https://ijpb.ui.ac.ir/?lang=en
Journal of Plant Biological Sciences
E-ISSN: 3041-9603
Vol. 17, Issue 1, No. 63, 2025
Document Type: Research Paper
Received: 18/08/2025 Accepted: 08/10/2025

Optimization of Hairy Root Establishment and Increased Catharanthine Production Using Methyl Jasmonate Elicitor in *Catharanthus roseus*

Roghayyeh Hazrati[1], Nasser Zare[1]*, Mahsa Samadi[1], Rasool Asghari Zakaria[1], Mansour Miran[2]

1- Department of Production Engineering and Plant Genetics, Faculty of Agriculture and Natural Resources, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, Iran

2- Department of Pharmacognosy, School of Pharmacy, Ardabil University of Medical

Abstract

Catharanthus roseus is a highly significant medicinal plant that produces alkaloids with notable therapeutic effects for treating various cardiovascular diseases and cancers. Due to the low production of secondary metabolites, hairy root culture, which offers high stability, is a suitable method to increase the efficiency of these metabolites. In this experiment, the effects of A4, A7, A13, 11325, 15834, and k599 strains, and of B5, 1/2B5, 1/4B5, MS, 1/2MS, and 1/4MS media on the induction of hairy roots in leaf explants were evaluated. Then, the best medium for hairy root proliferation was assessed in B5, 1/2B5, 1/4B5, 1/8B5, MS, 1/2MS, 1/4MS, and 1/8MS liquid media. The effects of methyl jasmonate (0, 100, and 200 µM) on protein levels, EC, malondialdehyde, and Catharanthine were investigated. The results showed that all strains induced hairy roots, but differences in hairy root percentage were observed. The highest hairy root percentage (60.67%) was obtained with the A4 strain and the 1/4B5 solid medium. The rate of hairy roots varied across different liquid media, with the best medium yielding 1/4B5 hairy roots (4.146 g). Hairy roots treated with methyl jasmonate showed an increase in the studied traits compared to the control, so that the highest amount of protein (18.142 mg/g), EC (757.67 mS/mm), and MDA (0.118 nmol/g) was observed in the 200 µM methyl jasmonate. The amount of Catharanthine also increased significantly in hairy roots treated with 100 and 200 µM methyl jasmonate compared to the control. The results of this study showed that using strain A4 in combination with 1/4 B5 medium provides the best conditions for the induction and growth of hairy roots of Catharanthus roseus, and that the use of methyl jasmonate as an elicitor significantly increases the production of proteins and valuable secondary metabolites in hairy roots. These methods can be effective and sustainable strategies for improving the yield of medicinal metabolites from *C. roseus*.

Keywords: *Agrobacterium rhizogenes*, Elicitor, Periwinkle, Media concentration, Secondary metabolite

*Corresponding Author: zarenasser@gmail.com

3041-9603 © University of Isfahan
This is an open access article under the CC BY-NC-ND/4.0/ License (https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/).

doi: 10.22108/IJPB.2025.146378.1419

Introduction

Beyond its ornamental appeal, *Catharanthus roseus* is renowned for its bioactive indole alkaloids such as vincristine, vinblastine, and catharanthine, which have made it a cornerstone of pharmaceutical research and cancer treatment. Catharanthine is a complex indole monoterpenoid alkaloid that plays an essential role in the biosynthesis of anticancer agents such as vinblastine and vincristine. Plants synthesize secondary metabolites such as alkaloids, flavonoids, and terpenoids through complex biosynthetic pathways that play important roles in defense, stress response, and ecological interaction. *In vitro* tissue culture techniques offer a powerful alternative to plant culture for the production of secondary metabolites. Hairy root culture provides distinct advantages for the production of secondary metabolites. Hairy roots retain the distinctive characteristics and biosynthetic capacity of plant roots, leading to higher genetic stability and more stable production of compounds such as alkaloids, phenols, and terpenoids. Elicitors play a fundamental role in stimulating plant defense responses that lead to increased biosynthesis of secondary metabolites. Elicitors such as methyl jasmonate and salicylic acid, by simulating biotic or abiotic stress conditions, activate key signaling pathways and increase the expression of genes involved in the production of valuable compounds such as alkaloids, flavonoids, and terpenoids. This study reviews an advanced biotechnological strategy to enhance secondary metabolite production by optimizing hairy root formation. This method exploits Agrobacterium rhizogenes' natural genetic transformation capabilities to generate fast-growing, hormone-independent root cultures with high biosynthetic potential.

