 1-7.

Prakash, G. and Srivastava, A. K. 2005. Statistical media optimization for cell growth and azadirachtin production in *Azadirachta indica* (A. Juss) suspension cultures. Process Biochemistry, 40(12): 3795-3800.

Premkumar, K., Abraham, S. K., Santhiya, S. T., Gopinath, P. M. and Ramesh, A. 2001. Inhibition of genotoxicity by saffron (*Crocus sativus* L.) in mice. Drug and Chemical Toxicology, 24(4): 421-428.

Popova, L., Pancheva, T. and Uzonova, A. 1997. Salicylic acid: properties, biosynthesis and physiological role. Plant Physiology 23: 85-93.

Qian, Z. G., Zhao, Z. J., Xu, Y and Qian, X. 2006. Novel chemically synthesized salicylate derivative as an effective elicitor for inducing the biosynthesis of plant secondary metabolites. Biotechnol. Prog. 22, 331–333.

Rahpeyma, S. A., Moieni, A. and Jalali Javaran, M. 2015. Paclitaxel production is enhanced in suspension-cultured hazel (*Corylus avellana* L.) cells by using a combination of sugar, precursor, and elicitor. Engineering in Life Sciences, 15(2): 234-242.

Rahaiee S, Gharibzahedi SMT, Razavi SH, Jafari SM. 2012. Recent developments on new formulations based on nutrient-dense ingredients for the production of healthy-functional bread: a review. J Food Sci Technol. doi: 10.1007/s13197-012-0833-6.

Raja, W., Zaffer, G. and Wani, S. A. 2006. In vitro microcorm formation in saffron (*Crocus sativus* L.). In II International Symposium on Saffron Biology and Technology 739 (pp. 291-296).

Ramezani M, Rahmani F, and Dehestani A .2017. Comparison between the effects of potassium phosphite and chitosan on changes in the concentration of Cucurbitacin E and on antibacterial property of Cucumis sativus. BMC Complement Altern Med 17(1):1–6.

Rao, S.R. and Ravishankar, G.A. 2002. Plant cell cultures: chemical factories of secondary metabolites. Biotechnology Advances, 20 (2): 101-153.

Ravishankar, G. A. and Ramachandra Rao, S. 2000. Biotechnological Production of Phyto-Pharmaceuticals. Journal of Biochemistry Molecular Biology and Biophysics, 4: 2, 73-102.

Rezaee F, Lahouti M, Maleki M, Ganjeali A. 2018. Comparative proteomics analysis of whitetop (Lepidium draba L.) seedlings in response to exogenous glucose. Int J Biol Macromol 120, 2458-2465.

Rout, GR., Debata, BK., and Das, P. 1992. In vitro regeneration of shoots from callus cultures of Rosa hybrida L. cv. Landora Indian. Journal of Experimental Biology, 30: 15-18.

Sarmadi, M., Karimi, N., Palazon, J., Ghassempour, A. and Mirjalili, M. H. 2018. The effects of salicylic acid and glucose on biochemical traits and taxane production in a *Taxus baccata* callus culture. Plant physiology and biochemistry, (132): 271-280.

Salehi Surmaghi M H. 2006. Medicinal plants and phytotherapy. The World of Nutrition Publications, Iran. P: 10–207.

Sharma, S. and Vakhlu, J. 2020. Callus induction and high frequency organogenesis in saffron (*Crocus sativus* L.).

Saruhan, N., Saglam, A., Kadioglu, A., 2012. Salicylic acid pretreatment induces drought tolerance and delays leaf rolling by inducing antioxidant systems in maize genotypes. Acta Physiol. Plant. 34, 97–106.

Sampathu, S. R., Shivashankar, S., Lewis, Y. S. and Wood, A. B. 1984. Saffron (*Crocus sativus* L.) Cultivation, processing, chemistry and standardization. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 20(2): 123-157.

Sangwan, N. S., Farooqi, A. H. A., Shabih, F. and Sangwan, R. S. 2001. Regulation of essential oil production in plants. Plant growth regulation, 34(1): 3-21.

