Iranian Journal of Horticultural Science
Vol 53, No 3, Autumn 2022 (785-793)
DOI: 10.22059/ijhs.2022.321405.1913

علوم باغبانی ایران
دورۀ ۵۳، شمارۀ ۳، پاییز ۱۴۰۱ (ص ۷۹۳-۷۸۵)

نشریه پژوهشی:

اثر ریزنمونه و برخی تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی بر باززایی و مقدار وین‌کریستین پروانش (*Catharanthus roseus* L.)

لیلا فرضایی[1] و محمد سیاری[2*]
۱ و ۲. دانشجوی دکتری و دانشیار، دانشکده کشاورزی، دانشگاه بوعلی سینا، همدان، ایران
(تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۱/۲۲ - تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۱۱/۵)

چکیده

هدف این پژوهش بهینه‌سازی غلظت‌های مختلف تنظیم‌کننده‌های رشد و معرفی بهترین ریزنمونه مؤثر بر افزایش راندمان کالوس‌زایی و باززایی گیاه پروانش (*Catharanthus roseus* L.) و نیز شناسایی مرحله رشدی تولیدکننده بیشترین مقدار وین‌کریستین بود. آزمایش به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی انجام شد. عامل اول نوع ریزنمونه در هشت سطح و عامل دوم غلظت‌های مختلف تنظیم‌کننده‌های رشد در نه سطح بود. نتایج نشان داد بیشترین درصد کالوس‌زایی از محیط حاوی ۸ میکرومولار 2,4-D به همراه ۲ میکرومولار بنزیل‌آمینوپورین (BAP) و به ترتیب در ریزنمونه تک گره (۱۰۰ درصد)، هیپوکوتیل (۱۰۰ درصد)، برگ (۱۰۰ درصد)، ریشه (۹۹/۱۶ درصد)، تخمدان (۹۸/۳۳)، دمبرگ (۹۵/۸۳ درصد)، بساک (۹۴/۱۶) و برگ لپه‌ای (۹۳/۳۳) دیده شد. کالوس‌های مشتق شده از هیپوکوتیل، بساک و تخمدان توانایی ایجاد جنین بدنی با راندمان بالا را داشتند. مقدار ۰/۸گرم در لیتر کازئین هیدرولیزات منجر به بالاترین درصد جنین‌زایی شد. بالاترین درصد جوانه‌زنی از ریزنمونه حاصل از هیپوکوتیل (۵۳/۶۶ درصد)، بساک (۵۱/۰۰ درصد) و تخمدان (۴۶/۰۰ درصد) به دست آمد. همچنین درصد باززایی از ریزنمونه‌های هیپوکوتیل بساک و تخمدان به ترتیب ۷۸، ۷۳ و ۶۸ درصد بود. بیشترین مقدار وین‌کریستین در مقایسه انواع کالوس و مراحل مختلف رشد، از گیاهان باززایی شده از کالوس مشتق شده از بساک، تخمدان و هیپوکوتیل به دست آمد و مقدار آن ۱/۴ میکروگرم در هر گرم وزن خشک و بیشتر از کالوس غیر جنین‌زای ریزنمونه‌های مذکور بود.

واژه‌های کلیدی: بساک، تخمدان، جنین سوماتیکی، سازگاری، کالوس‌زایی.

Effect of explants and some plant growth regulators on regeneration and amount of periwinkle's vincristine (*Catharanthus roseus* L.)

Leila Farzaei[1] and Mohammad Sayyari[2*]
1, 2. Ph. D. Candidate and Associate Professor, Faculty of Agriculture, Bu Ali Sina University, Hamedan, Iran
(Received: Apr. 11, 2021 - Accepted: Jan. 25, 2022)

ABSTRACT

The aim of this study was to optimize different concentrations of some growth regulators and introduce the effective explants which lead to increase callus induction and regeneration efficiency in *Catharanthus roseus* L. and recognize growth stage which produce the highest amount of vincristine. The experiment was conducted as a factorial with a completely randomized design. The first factor was explant type at eight levels and the second factor was different concentrations of growth regulators at nine levels. The results showed that the highest percentage of callus induction was observed the medium containing 8 µM 2,4-D with 2 µM BAP in single node (100 percent), hypocotyl (100 percent), leaf (100 percent), root (99.16 percent), ovary (98.33 percent), petiole (95.83 percent), anther (94.16 percent) and cotyledon (93.33 percent) explants, respectively. Calluses derived from hypocotyl, anther and ovary explants were able to produce highly efficient somatic embryos. 0.8 g L^{-1} casein hydrolyzate cause the highest percentage of embryogenesis. The maximum germination percentage was obtained from explants drived from hypocotyl (53.66 %), anther (51.00 %) and ovary (46.00 %). Also, the regeneration percentage of hypocotyl, anther and ovary explants was 78, 73 and 68 percent, respectively. The topmost amount of vincristine in comparison with different types of calluses and different stages of growth was obtained from plants regenerated from callus which derived from anther, ovary and hypocotyl explants and the amount was 1.4 µg g^{-1} dry weight more than non-embryonic callus of the mentioned explants.

Keywords: Anther, callus induction, habituation, ovary, somatic embryo.