Materials and Methods

Catharanthus roseus seeds were immersed in 70% ethanol for 3 minutes, then surface-disinfected in 1.5% sodium hypochlorite for 15 minutes, and after washing with sterile distilled water for 5 minutes three times, they were cultured on MS medium. After 3 to 8 weeks, the seedlings were used to prepare explants and induce hairy roots. To determine the best bacterial strain for hairy root induction, *Agrobacterium rhizogenes* strains A4, A7, A13, 11325, 15834, and K599 were used. Leaf, stem, cotyledon, and node explants were isolated and inoculated with bacterial strains. To remove excess bacteria, the explants were transferred to B5, 1/2B5, 1/4B5, MS, 1/2MS, and 1/4MS media. After hairy root growth, MS, 1/2MS, 1/4MS, 1/8MS, B5, 1/2B5, 1/4B5, and 1/8B5 media were used to determine the optimal liquid medium. After hairy root growth, methyl jasmonate (0, 100, and 200 µM) was applied. Seventy-two hours after treatment, sampling was performed, and the amount of protein, electrical conductivity, malondialdehyde, and catharanthine was measured. Statistical calculations and data analysis were performed with SPSS 16, and comparisons of means were performed using Duncan's test at a 5% significance level.

Results and Discussion

Leaf explants, stems, cotyledons, and nodes were inoculated with *A. rhizogenus*. Leaves were selected as suitable explants and used for co-cultivation. In leaf explants inoculated with *A. rhizogenus* strains, hairy roots appeared on average after 13 days. According to the analysis of variance, the effects of the bacterial strain and root medium were significant at the 1% level for the production of hairy roots in *C. roseus*. In addition, the interaction between the bacterial strain and the rooting medium was significant at the 5% level. In general, the highest rooting percentage was observed with strain A4 in 1/4B5 medium (60.67%), strain A4 in 1/2B5 medium (54%), and strain 15834 in 1/4B5 medium (52%). Hairy roots from strain A4 in 1/4B5 medium appeared with more branches and faster growth, and the percentage of hairy roots in this treatment was higher than in other strains and media. In all strains, as medium concentration decreased, the rate of hairy roots increased, and this increase was greater in B5 medium than in MS medium. In other words, when B5 medium was used at lower concentrations (1/2 or 1/4), it had a much better effect on hairy root growth. These observations indicate that hairy roots exhibit a significant response to the medium and its components, as reflected in growth rate and root morphology. It can be assumed that hairy roots require a diluted medium for establishment, proper growth, and maintenance of structure. It seems that at least part of this effect is due to the response of hairy roots to the isotonic pressure of the medium. Analysis of variance revealed significant differences among treatments for total protein, electrical conductivity, malondialdehyde, and catharanthine. The highest amount of protein, electrical conductivity, malondialdehyde, and catharanthine was observed in the 200 µM methyl jasmonate treatment. These results indicate the induction of a controlled stress response and the activation of metabolic pathways involved in protein synthesis and the production of secondary metabolites. Increased electrical conductivity indicates regulated ion leakage from root hair cells, thereby enhancing ion exchange and access to essential precursors for catharanthine synthesis.

Conclusion

The results of this study indicated that the use of strain A4 along with 1/4B5 medium provides the best conditions for the induction and growth of hairy roots of *C. roseus*, and the use of methyl jasmonate significantly increases the production of proteins and valuable secondary metabolites in hairy roots. These methods can be used as effective and sustainable strategies to increase the yield of medicinal metabolites from C. *roseus*.