Sevon, N., Varjonen, T., Hiltunen, R. and Oksman-Caldentey, K. M. 1992. Effect of sucrose, nitrogen, and copper on the growth and alkaloid production of transformed root cultures of Hyoscyamus muticus. Planta Medica, 58(S 1): 609-610.

Sharma, K. D. and Piqueras, A. 2010. Saffron (*Crocus sativus* L.) tissue culture: micropropagation and secondary metabolite production. Funct Plant Sci Biotechnol, 4, 15-24.

Singleton, V.L., Orthofer, R. and Lamuela-Raventos, R.M. 1999. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. Methods in enzymology, vol. 299: 152–178.

Stoeck, V. and Schunack, W. 1974. N-substituted imidazoles from aldehydes, 1, 2-diketones, primary amines and liquid ammonia (author's transl). Archiv der Pharmazie, 307(12), 922-925.

Taherkhani, T., Asghari Zakaria, R., Omidi, M., and Zare, N. 2019. Effect of ultrasonic waves on crocin and safranal content and expression of their

controlling genes in suspension culture of saffron (*Crocus sativus* L.). Natural product research, 33(4), 486-493.

Taiz L, Zaiger E .2006. Plant physiology, 4th edn. Sinauer Associates Inc, Sunderland Tajik, S., Zarinkamar, F., Soltani, B. M., and Nazari, M. 2019. Induction of phenolic and flavonoid compounds in leaves of saffron (*Crocus sativus* L.) by salicylic acid. Scientia Horticulturae, *257*, 108751.

Tal, B., Gressel, J. and Goldberg, I. 1982. The effect of medium constituents on growth and diosgenin production by Dioscorea deltoidea cells grown in batch cultures. Planta medica, 44(02): 111-115.

Tarantilis, P. A., Tsoupras, G. and Polissiou, M. 1995. Determination of saffron (*Crocus sativus* L.) components in crude plant extract using high-performance liquid chromatography-UV-visible photodiode-array detection-mass spectrometry. Journal of Chromatography A, 699(1-2): 107-118.

Tepe, B., Degerli, S., Arslan, S., Malatyali, E., and Sarikurkcu, C. 2011. Determination of chemical profile, antioxidant, DNA damage protection and antiamoebic activities of Teucrium polium and Stachys iberica. *Fitoterapia*, *82*(2), 237-246.

Tholakalabavi, A., Zwiazek, J. J., and Thorpe, T. A. 1994. Effect of mannitol and glucose-induced osmotic stress on growth, water relations, and solute composition of cell suspension cultures of poplar (*Populus deltoides* var. Occidentalis) in relation to anthocyanin accumulation. In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant, 30(3), 164-170.

Titov, S., Bhowmik, S. K., Mandal, A., Alam, M. S., Uddin, S. N. 2006. Control of phenolic compound secretion and effect of growth regulators for organ formation from Musa spp. cv. Kanthali floral bud explants. Am J Biochem Biotechnol. 2, 97- 104.

Tian HQ, Russell SD. 1998. Culture-induced changes in osmolality of tobacco cell suspensions using four exogenous sugars. Plant Cell Tiss Org Cult 55:9–13

Vander Heiden, M.G., Cantley, L.C., and Thompson, C.B. 2009. Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. Science, 324 (5930), 1029-1033.

Van den Berg, H., Faulks, R., Granado, H. F., Hirschberg, J., Olmedilla, B., Sandmann, G. and Stahl, W. 2000. The potential for the improvement of carotenoid levels in foods and the likely systemic effects. Journal of the Science of Food and Agriculture, 80(7): 880-912.

Vanisree, M and Tsay, H. S. 2004. Plant cell cultures an alternative and efficient source for the production of biologically important secondary metabolites. Int. J. Appl. Sci. Eng. 2, 4-29.

Varma, S.D., Hegde, K.R. and Kovtun, S. 2006. Oxidative damage to lens in culture: reversibility by pyruvate and ethyl pyruvate. Ophthalmologica, 220 (1): 52-57.

Vasconsuelo, A. and Boland, R. 2007. Molecular aspects of the early stages of elicitation of secondary metabolites in plants. Plant science, 172(5): 861-875.