* Corresponding author E-mail: m.sayyari@basu.ac.ir

مقدمه

پروانش *Catharanthus roseus* (L.) G.Don گیاه علفی همیشه سبز و متعلق به تیره Apocynaceae است. این گیاه از جمله مهم‌ترین گیاهان دارویی است که حاوی بیش از ۴۰۰ نوع آلکالوئید از نوع ترپنوئید ایندول آلکالوئید می‌باشد (Mohammed *et al*., 2011). پروانش به دلیل وجود آلکالوئیدهای ارزشمند در اندام‌های رویشی از جمله وین‌بلاستین (Vinblastine) و وین‌کریستین (Vincristine) که هر دو اثر ضد توموری و ضدسرطانی دارند در صنایع داروسازی اهمیت بسیاری دارد (Ramezani *et al*., 2018). این دو آلکالوئید از طریق اتصال به میکروتوبول‌ها و توقف تقسیم سلولی در طی متافاز میتوز، خاصیت ضد توموری داشته و سال‌هاست به صورت وسیعی در شیمی‌درمانی بسیاری از سرطان‌ها به کار گرفته می‌شوند (Das *et al*., 2020). قیمت بالا، مقدار بسیار اندک آلکالوئیدهای این گیاه به عنوان تنها منبع، پیچیدگی و چند مرحله ای بودن مسیر سنتز آنها، اثربخشی کمتر داروهای نیمه سنتزی نسبت به انواع طبیعی و درخواست زیاد برای این دو دارو از دلایل مهمی هستند که منجر به تمرکز محققین روی تکنیک‌های کشت بافت جهت افزایش تولید این آلکالوئیدهای ارزشمند در گیاه پروانش شده است (Zhang *et al*., 2011). با وجود گسترش انواع سرطان‌ها و افزایش نیاز به داروهای شیمی‌درمانی و از آنجا که مقدار این متابولیت‌های ثانویه دارویی در گیاه بسیار کم است لذا تکنیک کشت بافت به عنوان راهکار مناسبی برای این منظور به کار گرفته شده است (Chandran *et al.,* 2020). در کل یافتن عوامل مؤثر بر افزایش بیوسنتز وین‌بلاستین و وین‌کریستین از اهداف مهم تحقیقاتی محسوب می‌شود (Jeyapackiaseeli & Kumar, 2021). تغذیه گیاه با پیش ماده‌های مناسب، استفاده از تیمارهای هورمونی و مهندسی متابولیت، ابزارهای مناسبی برای رسیدن به این هدف می‌باشند (Aslam *et al*., 2010a). بهینه‌سازی شرایط کشت مانند اضافه کردن پیش ماده‌های مسیر بیوسنتزی در محیط کشت، می‌تواند سبب افزایش تولید آلکالوئیدها شود (Whitmer *et al*., 2002). از آنجا که آلکالوئیدهای وین‌بلاستین و وین‌کریستین در کشت‌های تمایز نیافته تولید نمی‌گردند، لذا بیشتر پژوهش‌ها جهت دستیابی به عوامل افزایش‌دهنده این آلکالوئیدها، بر کشت‌های تمایز یافته و گیاهان باززا شده به روش جنین‌زایی بدنی معطوف گشته است (Farhadi *et al*., 2021). عوامل مختلفی مانند تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی، انواع ریزنمونه، منابع نیتروژن و کربوهیدرات و نوع محیط کشت در موفقیت جنین‌زایی بدنی دخیل هستند (Mujib *et al*., 2012). هورمون‌های گیاهی علاوه بر تأثیر در رشد، تمایز بافت‌ها، تشکیل و توسعه کالوس در تنوع آلکالوئیدها و افزایش مقدار آنها در گیاه نیز مؤثرند (Hirata *et al*., 1994). در پژوهشی بالاترین درصد کالوس‌زایی ریزنمونه برگ گیاه پروانش از محیط کشت MS به همراه ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر کینتین (KIN) و ۵ میلی‌گرم در لیتر BAP به دست آمد (Ataei-Azimi *et al*., 2008). در پژوهش انجام‌شده توسط Kalidass *et al.* (2009)، به منظور مطالعه مقدار وین‌کریستین در بافت کالوس، ۳۲ تیمار مختلف هورمونی در محیط کشت بررسی شد و نتایج نشان داد هورمون‌های سیتوکنینی اثر مطلوبی بر افزایش حجم کالوس داشتند در حالیکه در بین هورمون‌های اکسینی، 2,4-D نسبت به سایرین سبب رشد بیشتر کالوس شد. همچنین ترکیب هورمونی 2,4-D و BAP اثر بیشتری در افزایش مقدار وین‌کریستین در کالوس نسبت به سایر ترکیبات هورمونی داشت. در مطالعه‌ای Aslam *et al.* (2009)، مقدار وین‌کریستین را در بافت کالوس (جنین‌زا و غیرجنین‌زا)، مراحل مختلف جنین‌زایی (جنین‌های تکثیرشده، بالغ شده و جوانه‌زده)، جنین‌های بدنی مشتق از گیاهچه‌ها (برگ، ریشه و گیاه کامل) و همچنین برگ‌های گیاه پروانش رشد یافته در مزرعه، اندازه‌گیری کردند و مقدار زیادی از این آلکالوئید را در کالوس‌های برگ و جنین‌های جوانه‌زده گزارش کردند و نیز بیان کردند برگ‌های گیاهان تولیدشده در محیط کشت نسبت به برگ‌های گیاهان کشت شده در مزرعه، مقدار بیشتری وین‌کریستین داشتند. در پژوهشی دیگر بالاترین سطح وین‌کریستین و

وین‌بلاستین از برگ‌های گیاهچه‌های باززا شده از جنین بدنی حاصل از هیپوکوتیل به دست آمد (Aslam *et al*., 2010 b). در حالیکه، جنین‌زایی بدنی به‌عنوان یک روش قدرتمند برای افزایش مقدار آلکالوئیدهای دیمری در گیاه پروانش نام برده شده است اما هنوز گزارشی مبنی بر مقایسه درصد جنین‌زایی و محتوای وین‌کریستین در کالوس حاصل از ریزنمونه‌های مختلف رویشی و زایشی وجود ندارد. نوع ریزنمونه در موفقیت جنین‌زایی نیز بسیار مهم است. چندین گزارش در مورد جنین‌زایی و باززایی در گیاه پروانش وجود دارد اما در بیشتر آنها از اندام‌های رویشی مانند هیپوکوتیل و برگ استفاده شده است. هیچ گزارشی مبنی بر مقایسه محتوای وین‌کریستین در گیاهان باززا شده حاصل از کالوس‌های مشتق شده از ریزنمونه‌های رویشی و زایشی وجود ندارد. بنابراین، پژوهش حاضر با هدف تعیین بهترین ترکیب هورمونی در محیط کشت جهت تولید کالوس و باززایی گیاه کامل از ریزنمونه‌های رویشی و زایشی گیاه پروانش و بررسی بیشترین مقدار وین‌کریستین در مراحل مختلف باززایی انجام شد.