علوم زیستی گیاهی، سال هفدهم، شمارهٔ پیاپی شصت و سوم، ۱۴۰۴، صفحهٔ ۷۷- ۹۴
تاریخ دریافت مقاله: ۱۴۰۴/۰۵/۲۷
تاریخ بررسی مجدد: ۱۴۰۴/۰۷/۱۲
تاریخ پذیرش نهایی: ۱۴۰۴/۰۷/۱۶
مقاله پژوهشی

بهینه‌سازی استقرار ریشه موئین و افزایش تولید کاتارانتین توسط محرک متیل جاسمونات در *Catharanthus roseus*

رقیه حضرتی[۱]، ناصر زارع[۱]*، مهسا صمدی[۱]، رسول اصغری زکریا[۱]، منصور میران[۲]
[۱]گروه مهندسی تولید و ژنتیک گیاهی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه محقق اردبیلی
[۲]گروه شیمی دارویی و فارماکوگنوزی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی اردبیل

چکیده

گیاه پروانش از مهم‌ترین گیاهان دارویی است که آلکالوئیدهایی با اثرات دارویی بسیار مهم برای درمان انواع بیماری‌های قلبی عروقی و سرطان را تولید می‌کند و همواره مورد توجه و استفاده انسان بوده است. به علت تولید متابولیت‌های ثانویه در مقادیر بسیار کم، استفاده از راهکارهایی از جمله کشت ریشه موئین به علت پایداری بالا برای افزایش بازده این متابولیت‌ها روش مناسبی است. در این آزمایش تأثیر سویه‌های A4، A7، A13، ۱۱۳۲۵، ۱۵۸۳۴ و K599 و محیط کشت‌های B5، ۱/۲B5، ۱/۴B5، MS، ۱/۲MS و ۱/۴MS بر القاء ریشه‌های موئین در ریز نمونه‌های برگ پروانش بررسی شد. سپس بهترین محیط برای گسترس ریشه موئین در محیط‌های کشت مایع (B5، ۱/۲B5، ۱/۴B5، ۱/۸B5، MS، ۱/۲MS، ۱/۴MS و ۱/۸MS) مورد ارزیابی قرار گرفت. سپس اثر محرک متیل جاسمونات (۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میکرومولار)بر مقدار پروتئین، هدایت الکتریکی، مالون دی‌آلدئید و کاتارانتین در ریشه‌های موئین بررسی شد. نتایج نشان دادند همه سویه‌ها موفق به القاء ریشه موئین شدند، ولی از نظر درصد ریشه‌زایی بین سویه‌های مختلف اختلاف معنی‌داری وجود داشت. بیشترین درصد ریشه‌زایی (۶۰/۶۷ درصد) در سویه‌ی A4 و محیط کشت ۱/۴B5 جامد به‌دست آمد. رشد ریشه‌های موئین در محیط‌های مایع مختلف نیز اختلاف معنی‌داری داشت که بهترین محیط مایع ۱/۴B5 به‌دست آمد (۴/۱۴۶ گرم). ریشه‌های موئین تیمار شده با متیل جاسمونات از نظر صفات مورد بررسی افزایش معنی‌داری را نسبت به شاهد نشان دادند، به‌طوری که بیشترین مقدار پروتئین (۱۸/۱۴۲ میلی‌گرم در گرم)، هدایت الکتریکی (۷۵۷/۶۷ میلی زیمنس بر میلی متر) و مالون دی‌آلدئید (۰/۱۱۸ نانومول در گرم) در تیمار ۲۰۰ میکرمولار متیل جاسمونات مشاهده شد. مقدار کاتارانتین هم در ریشه‌های تیمار شده با ۱۰۰ و ۲۰۰ میکرومولار متیل جاسمونات افزایش معنی‌داری نسبت به شاهد داشت. نتایج این پژوهش نشان دادند استفاده از سویه A4 همراه با محیط کشت ۱/۴B5 بهترین شرایط را برای القاء و رشد ریشه‌های موئین گیاه پروانش فراهم می‌کند و به‌کارگیری محرک متیل جاسمونات موجب افزایش قابل توجهی در تولید پروتئین‌ها و متابولیت‌های ثانویه مفید در ریشه‌های موئین می‌شود. این روش‌ها می‌توانند به‌عنوان راهکارهای مؤثر و پایدار برای افزایش بازدهی متابولیت‌های دارویی گیاه پروانش به‌کار گرفته شوند.