Wani, B. A. and Mohiddin, F. A. 2009. Micropropagation of genus Crocus-a review. African Journal of Agricultural Research, 4(13): 1545-1548.

Wang, L., Chen, S., Kong, W., Li, S., Archbold, D.D. 2006. Salicylic acid pretreatment alleviates chilling injury and affects the antioxidant system and heat shock proteins of peaches during cold storage. Postharvest Biol. Technol. 41, 244–251.

Wang JW, Zheng LP, Zhang B and Zou T .2009. Stimulation of artemisinin synthesis by combined cerebroside and nitric oxide elicitation in Artemisia annua hairy roots. Appl Microbiol Biotechnol 85:285–292.

Watanabe T, Sakai S. 1998. Effects of active oxygen species and methyl jasmonate on expression of the gene for a wound-inducible 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase in winter squash (*Cucurbita maxima*). Planta. 206(4):570–576.

War, A.R., Paulraj, M.G., War, M.Y., Ignacimuthu, S., 2011. Role of salicylic acid in induction of plant defense system in chickpea (Cicer arietinum L.). Plant Signal. Behav. 6, 1787–1792.

Westcott, R. J., and Henshaw, G. G. 1976. Phenolic synthesis and phenylalanine ammonia-lyase activity in suspension cultures of Acer pseudoplatanus L. Planta, 131(1), 67-73.

White, P. R. 1934. Potentially unlimited growth of excised tomato root tips in a liquid medium. Plant Physiol. 9, 585–600.

Wink, M. 2010. Functions and Biotechnology of Plant Secondary Metabolites. Second edition. Inc. New Delhi, India. 20-30 P.

Winterhalter, P. and Rouseff, R. 2002. Carotenoid-derived aroma compounds: an introduction.

Wu J, Lin L. 2003. Enhancement of taxol production and release in Taxus chinensis cell cultures by ultrasound, methyl jasmonate and in situ solvent extraction. Appl Microbiol Biotechnol. 62(2–3):151–155.

Xuan, B., Zhou, Y.H., Li, N. Min, Z.D. and Chiou, G.C. 1999. Effects of crocin analogs on ocular blood flow and retinal function. Journal of Ocular Pharmacology and Therapeutics, 15(2): 143-151.

Yesil-Celiktas, O., Gurel, A. and Vardar-Sukan, F. 2010. Large scale cultivation of plant cell and tissue culture in bioreactors. Transworld Research Network, 37(661): 2.

Yıldırım, E. 2007. Development of in vitro micropropagation techniques for saffron (Crocus sativus L.). Biology Master's thesis, Meddle East Technical University, 76 P.

Zeybek, E., Onde, S. and Kaya, Z. 2012. Improved in vitro micropropagation method with adventitious corms and roots for endangered saffron. Central European Journal of Biology, 7(1): 138-145.

Zhishen, J., Mengcheng, T. and Jianming, W. 1999. The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. Food chemistry, 64(4), 555-559.

Zhao, J., Davis, L. C. and Verpoorte, R. 2005. Elicitor signal transduction leading to production of plant secondary metabolites. Biotechnology Advances, 23(4): 283-333.

Zheng LP, Guo YT, Wan JW, Tan RX .2008. Nitric oxide potentiates oligosaccharide-induced artemisinin production in Artemisia annua hairy roots. J Integr Plant Biol 50:49–55.