مواد و روش‌ها

تهیه مواد گیاهی و ضدعفونی

این آزمایش در آزمایشگاه و گلخانه پژوهشی دانشکده کشاورزی دانشگاه بوعلی سینا در سال‌های ۱۳۹۸ و ۱۳۹۹ انجام شد. بذر F1 گیاه دارویی پروانش *C. roseus* (L.) از شرکت پاکان بذر اصفهان خریداری گردید. بذرها ابتدا با آب و چند قطره مایع ظرفشویی شسته شدند و به مدت ۴۵ دقیقه زیر آب جاری قرار گرفتند، سپس در الکل ۷۰ درصد به مدت ۳ دقیقه و پس از آن به مدت ۱۰ دقیقه در هیپوکلرید سدیم (۱/۵ درصد کلر فعال) حاوی چند قطره مایع ظرفشویی ضدعفونی و در نهایت پنج بار (۸، ۶، ۴، ۲ و ۱ دقیقه) با آب مقطر استریل شست و شو شدند (Junaid *et al*., 2006). سپس به محیط کشت پایه MS فاقد هورمون منتقل شدند و پس از رشد و رسیدن به حد مطلوب از آنها ریزنمونه هیپوکوتیل، ریشه، برگ لپه‌ای، تک گره، دمبرگ و برگ تهیه شد و همزمان ریزنمونه‌های بساک و تخمدان از گیاهانی که زودتر در گلدان کشت شدند و در گلخانه رشد یافته بودند برداشت شدند. انتخاب مرحله مناسب نمونه‌برداری بساک و تخمدان طبق پروتوکل توصیف شده توسط Kim *et al.* (1994)، حدود ۳ تا ۷ روز قبل از شکوفایی گل انجام شد.

القای کالوس

این پژوهش به‌صورت آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۳ تکرار و ۲ مشاهده در هر تکرار انجام شد. فاکتور اول نوع ریزنمونه و فاکتور دوم ترکیبات مختلف تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی بودند. پس از رسیدن گیاهان به رشد مطلوب در شرایط درون شیشه‌ای، ریزنمونه‌ها که شامل هیپوکوتیل، ریشه، برگ لپه‌ای، تک گره، دمبرگ و برگ بودند برداشت شدند همچنین ریزنمونه‌های بساک و تخمدان از گیاهان رشد یافته در گلخانه نیز برداشت و پس از ضدعفونی سطحی مطابق آنچه پیش‌تر گفته شد جهت القای کالوس در محیط کشت MS پایه دارای تیمارهای مختلف هورمونی شامل 2,4-D (صفر، ۲، ۴ و ۸ میکرومولار) در ترکیب با BAP (صفر، ۰/۵، ۱ و ۲) کشت شدند. برای هر لیتر محیط کشت MS، ۷ گرم در لیتر آگار و ۳۰ گرم در لیتر ساکارز استفاده شد. pH محیط روی ۵/۷ تنظیم، سپس در دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد و فشار ۱/۵ اتمسفر به مدت ۱۵ دقیقه اتوکلاو شد. همچنین ریزنمونه‌ها تا ظهور کالوس در تناوب نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی و دمای ۱±۲۵ درجه سانتی گراد قرار گرفتند. کالوس‌ها هر چهار هفته یک‌بار در محیط جدید واکشت شده و درصد کالوس‌زایی بررسی شد.

القای کالوس جنین‌زا و بلوغ جنین

کالوس‌های دارای رنگ روشن و بافت ترد از ریزنمونه‌های مختلف به محیط جنین‌زایی شامل محیط کشت MS با غلظت‌های مختلف کازئین هیدرولیزات (صفر، ۰/۲، ۰/۴، ۰/۸ و ۱ گرم در لیتر) منتقل شدند و هر چهار هفته یکبار پس از حذف کردن کالوس‌های غیر جنین‌زا، کالوس‌های جنین‌زا

واکشت شدند و پس از شش مرحله واکشت، نمونه‌ها به محیط مناسب جهت تمایز انتقال داده شدند. کالوس‌های جنین‌زا در مرحله کروی جهت بلوغ جنین، به محیط بدون کازئین هیدرولیزات و حاوی ۲/۶۰ میکرومولار اسید جیبرلیک (GA3) به همراه ۲/۵ گرم در لیتر زغال فعال منتقل شده و پس از دو مرتبه واکشت در این محیط، درصد جنین‌زایی با شمارش جنین‌های بدنی محاسبه شد (Junaid *et al*., 2006). در هر مرحله واکشت، درب پتری‌ها با پارافیلم بسته و در تاریکی و در اتاقک رشد با دمای ۱±۲۵ درجه سانتی گراد نگهداری شدند.