واژه‌های کلیدی: آگروباکتریوم رایزوژنز، الیسیتور، پروانش، غلظت محیط کشت، متابولیت ثانویه

*Corresponding Author: zarenasser@gmail.com

3041-9603 © University of Isfahan
This is an open access article under the CC BY-NC-ND/4.0/ License (https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/).
doi: 10.22108/IJPB.2025.146378.1419

مقدمه

Catharanthus roseus که معمولاً به عنوان گل پروانش شناخته می‌شود، یک گیاه چند ساله همیشه سبز از خانواده *Apocynaceae* بومی ماداگاسکار است و در سراسر جهان در مناطق گرمسیری و نیمه گرمسیری کشت می‌شود. این گیاه دارای برگ‌های براق، بیضوی و خوشه‌های گل‌های جذاب و نامتقارن است که به‌طور معمول صورتی یا سفید با رگه‌های قرمز هستند. میوه‌های باریک و شبیه کپسول آن برای پراکندگی بذر باز می‌شوند و از تکثیر طبیعی مؤثر اطمینان می‌دهند. فراتر از جذابیت زینتی خود، *C. Roseus* به‌علّت آلکالوئیدهای ایندول بیواکتیو خود مانند وین-کریستین، وین‌بلاستین و کاتارانتین که آن را به یک سنگ بنای پژوهش‌های دارویی و درمان سرطان تبدیل کرده است، مشهور هستند (Oakeley, 2023). کاتارانتین یک آلکالوئید ایندول مونو ترپنوئید پیچیده است که نقش مهمی در بیوسنتز عوامل ضد سرطان مانند وین بلاستین و وین‌کریستین ایفا می‌کند. اگر چه مسیر کامل آنزیمی که مسئول سنتز آن از پیش سازها مانند استریسوسیدین است، همچنان یک منطقه فعال از پژوهش‌ها است، اما کاتارانتین همچنان به‌علّت کمک‌های خود در شیمی محصول طبیعی و کاربرد آن به-عنوان یک ساختمان برای توسعه داروهای درمانی، علاقه علمی را به خود جلب می‌کند. این ارتباط دارویی بر اهمیت پژوهش‌ها در حال انجام در مسیرهای متابولیک آن و کاربردهای احتمالی در درمان سرطان تأکید می‌کند (Pan et al., 2015). گیاهان متابولیت‌های ثانویه مانند آلکالوئیدها، فلاونوئیدها و ترپنوئیدها را توسط مسیرهای بیوسنتز پیچیده که نقش مهمی در دفاع، پاسخ استرس و تعامل اکولوژیکی دارند، سنتز می‌کنند (Pandey et al., 2023). تکنیک‌های کشت بافت آزمایشگاهی یک جایگزین قوی برای کشت گیاه برای تولید متابولیت‌های ثانویه ارائه می‌دهند. این روش‌ها سبب می‌شوند تا محیط‌های بسیار کنترل شده‌ای ایجاد شوند که در آن عواملی مانند ترکیب مواد مغذی، نور و کاربرد الیسیتور بتوانند ظرفیت بیوسنتز سلول‌های گیاهی را به حداکثر برسانند. با کاهش اثرات تغییر پذیری محیطی و دور زدن محدودیت‌های فصلی، روش‌های کشت بافت، تأمین مداوم، مقیاس پذیر و پایدار ترکیبات مانند آلکالوئیدها، فلاونوئیدها و ترپنوئیدها را تضمین می‌کنند. علاوه بر این، توانایی اجرای سریع استراتژی‌های بیوتکنولوژیکی مانند انتخاب و مهندسی متابولیک نه تنها سبب افزایش بازده متابولیت می‌شود، بلکه منجر به کاهش فشار زیست محیطی بر روی جمعیت گیاهان طبیعی می‌شود (Ozyigit et al., 2023). در مقایسه با سایر سیستم‌های کشت بافت مانند کشت کالوس یا سوسپانسیون، کشت ریشه‌های موئین مزایای متمایزی برای تولید متابولیت‌های ثانویه ارائه می‌دهد. ریشه‌های موئین ویژگی‌های متمایز و ظرفیت بیوسنتزی ریشه‌های گیاه را حفظ می‌کنند که منجر به پایداری ژنتیکی بالاتر و تولید پایدارتر ترکیباتی مانند آلکالوئیدها، فنول‌ها و ترپنوئیدها می‌شود. سرعت رشد سریع آن‌ها که اغلب در محیط‌های بدون هورمون حاصل می‌شود، تجمع زیست‌توده مقیاس پذیر و افزایش سنتز متابولیت را تسهیل می‌کند. این ویژگی‌ها کشت ریشه‌های موئین را به ابزاری ضروری در صنایع دارویی و غذایی تبدیل می‌کند، جایی که تولید متابولیت پایدار و قابل اعتماد از اهمیت بالایی برخوردار است (Faraz et al., 2020). کشت موفقیت‌آمیز ریشه‌های موئین به ترکیبی از عوامل بستگی دارد که در کنار هم، کارایی و پایداری سیستم‌های ریشه القایی را تعیین می‌کنند. انتخاب ریزنمونه‌هایی با پاسخگویی بالا ترجیحاً از بافت‌های گیاهی جوان و با رشد قوی برای تسهیل تراریختی مؤثر توسط آگروباکتریوم رایزوژنز ضروری است. بهینه‌سازی دقیق شرایط کشت، از جمله مدت زمان مناسب آلودگی، غلظت صحیح استوسیرینگون برای فعال کردن ژن‌های بیماری‌زایی باکتری و تنظیم دقیق pH محیط کشت، ترکیب مواد مغذی و منابع کربن نیز به همان اندازه مهم هستند. حفظ شرایط استریل و واکشت منظم، پایداری ژنتیکی و تجمع مداوم زیست‌توده را بیشتر تضمین می‌کند. این فاکتورهای کنترل‌شده دقیق، به‌طور قابل توجهی در به