Abstract

Crocus cancellatus subsp damascenus belongs to the Iridaceae family. The most important components of saffron include crocin (color agent), picrocrocin (flavor agent) and safranal (aroma agent). Due to the importance of these compounds in food and pharmaceutical industries, the aim of this study was to investigate the effect of sodium pyruvate and glucose on morpho-physiological properties and quantity and quality of secondary metabolites of saffron in vitro culture. This research was designed and conducted in the form of 3 experiments. Experiment 1 to optimize the base culture medium factorially based on a completely randomized design with two factors of culture medium (MS, نیم غلظتMS, نیم غلظت B5, B5) and hormonal compounds including: auxins (5 mg.l NAA, (3 mg.l) NAA, (5 mg.l) IBA, (3 mg.l) IBA and (2 mg.l) 2,4-D) and one type of cytokinin (0.5 mg.l) BA Done. Accomplished. The results showed that the best base culture medium for saffron callus formation is 1.2MS culture medium. The second experiment was designed to achieve the best hormonal composition based on a completely random design. The results showed that the best hormonal combination for callus formation, callus retention and maintenance was NAA (5 mg.l) and BA (0.5 mg.l) with 69.04%. Experiment 3 was performed factorially based on a completely randomized design with two factors of sodium pyruvate (zero, 10, 20, 50 and 100 µM) and glucose (15, 30, 60 and 90 g / l) in 3 replications. The results showed that sodium pyruvate and glucose treatments increased fresh weight, dry weight and total flavonoids compared to the control. The highest total antioxidant activity (10.1 mg fresh extract per gram fresh weight) was observed in the treatment of 10 µM sodium pyruvate and 60 g glucose. In the treatment of 20 µM sodium pyruvate and 90 g of glucose, the highest amount of total phenol was (117.7 mg gallic acid per gram of fresh weight). Also, according to the results of high performance liquid chromatography (HPLC) analysis, the highest amount of crocin was 30 mg / g dry weight in the treatment of 50 µM sodium pyruvate and 30 g / l glucose and the maximum amount of picrocrocin was 27 mg / g Dry weight was obtained in the treatment of 10 µM sodium pyruvate and 15 g / l glucose. Also, HPLC analysis did not determine the amount of safranal in any of the treatments.

Keywords: Callus, Zagros saffron, Sodium pyruvate, Glucose, Secondary metabolites.

University of Kurdistan
Faculty of Agriculture
Department of Horticultural Science and Engineering

A Thesis Submitted to the Postgraduate Studies Office in Partial Fulfillment of the Requirements for the Degree of M.Sc in Horticultural Science and Engineering Orientation of Medicinal Plants

Title

Effects of sodium pyruvate and glucose on some morpho- physiological and phytochemical characteristics of *Crocus cancellatus* subsp. *damascenus* callus under *in vitro* condition

By

Farzaneh Noori

The above thesis was evaluated and approved by the following members of the thesis committee with **excellent** quality on December 15, 2021.

Position	Title and Name	Signature
1- Supervisor:	Associ. Prof. Dr. Ali Akbar Mozafari	
2- Supervisor:	Associ. Prof. Dr. Nasser Ghaderi	
3- Advisor:	Assist. Prof. Dr. Jalal Khorshidi	
4- Internal Examiner:	Associ. Prof. Dr. Farzad Nazari	
5- External Examiner:	Associ. Prof. Dr. Yavar Vafaee	

Head of Department
Dr. Farzad Nazari

Faculty Graduate Coordinator
Dr. Gholamreza Heidari

University of Kurdistan
Faculty of Agriculture
Department of Horticultural Science and Engineering

A Thesis Submitted to the Postgraduate Studies Office in Partial Fulfillment Of the Requirements for the Degree of M.Sc in Horticultural Science and Engineering Orientation of Medicinal Plants

Title:

Effects of sodium pyruvate and glucose on some morpho- physiological and phytochemical characteristics of *Crocus cancellatus* subsp. *damascenus* callus under in vitro condition

By:
Farzaneh Noori

Supervisors:
Dr. Ali Akbar Mozafari
Dr. Nasser Ghaderi

Advisor
Dr. Jalal Khorshidi

February 2021

University of Kurdistan
Faculty of Agriculture
Department of Horticultural Science and Engineering

A Thesis Submitted to the Postgraduate Studies Office in Partial Fulfillment Of the Requirements for the Degree of M.Sc in Horticultural Science and Engineering Orientation of Medicinal Plants

Title

Effects of sodium pyruvate and glucose on some morpho-physiological and phytochemical characteristics of *Crocus cancellatus* subsp. *damascenus* callus under *in vitro* condition

By

Farzaneh Noori

Supervisors:

Dr. Ali Akbar Mozafari

Dr. Nasser Ghaderi

Advisor

Dr. Jalal Khorshidi

February 2021