باززایی گیاهان و سازگاری

با ظهور لپه در جنین‌های سوماتیکی، آنها از کالوس جدا و مجدد واکشت شدند و گیاهان جوانه‌زده دارای ریشه، هیپوکوتیل، لپه و برگ‌های اولیه به محیط باززایی که شامل محیط کشتMS دارای بنزیل آدنین (BA) (۲/۲۴ میکرومولار) و ایندول بوتریک اسید (IBA) (۷/۳۸ میکرومولار) و ۲/۵ گرم در لیتر زغال فعال انتقال داده شدند. شیشه‌های کشت در اتاقک رشد با تناوب نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی و دمای ۱±۲۵ درجه سانتی گراد قرار گرفتند. پس از گسترش ریشه و نمایان شدن حداقل ۴ تا ۶ برگ حقیقی، گیاهچه‌ها از شیشه خارج در لیوان‌های پلاستیکی با بستر کوکوپیت و پرلیت استریل (نسبت ۱:۱) کشت و به مدت یک ماه در محیط با رطوبت نسبی ۹۵ درصد و نور مصنوعی در اتاقک رشد نگهداری شدند. سپس به تدریج سازگار شده و پس از گذشت دو ماه و رسیدن به ارتفاع ۸ تا ۱۰ سانتی‌متری با ۱۰ تا ۱۲ برگ حقیقی توسعه یافته به گلدان‌های دارای نسبت ۱:۱:۱ خاک زراعی، ماسه و برگ پوسیده منتقل و به‌منظور بررسی محتوای وین‌کریستین در گلخانه نگهداری شدند.

تهیه عصاره جهت تزریق به دستگاه کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC)

از کالوس‌های حاصل از ریزنمونه‌های مختلف تحت تیمارهای هورمونی متفاوت و کالوس در مراحل مختلف (غیر جنین‌زا، جنین‌زا، جوانه‌زده و باز زا شده)، عصاره‌گیری شد (Pan *et al*., 2010). میزان آلکالوئید وین‌کریستین آنها با دستگاه کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC) اندازه‌گیری شد (Hisiger & Jolicoeur, 2007). در نهایت ریزنمونه، تیمار هورمونی و مرحله رشدی که منجر به تولید بیشترین مقدار آلکالوئید وین‌کریستین بود معرفی شد.

تجزیه و تحلیل آماری

این پژوهش به صورت آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۳ تکرار انجام شد. آزمون نرمال‌سازی تمامی داده‌ها صورت گرفت و تجزیه واریانس با استفاده از نرم افزار SAS 9.4، با کمک رویه GLM و مقایسه میانگین‌ها با آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ۵ درصد انجام شد.

نتایج و بحث

القای کالوس

چهار هفته پس از کشت ریزنمونه‌ها، بر اساس نتایج تجزیه واریانس داده‌ها معلوم شد اثر ساده نوع ریزنمونه و تیمارهای هورمونی و اثر متقابل آنها بر درصد کالوس‌زایی دارای اختلاف معنی‌دار در سطح یک درصد است. بیشترین درصد کالوس‌زایی (۱۰۰ درصد) از محیط حاوی ۸ میکرومولار 2,4-D به همراه ۲ میکرومولار BAP و به دنبال آن از محیط حاوی ۸ میکرومولار 2,4-D به همراه ۱ میکرومولار BAP به دست آمد. همچنین ریزنمونه هیپوکوتیل، برگ، تک گره، ریشه، تخمدان، دمبرگ، برگ لپه‌ای و بساک به ترتیب بالاترین درصد کالوس‌زایی را داشتند (نمودار ۱). Tonk *et al*. (2016) گزارش کردند ریزنمونه هیپوکوتیل گیاه پروانش در محیط کشت MS حاوی ۴/۵ میکرومولار 2,4-D به همراه ۲ میکرومولار BAP بیشترین کالوس‌زایی را داشته و کالوس‌هایی ترد، با رنگ روشن و رشد سریع ایجاد شدند که توانایی ایجاد جنین بدنی را داشتند. Ilah *et al*. (2009) بیان کردند در مقایسه درصد کالوس‌زایی هیپوکوتیل، اپی‌کوتیل و ریشه گیاه پروانش تحت تیمار هورمونی انواع مختلف اکسین، بیان کردند بیشترین درصد کالوس از ریزنمونه هیپوکوتیل کشت شده در

محیط کشت MS حاوی ۴/۵ و ۲/۵ میکرومولار 2,4-D به دست آمد. نتایج حاصل از این پژوهش با نتایج سایر پژوهشگران مطابقت داشته و بیان می‌دارد بالاترین غلظت هورمون‌های به کار رفته منجر به بیشترین درصد کالوس‌زایی در ریزنمونه‌ها شد.