حداکثر رساندن تولید متابولیت‌های ثانویه ارزشمند در سیستم‌های ریشه موئین برای کاربردهای دارویی و صنعتی نقش دارند (Gutierrez-Valdes et al., 2020). الیسیتورها در تحریک پاسخ‌های دفاعی گیاه که منجر به افزایش بیوسنتز متابولیت‌های ثانویه می‌شوند، نقش اساسی دارند. الیسیتورهایی مانند متیل جاسمونات و اسید سالیسیلیک با شبیه‌سازی شرایط تنش زیستی یا غیرزیستی، مسیرهای سیگنالینگ کلیدی را فعال می‌کنند و بیان ژن‌های دخیل در تولید ترکیبات ارزشمندی مانند آلکالوئیدها، فلاونوئیدها و ترپنوئیدها را افزایش می‌دهند. این تحریک هدفمند نه تنها بازده این مواد شیمیایی گیاهی با ارزش بالا را افزایش می‌دهد، بلکه در مقایسه با روش‌های سنتی استخراج کل گیاه، روشی قابل کنترل و پایدار برای تولید فراهم می‌کند. علاوه بر این، استفاده از الیسیتورها در سیستم‌های کشت درون شیشه‌ای تضمین می‌کند که تولید متابولیت ثانویه کمتر به تغییرات محیطی وابسته است و مزایای قابل توجهی را برای صنایع دارویی، غذایی و شیمیایی کشاورزی ارائه می‌دهد (Rajendran et al., 2023). متیل جاسمونات یک الیسیتور مهم در بیوتکنولوژی گیاهی است که به علّت توانایی‌اش در تحریک فعال‌سازی ژن‌های مرتبط با دفاع که بیوسنتز متابولیت‌های ثانویه را افزایش می‌دهند، به‌طور گسترده شناخته شده است. متیل جاسمونات با اتصال به گیرنده‌های خاص، آبشاری از رویدادهای انتقال سیگنال را آغاز می‌کند که منجر به افزایش بیان آنزیم‌های کلیدی و فاکتورهای رونویسی می‌شود که تولید این ترکیبات فعال زیستی ارزشمند را هدایت می‌کنند. این استراتژی استخراج نه تنها عملکرد متابولیت را در شرایط کنترل شده آزمایشگاهی افزایش می‌دهد، بلکه با کاهش تغییرات محیطی و برداشت بیش از حد گیاهان وحشی، رویکردی پایدارتر به سنتز محصولات طبیعی را تسهیل می‌کند.