بلوغ جنین، جوانه‌زنی و باززایی

بعد از گذشت شش ماه از واکشت کالوس‌ها، کالوس‌های غیر جنین‌زا حذف و کالوس‌های جنین‌زا به محیط تمایز منتقل شدند. پس از چهار هفته کشت در محیط تمایز، جنین‌های بدنی مشاهده شدند و سپس آنها به محیط بلوغ جنین (شکل d-۱) انتقال داده شدند و یک ماه بعد درصد جنین‌زایی ریزنمونه‌ها بررسی شد. ریزنمونه‌های برگ، لپه و دمبرگ باعث ایجاد کالوس‌های ترد، سفید و جنین‌زا شدند اما درصد آنها ناچیز بود. کالوس‌های تشکیل شده از ریشه و گره فشرده یا آبکی، زرد و غیر جنین‌زا بودند (شکل a-۱)، اما کالوس مشتق‌شده از ریزنمونه‌های هیپوکوتیل، بساک و تخمدان ترد، سفید و جنین‌زا بودند (شکل b-۱). استفاده از کازئین هیدرولیزات باعث افزایش قابل توجه جنین‌زایی در ریزنمونه‌های هیپوکوتیل، بساک و تخمدان شد. اثر کازئین هیدرولیزات بر درصد جنین‌زایی در سطح یک درصد معنی‌دار بود (جدول ۱) و حداکثر جنین‌زایی در محیط همراه با ۰/۸گرم در لیتر کازئین هیدرولیزات مشاهده شد (جدول ۲). همچنین اثر ریزنمونه بر جوانه‌زنی و باززایی معنی‌دار نشد (جدول ۳) و بیشترین درصد جوانه‌زنی جنین از ریزنمونه مشتق شده از هیپوکوتیل (۵۳/۶۶ درصد)، بساک (۵۱/۰۰ درصد) و تخمدان (۴۶/۰۰ درصد) به دست آمد (جدول ۴ و شکل c-۱). چهار هفته پس از کشت، درصد گیاهان دارای ۴ تا ۶ برگ حقیقی بررسی شد (شکل e-۱) و نتایج نشان داد علی‌رغم غیر معنی‌دار بودن اثر ریزنمونه، درصد باززایی در جنین‌های حاصل از ریزنمونه‌های هیپوکوتیل بساک و تخمدان به ترتیب ۷۸، ۷۳ و ۶۸ درصد بود (جدول ۴). گیاهان باززا شده که ساختار ریشه و ساقه به خوبی در آنها توسعه پیدا کرده بود جهت سازگاری ابتدا به بستر حاوی کوکوپیت و پرلیت منتقل (شکل f-۱) و یک ماه پس از آغاز سازگاری در گلدان و اتاقک رشد (شکل g-۱)، به گلخانه منتقل شدند (شکل h-۱). بر اساس نتایج پژوهش Junaid *et al.* (2007)، کالوس‌زایی از ریزنمونه‌های رویشی گیاه پروانش دارای کارایی بالایی است، اما ایجاد جنین بدنی و باززایی از آن پیچیده و تحت تأثیر عوامل خارجی مختلفی می‌باشد. Aslam *et al.* (2009)، کالوس‌زایی را در ریزنمونه‌های مختلفی شامل برگ، تک‌گره، ریشه و هیپوکوتیل بذرهای جوانه‌زده گیاه پروانش در شرایط آزمایشگاهی بررسی کردند، کالوس‌های جنین‌زا فقط از ریزنمونه هیپوکوتیل تولید شدند. جنین‌زایی بدنی از کالوس‌های حاصل از ریزنمونه بساک گیاه پروانش نیز گزارش شده است (Kim *et al.*, 1994). همچنین Kim *et al.* (2004)، باززایی از جنین‌های زیگوتی نابالغ را در گیاه پروانش گزارش کردند. مطالعه Yuan *et al.* (2011)، نشان می‌دهد که کازئین هیدرولیزات به عنوان منبع نیتروژن تأثیر زیادی در جنین‌زایی بدنی و باززایی گیاه پروانش دارد. علاوه بر تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی، نقش منبع کربن و غلظت آن در بلوغ جنین و جوانه‌زنی آن در شرایط آزمایشگاهی بسیار حائز اهمیت است (Junaid *et al.*, 2006). نتایج Choi *et al.* (2003)، نشان داد نوع ریزنمونه، غلظت و نوع تنظیم‌کننده‌های رشد عامل مهمی برای باززایی گیاه است به نحوی که بیشترین باززایی در گیاه پروانش از جنین‌زایی بدنی جنین‌های بالغ بذر به دست آمد. Afreen *et al.* (2002)، گزارش کردند می‌توان از گیاهان باززا شده از جنین‌های بدنی گیاه پروانش، برای تولید آلکالوئیدهای دارویی و نیز مطالعات مربوط به دستکاری‌های ژنتیکی بهره جست.

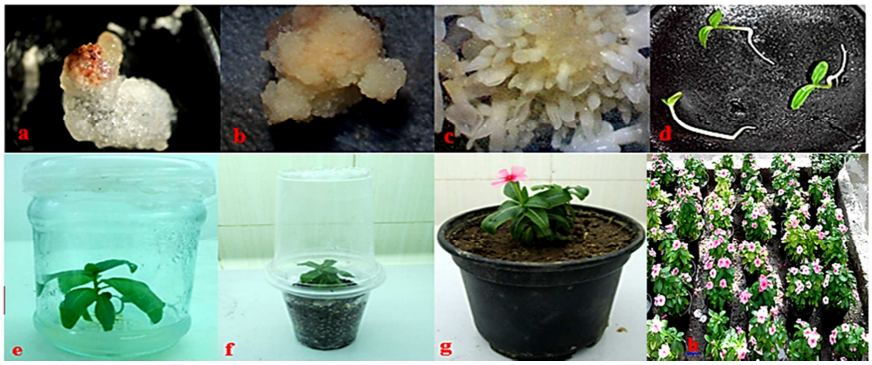
جدول ۱. نتایج تجزیه واریانس اثر کازئین هیدرولیزات و ریزنمونه بر جنین‌زایی پروانش.

Table 1. Results of variance analysis effect of casein hydrolyzate and explant on embryogenesis percentage of *Catharanthus roseus*.

Source of variation	df	Mean of squares
Casein hydrolyzate	3	1030.91**
Explant	2	55.02**
Casein hydrolyzate × explant	6	291.90**
Error	24	5.72
C.V. (%)	-	15.80

** تفاوت معنی‌دار در سطح احتمال ۱ درصد.

** Significanlty difference at 1% of probability level.



شکل ۱. باززایی درون شیشه‌ای گیاه پروانش با جنین‌زایی سوماتیکی: a) کالوس غیر جنین‌زا، b) کالوس ترد جنین‌زای حاصل از ریزنمونه هیپوکوتیل، c) جوانه‌زنی جنین، d) بلوغ جنین، e) گیاه باززا شده از جنین سوماتیکی، f، g و h) سازگاری گیاه.

Figure 1. *In vitro* plant regeneration in *Catharanthus roseus* via somatic embryogenesis; a) nonembryogenic callus, b) friable embryogenic callus from hypocotyl explant, c) embryo germination, d) embryo maturation, e) regenerated plant from somatic embryo, f, g and h) plant habituation.

جدول ۲. مقایسه میانگین اثر متقابل کازئین هیدرولیزات و ریزنمونه بر جنین‌زایی پروانش.

Table 2. Mean comparison interaction effect of casein hydrolyzate and explant on embryogenesis percentage of *Catharanthus roseus*.

Explants	Casein hydrolysate			
	0	0.2 gl^{-1}	0.4 gl^{-1}	0.8 gl^{-1}
Hypocotyl	6.33^{fgh}	10.00^{f}	22.66^{cd}	30.66^{a}
Ovary	4.33^{gh}	8.66^{fg}	18.66^{de}	27.66^{ab}
Anther	3.00^{h}	6.66^{fgh}	17.00^{e}	26.00^{bc}

در هر ستون میانگین‌هایی با حداقل یک حرف مشترک، در سطح احتمال پنج درصد تفاوت معنی داری ندارند .

In each column means followed by at least a common letter, are not significantly different at 5% probebility level.

جدول ۳. نتایج تجزیه واریانس اثر ریزنمونه بر درصد جوانه‌زنی و باززایی پروانش.

Table 3.- Results of variance analysis effect of explant on germination and regeneration percentage of *Catharanthus roseus*.

Source of variation	df	Mean of squares	
		Germination (%)	Regeneration (%)
Explant	2	45.44 $^{n.s}$	75.00 $^{n.s}$
Error	6	21.77	25.00
C. V. (%)	-	9.29	5.88

n.s: نبود تفاوت معنی‌دار.

n.s: None- significanlty difference.

جدول ۴. مقایسه میانگین اثر ریزنمونه بر درصد جوانه‌زنی و باززایی پروانش.

Table 4. Mean comparison effect of explant on germination and regeneration percentage of *Catharanthus roseus*.

Explants	Germination (%)	Regeneration (%)
Hypocotyl	53.66^{a}	78.00^{a}
Ovary	46.00^{a}	68.00^{a}
Anther	51.00^{a}	73.00^{a}

در هر ستون میانگین‌هایی با حداقل یک حرف مشترک، در سطح احتمال پنج درصد تفاوت معنی داری ندارند.

In each column means followed by at least a common letter, are not significantly different at 5% probebility level.

محتوای وین‌کریستین

مقدار وین‌کریستین در کالوس‌های غیر جنین‌زا یک درصد معنی‌دار بود (جدول ۵) و جنین‌زا در سطح یک درصد، در مرحله جوانه‌زنی در سطح پنج درصد معنی‌دار شد و در مرحله باززایی غیرمعنی‌دار بود (جدول ۶). در کالوس غیر جنین‌زا، بیشترین مقدار وین‌کریستین در کالوس مشتق شده از برگ (۰/۶۵۷ میکروگرم در هر گرم وزن خشک) و کالوس حاصل از هیپوکوتیل (۰/۱۸۳ میکروگرم در هر گرم وزن خشک) دیده شد در حالیکه در سایر ریزنمونه‌ها قابل تشخیص نبود. حداکثر وین‌کریستین از کالوس جنین‌زا به ترتیب در کالوس جنین‌زای حاصل از هیپوکوتیل، بساک و تخمدان به‌ترتیب ۰/۲۴۸، ۰/۱۱۸ و ۰/۱۰۸ میکروگرم در هر گرم وزن خشک به‌دست آمد. بیشترین محتوای وین‌کریستین در مرحله جوانه‌زنی در جنین‌های مشتق شده از بساک (۰/۳۸۴ میکروگرم در هر گرم وزن خشک)، تخمدان (۰/۳۵۸ میکروگرم در هر گرم وزن خشک) و هیپوکوتیل (۰/۳۳۶ میکروگرم در هر گرم وزن خشک) ثبت شد. در برگ گیاهچه‌های باززا شده محتوای وین‌کریستین تفاوت معنی‌داری نداشت اما در مقایسه مراحل مختلف، بیشترین مقدار وین‌کریستین از گیاهان باززا شده به دست آمد (جدول ۷). تعادل بین مواد غذایی آلی و غیر آلی، منبع کربن، تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی و تنش‌ها می‌توانند مسیر بیوسنتز آلکالوئیدها را تحت تأثیر قرار دهند.

جدول ۵. نتایج تجزیه واریانس اثر ریزنمونه بر محتوای وین‌کریستین در کالوس غیر جنین‌زا پروانش.

Table 5. Results of variance analysis effect of explant on vincristine content in non-embryogenic calli of *Catharanthus roseus*.

Source of variation	df	Mean of squares
		Non-Embryogenic calli
Explant	7	0.147**
Error	16	0.00012
C. V. (%)	-	8.58

** تفاوت معنی‌دار در سطح احتمال ۱ درصد.

** Significanlty difference at 1% of probability level.

جدول ۶. نتایج تجزیه واریانس اثر ریزنمونه بر محتوای وین‌کریستین در کالوس جنین‌زا، مرحله جوانه‌زنی و گیاه باززا شده پروانش.

Table 6. Results of variance analysis effect of explant on vincristine content in embryogenic calli, germination stage and regenerated plantlet of *Catharanthus roseus.*

Source of variation	df	Mean of squares		
		EC	GE	RP
Explant	2	0.018**	0.0017*	0.00021 ns
Error	6	0.00011	0.00022	0.0062
C. V. (%)	-	6.80	4.20	5.561

EC= کالوس جنین‌زا، GE= مرحله جوانه‌زنی و RP= گیاه باززا شده

*، ** و ns: به ترتیب تفاوت معنی‌دار در سطح احتمال ۵ و ۱ درصد و نبود تفاوت معنی‌دار.

EC= Embryogenic Calli, GE= Germinated Embryo and RP= Regenerated Plantlet.

*,**, ns: Significanlty difference at 5 and 1% of probability level and non- significanlty difference, respectively.

جدول ۷. مقایسه میانگین اثر ریزنمونه بر محتوای وین‌کریستین در کالوس غیر جنین‌زا، کالوس جنین‌زا، مرحله جوانه‌زنی و گیاه باززا شده پروانش.

Table 7. Mean comparison effect of explant on vincristine content in non-embryogenic calli, embryogenic calli, germination stage and regenerated plantlet of *Catharanthus roseus*.