در آزمایشی جهت القاء ریشه موئین در گیاه پروانش، توسط ریزنمونه‌های برگی و تلقیح با باکتری آگروباکتریوم تومفاسینس حامل وکتور CAMVS35 حاوی ژن *rolC* گزارش شد که می‌توان از ژن *rolC* برای بهبود ریشه‌دهی و القاء ریشه در گیاهان دارویی استفاده کرد، همچنین ژن *rolC* نسبت به ترکیب‌های مختلف هورمونی در القاء ریشه موئین موفق‌تر است (Sahandi et al., 2016). در آزمایش دیگری دو نوع ریز نمونه برگ و گیاهچه پروانش را با ۴ سویه A4، ۱۵۸۳۴، ۱۰۲۶۶ و ۲۶۵۹ آگروباکتریوم رایزوژنز تلقیح کردند. نتایج نشان داد که اثر نوع سویه باکتری بر درصد تولید ریشه موئین معنی‌دار است، به‌طوری‌که بیشترین تولید ریشه‌های موئین در سویه‌های ۱۰۲۶۶ حاصل شد. همچنین استفاده از ریز نمونه متفاوت نیز بر میزان تولید ریشه‌های موئین معنی‌دار بود و ریز نمونه برگ نسبت به گیاهچه برای تولید ریشه موئین پاسخ مناسب‌تری داد (Sathasivam et al., 2022). در پژوهش دیگری دریافتند در ریزنمونه گلخانه‌ای پروانش بیشترین میزان تولید ریشه موئین با ۵۶/۴۳ درصد مربوط به سویه A4 و میزان استوسیرینگون ۱۰۰ میکرومولار و کمترین مقدار مربوط به سویه A13 و در ۵۰ میکرومولار استوسیرینگون بود و در اکثر سویه‌های باکتری با افزایش میزان استوسیرینگون، میزان تولید ریشه موئین نیز بیشتر شد (Hamidi, 2013). این پژوهش، به بررسی یک استراتژی بیوتکنولوژیکی پیشرفته جهت افزایش تولید متابولیت‌های ثانویه با بهینه‌سازی ایجاد ریشه‌های موئین می‌پردازد، روشی که از قابلیت‌های طبیعی تبدیل ژنتیکی آگروباکتریوم رایزوژنز برای تولید کشت‌های ریشه‌ای با رشد سریع و مستقل از هورمون با پتانسیل بیوسنتز بالا استفاده می‌کنند.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی

بذرهای سالم و یکنواخت بدون شکستگی و خراشیدگی به‌مدت ۳ دقیقه در الکل ۷۰ درصد غوطه‌ور شدند و سپس به‌مدت ۱۵ دقیقه در هیپوکلریت سدیم ۱/۵ درصد ضدعفونی سطحی شدند و پس از ۳ بار شستشو با آب مقطر استریل به‌مدت ۵ دقیقه، روی محیط کشت MS (Murashige &

Skoog, 1962) کشت داده شدند. کشت‌ها تا مرحله جوانه‌زنی در تاریکی نگهداری و پس از حدود ۷ روز به دوره نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی در اتاقک رشد با شرایط دمای ۲±۲۴ درجه سانتی‌گراد انتقال یافتند. بعد از گذشت ۳ تا ۸ هفته، از گیاهچه‌ها برای تهیه ریزنمونه و القاء ریشه موئین استفاده شد.

سویه‌های باکتری مورد استفاده

برای تعیین بهترین سویه‌ی باکتری برای القاء ریشه موئین، یک کلونی از هر یک از سویه‌های A4، A7، A13، ۱۱۳۲۵، ۱۵۸۳۴ و K599 آگروباکتریوم رایزوژنز به‌صورت جداگانه به ۱۰ میلی‌لیتر محیط کشت MYA (Morton & Fuqua, 2012)، مایع حاوی ۵۰ میلی‌گرم در لیتر آنتی‌بیوتیک ریفامپسین انتقال یافت و به‌صورت شبانه در ۲۸ درجه سانتی‌گراد و با ۱۱۰ دور در دقیقه در شیکر انکوباتور رشد داده شدند. سپس ۲ میلی‌لیتر از کشت شبانه باکتری‌ها به‌صورت جداگانه به ۲۵ میلی‌لیتر محیط کشت MYA حاوی استوسرینگون اضافه شده و تا رسیدن به OD_{600} در شیکر انکوباتور با شرایط مذکور رشد داده شد.

تلقیح با باکتری

ریزنمونه‌های برگی، ساقه، لپه و گره‌ها، جداسازی و به قطعات کوچک برش داده شدند، سپس تزریق باکتری به ریزنمونه‌ها انجام شد و به‌صورت جداگانه در سوسپانسیون باکتری‌های مورد نظر به مدت ۷ دقیقه غوطه‌ور شدند. پس از حذف باکتری اضافی، ریزنمونه‌ها به مدت ۷۲ ساعت در محیط هم‌کشتی MS در تاریکی و دمای ۲±۲۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

محیط کشت‌های مورد استفاده

جهت حذف باکتری‌های اضافی، ریزنمونه‌ها بعد از شستشو با آب مقطر اتوکلاو شده به مدت ۵ دقیقه، به محیط کشت‌های B5، 1/2B5، 1/4B5، MS، 1/2MS و 1/4MS حاوی ۴۰۰ mg/L آنتی‌بیوتیک سفوتاکسیم منتقل شدند. متناسب با شرایط و میزان مشاهده آلودگی باکتریایی ریزنمونه‌ها هر دو هفته، به محیط کشت جدید حاوی آنتی بیوتیک سفوتاکسیم واکشت شدند. بعد از گذشت حدود ۱۰ روز از زمان تلقیح، محل زخم‌های ایجاد شده بر روی برگ‌ها متورم شده و سپس ریشه‌های موئین ظاهرشدند.

انتقال ریشه موئین به محیط کشت مایع

بعد از رشد ۱۰ تا ۱۲ سانتی متری ریشه، برای اطمینان از یافتن بهترین نوع محیط کشت مایع برای رشد و گسترش ریشه‌های موئین از محیط کشت MS، 1/2MS، 1/4MS، 1/8MS، B5، 1/2B5، 1/4B5 و 1/8B5 حاوی ۳۰۰ میلی‌گرم در لیتر سفوتاکسیم استفاده شد. برای هوادهی و رشد بهتر ریشه‌های موئین، بر روی شیکر با دور ۱۱۰ دور در دقیقه و در تاریکی نگهداری شدند. هر دو هفته یکبار ریشه‌های موئین به محیط کشت جدید منتقل شدند.

اعمال تیمار محرک

پس از این که رشد ریشه‌های موئین به اندازه مورد نظر رسید، وزن مشخصی از ریشه‌ها به محیط 1/4B5 منتقل شد. یک هفته پس از واکشت ریشه‌ها، محرک متیل جاسمونات (۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میکرومولار) اعمال شد. به این صورت که متیل جاسمونات توسط فیلتر ۰/۲۲ میکرومتر فیلتر شد و پس از اتوکلاو محیط کشت و قبل از انتقال ریشه‌ها به آن اضافه شد. ۷۲ ساعت پس از اعمال تیمار، نمونه‌برداری انجام و بررسی‌های مربوطه انجام شد.

اندازه‌گیری پروتئین

برای استخراج عصاره پروتئینی از ریشه موئین پروانش از روش Hazrati et al. (2023) استفاده شد. ابتدا ریشه‌های موئین برداشت شده توسط ازت مایع پودر شدند و به ۰/۱ گرم از آن بافر فسفات ۰/۱ مولار با pH=۷/۸ اضافه شد و به‌مدت ۲۰ دقیقه با ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه در دمای ۴ درجه

سانتی‌گراد سانتریفیوژ شدند. فاز بالایی محلول برداشته و برای تعیین مقدار پروتئین به‌روش برادفورد مورد استفاده قرار گرفت (Bradford, 1976). در این روش برای اندازه‌گیری محتوی پروتئین از دستگاه اسپکتروفتومتر با طول موج ۵۹۵ نانومتر استفاده شد. سپس با استفاده از نمودار استاندارد آلبومین سرم گاوی (BSA)، غلظت نهایی پروتئین نمونه‌ها بر حسب میلی‌گرم در میلی‌لیتر عصاره محاسبه شد.