Explants	Vincristine content (μg g^{-1} DW)			
	NE	EC	GE	RP
Root	Not detected	-	-	-
Hypocotyl	0.183[b]	0.248[a]	0.336[b]	1.413[a]
Cotyledon	0.110[c]	-	-	-
Nod	0.111[c]	-	-	-
Petiole	0.116[c]	-	-	-
Leaf	0.657[a]	-	-	-
Ovary	Not detected	0.108[b]	0.358[ab]	1.423[a]
Anther	Not detected	0.118[b]	0.384[a]	1.430[a]

NE= کالوس غیر جنین‌زا، EC= کالوس جنین‌زا، GE= مرحله جوانه‌زنی و RP= گیاه باززا شده

در هر ستون میانگین‌هایی با حداقل یک حرف مشترک، در سطح احتمال پنج درصد تفاوت معنی داری ندارند.

NE= Non-Embryogenic calli, EC= Embryogenic Calli, GE= Germinated Embryo and RP= Regenerated Plantlet.

In each column means followed by at least a common letter, are not significantly different at 5% probebility level.

Aslam *et al.* (2010b)، محتوای آلکالوئید وین‌بلاستین گیاه پروانش را در کالوس غیر جنین‌زا و جنین‌زا حاصل از ریزنمونه برگ، ریشه و تک گره بررسی کردند نتایج آنها نشان داد بیشترین مقدار وین‌بلاستین در کالوس مشتق شده از برگ (۴/۸۰ میکروگرم در هر گرم وزن خشک پس از ۲۵ هفته) دیده شد. همچنین بیشترین مقدار این آلکالوئید در مرحله جوانه‌زنی جنین (۱۰/۰۴ میکروگرم در هر گرم وزن خشک پس از ۲۵ هفته) گزارش شد. همچنین گیاهان باززا شده از جنین بدنی مقدار ۲/۲ میکروگرم در هر گرم وزن خشک وین‌بلاستین بیشتری نسبت به گیاهان رشد یافته در مزرعه داشتند. در پژوهشی بیان کردند سنتز متابولیت‌های ثانویه ارتباط مستقیمی با تمایز سلول‌های گیاهی دارند نتایج مطالعه حاضر همسو با سایر پژوهش‌ها نشان داد محتوای آلکالوئید وین‌کریستین نیز وابسته به مرحله رشد بوده و با تکامل بافت و توسعه مرحله رشد میزان تجمع آن افزایش می‌یابد به طوریکه در گیاه باززا شده از کالوس مشتق شده از بساک، تخمدان و هیپوکوتیل مقدار آن ۱/۴ میکروگرم در هر گرم وزن خشک بیشتر از کالوس غیر جنین‌زای ریزنمونه‌های مذکور بود (Ma *et al.*, 2006). Aslam *et al.* (2009)، گزارش کردند مقدار آلکالوئید وین‌کریستین به سن و مرحله رشد و تمایز بافت وابسته است و بیشترین مقدار آن در مرحله جوانه‌زنی جنین پس از ۲۰ هفته و گیاهان باززا شده در شرایط درون شیشه‌ای در مقایسه با گیاهان رشد یافته در مزرعه دیده شد.

نتیجه‌گیری کلی

کالوس‌زایی در تمام ریزنمونه‌ها و سطوح مختلف هورمونی رخ داد و غلظت ۸ میکرومولار 2,4-D به همراه ۱ میکرومولار BAP به عنوان بهترین محیط کالوس‌زایی مشخص شد. ریزنمونه تک گره، ریشه، هیپوکوتیل، تخمدان، برگ، دمبرگ، برگ لپه‌ای و بساک به ترتیب بالاترین درصد کالوس‌زایی را نشان دادند. در کشت بافت راندمان باززایی گیاه از جنین بدنی بسیار اهمیت دارد و عوامل مختلفی از جمله نوع ریزنمونه و تیمارهای هورمونی مختلف بر آن تأثیر گذار است. در بین

ریزنمونه‌های مختلف استفاده شده در این پژوهش ریزنمونه‌های هیپوکوتیل، بساک و تخمدان کالوس جنین‌زا تولید کرده و به ترتیب بالاترین درصد جوانه‌زنی و باززایی را نشان دادند. با تکامل بافت محتوای وین‌کریستین افزایش یافت به طوریکه در مقایسه‌ی انواع کالوس (غیر جنین‌زا و جنین‌زا) و مراحل مختلف رشد (جوانه‌زنی و باززایی)، بیشترین مقدار وین‌کریستین از گیاهان باززا شده به دست آمد.

REFERENCES

1. Afreen, F., Zobayed, S. M. A. & Kozai, T. (2002). Photoautotrophic culture of *Coffea arabusta* somatic embryos: development of a bioreactor for large-scale plantlet conversion from cotyledonary embryos. *Annals of Botany*, *90*(1), 21-29.
2. Aslam, J., Khan, S. H., Siddiqui, Z. H., Fatima, Z., Maqsood, M., Bhat, M. A., & Sharma, M. P. (2010 a). *Catharanthus roseus* (L.) G. Don. An important drug: it's applications and production. *Pharmacie Globale (IJCP)*, *4*(12), 1-16.
3. Aslam, J., Mujib, A., Fatima, Z. & Sharma, M. P. (2010 b). Variations in vinblastine production at different stages of somatic embryogenesis, embryo, and field-grown plantlets of *Catharanthus roseus* L.(G) Don, as revealed by HPLC. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, *46*(4), 348-353.
4. Aslam, J., Mujib, A., Nasim, S. A. & Sharma, M. P. (2009). Screening of vincristine yield in *ex vitro* and *in vitro* somatic embryos derived plantlets of *Catharanthus roseus* L. (G) Don. *Scientia Horticulturae*, *119*(3), 325-329.
5. Ataei-Azimi, A., Hashemloian, B. D., Ebrahimzadeh, H. & Majd, A. (2008). High *in vitro* production of ant-canceric indole alkaloids from periwinkle (*Catharanthus roseus*) tissue culture. *African Journal of Biotechnology*, *7*(16), 2834-2839.
6. Chandran, H., Meena, M., Barupal, T. & Sharma, K. (2020). Plant tissue culture as a perpetual source for production of industrially important bioactive compounds. *Biotechnology Reports*, *26*, e00450.
7. Choi, P. S., Lee, S. Y., Chung, H. J., In, D. S., Choi, D. W. & Liu, J. R. (2003). Assessing competence for adventitious shoot formation in hypocotyl explant cultures from *Catharanthus roseus* cultivars. *Journal of Plant Biology*, *46*(2), 90-94.
8. Das, A., Sarkar, S., Bhattacharyya, S. & Gantait, S. (2020). Biotechnological advancements in *Catharanthus roseus* (L.) G. Don. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *104*(11), 4811-4835.
9. Farhadi, H., Hassanpouraghdam, M. B. & Aazami, M. A. (2021). The induction and development of somatic embryos from the *in vitro* cultures of *Catharanthus roseus* (L.) G. Don. *Advances in Horticultural Science*, *35*(1), 232-246.
10. Hirata, K., Miyamoto, K. & Miura, Y. (1994). *Catharanthus roseus* L. (Periwinkle): production of vindoline and catharanthine in multiple shoot cultures. In *Medicinal and Aromatic Plants VI* (pp. 46-55). Springer, Berlin, Heidelberg.
11. Hisiger, S. & Jolicoeur, M. (2007). Analysis of *Catharanthus roseus* alkaloids by HPLC. *Phytochemistry Reviews*, *6*(2-3), 207-234.
12. Ilah, A., Mujib, A., Junaid, A., Samar, F. & Abdin, M. Z. (2009). Somatic embryogenesis and two embryo specific proteins (38 and 33 kD) in *Catharanthus roseus*. *Biologia*, *64*(2), 299-304.
13. Jeyapackiaseeli, R. & Kumar, T. D. (2021). Research works in alkaloid enhancement in plants-A Brief Review. *Soft Computing for Intelligent Systems*, 451-465.
14. Junaid, A., Mujib, A., Bhat, M. A. & Sharma, M. P. (2006). Somatic embryo proliferation, maturation and germination in *Catharanthus roseus*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, *84*(3), 325-332.
15. Junaid, A., Mujib, A., Bhat, M. A., Sharma, M. P. & Šamaj, J. (2007). Somatic embryogenesis and plant regeneration in *Catharanthus roseus*. *Biologia Plantarum*, *51*(4), 641-646.
16. Kalidass, C., Mohan, V. R. & Daniel, A. (2009). Effect of auxin and cytokinin on vincristine production by callus cultures of *Catharanthus roseus* L. (apocynaceae). *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, *12*(2), 283-288.
17. Kim, S. W., In, D. S., Choi, P. S. & Liu, J. R. (2004). Plant regeneration from immature zygotic embryo-derived embryogenic calluses and cell suspension cultures of *Catharanthus roseus*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, *76*(2), 131-135.
18. Kim, S. W., Song, N. H., Jung, K. H., Kwak, S. S. & Liu, J. R. (1994). High frequency plant regeneration from anther-derived cell suspension cultures via somatic embryogenesis in *Catharanthus roseus*. *Plant Cell Reports*, *13*(6), 319-322.
19. Ma, R., Ritala, A., Oksman-Caldentey, K. M. & Rischer, H. (2006). Development of in vitro techniques for the important medicinal plant *Veratrum californicum*. *Planta Medica*, *72*(12), 1142-1148.

20. Mohammed, F., Satyapal, S., Tanwer, B. S., Moinuddin, K. & Anwar, S. (2011). *In vitro* regeneration of multiplication shoots in *Catharanthus roseus*-an important medicinal plant. *Advances in Applied Science Research*, *2*(1), 208-313.
21. Mujib, A., Ilah, A., Aslam, J., Fatima, S., Siddiqui, Z. H. & Maqsood, M. (2012). *Catharanthus roseus* alkaloids: application of biotechnology for improving yield. *Plant Growth Regulation*, *68*(2), 111-127.
22. Pan, Q., Chen, Y. U., Wang, Q., Yuan, F., Xing, S., Tian, Y., & Tang, K. (2010). Effect of plant growth regulators on the biosynthesis of vinblastine, vindoline and catharanthine in *Catharanthus roseus*. *Plant Growth Regulation*, *60*(2), 133-141.
23. Ramezani, A., Haddad, R., Sedaghati, B. & Jafari, D. J. S. A. (2018). Effects of fungal extracts on vinblastine and vincristine production and their biosynthesis pathway genes in *Catharanthus roseus*. *South African Journal of Botany*, *119*, 163-171.
24. Tonk, D., Mujib, A., Maqsood, M., Ali, M. & Zafar, N. (2016). *Aspergillus flavus* fungus elicitation improves vincristine and vinblastine yield by augmenting callus biomass growth in *Catharanthus roseus*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, *126*(2), 291-303.
25. Whitmer, S., van der Heijden, R. & Verpoorte, R. (2002). Effect of precursor feeding on alkaloid accumulation by a tryptophan decarboxylase over-expressing transgenic cell line T22 of *Catharanthus roseus*. *Journal of Biotechnology*, *96*(2), 193-203.
26. Yuan, F., Wang, Q., Pan, Q., Wang, G., Zhao, J., Tian, Y. & Tang, K. (2011). An efficient somatic embryogenesis based plant regeneration from the hypocotyl of *Catharanthus roseus*. *African Journal of Biotechnology*, *10*(66), 14786-14795.
27. Zhang, J. F., Gong, S. & Guo, Z. G. (2011). Effects of different elicitors on 10-deacetylbaccatin III-10-O-acetyltransferase activity and cytochrome P450 monooxygenase content in suspension cultures of *Taxus cuspidata* cells. *Cell Biology International Reports*, *18*(1), 7-13.