اندازه‌گیری هدایت الکتریکی

پس از جدا کردن ریشه‌های موئین، ۱۵ میلی‌لیتر از محیط کشت بدون ریشه برداشته شده و هدایت الکتریکی (EC) آن توسط دستگاه ECمتر اندازه‌گیری شد.

سنجش میزان مالون‌دی‌آلدئید

برای اندازه‌گیری میزان مالون دی‌آلدئید (MDA) از روش Zare & Hazrati (2025) استفاده شد. بدین ترتیب که به ۰/۱ گرم از نمونه پودر شده، ۱/۵ میلی‌لیتر محلول تری-کلرواستیک اسید یک درصد اضافه و با سرعت ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۵ دقیقه و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شد و محلول رویی برداشته شد. برای تهیه محلول واکنش، ابتدا محلول ۲۰٪ تری‌کلرواستیک‌اسید تهیه شد و سپس تیوباربیتوریک اسید ۰/۵٪ در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد به آن اضافه و حل شد. ۷۵۰ میلی‌لیتر از عصاره سلولی را به میکروتیوب‌های ۲ میلی‌لیتری منتقل کرده و ۱/۵ میلی‌لیتر از محلول واکنش به آن اضافه و به مدت ۳۰ دقیقه در بن ماری دمای ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. بلافاصله نمونه در یخ به‌مدت ۵ دقیقه قرار داده شد. سپس ۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد و با ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ و مایع رویی برداشت شد. میزان جذب مایع رویی در دو طول موج ۵۳۲ و ۶۰۰ نانومتر توسط اسپکتروفتومترخوانده شد.

اندازه‌گیری مقدار کاتارانتین

به ۳۰۰ میلی‌گرم نمونه پودر شده، ۵ میلی‌لیتر متانول اضافه شده و برای چند دقیقه ورتکس شد. به‌مدت ۲۰ دقیقه بر روی شیکر و سپس ۲۰ دقیقه در حمام اولتراسونیک قرار گرفت. این مراحل دو مرتبه دیگر نیز تکرار شد و در نهایت حدود ۴۰ دقیقه بر روی شیکر قرار گرفته و به مدت ۵ دقیقه با دور ۱۵۰۰۰ سانتریفیوژ شد. سپس مایع رویی برداشت شده و به مدت ۱۰ ساعت در آون قرار گرفته و عصاره متانولی تهیه شد (Tikhomiroff et al., 2002). برای تعیین مقدار کاتارانتین از دستگاه HPLC (YL9100 HPLC system) و ستون C18 استفاده شد. فاز متحرک شامل بافر فسفات ۵ میلی مولار (pH= ۶) و استونیتریل به نسبت ۲۰ به ۸۰ بود که با شدت جریان ۱ میلی‌لیتر در دقیقه از ستون عبور می‌کرد. همچنین حجم تزریق ۲۰ میکرولیتر بود. مقدار کاتارانتین هر نمونه با طول موج ۲۷۵ نانومتر و توسط استاندارد کاتارانتین (شرکت سیگما) اندازه‌گیری شد.

آنالیز آماری

آزمایش مربوط به تأثیر محیط کشت‌ها و سویه‌های مختلف در القاء ریشه موئین به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح کامل تصادفی در سه تکرار انجام شد. آزمایش‌های تأثیر محیط-های کشت مایع در رشد ریشه‌های موئین، میزان پروتئین، مالون دی‌آلدئید، هدایت الکتریکی و کاتارانتین به‌صورت طرح کامل تصادفی در سه تکرار انجام شد. محاسبات آماری و تجزیه و تحلیل داده‌ها با نرم افزار SPSS 16 و مقایسه میانگین داده‌ها توسط آزمون دانکن در سطح احتمال ۵ درصد انجام شد.

نتایج

تأثیر نوع ریزنمونه بر ریشه‌زایی موئین

ریزنمونه‌های برگی، ساقه، لپه و گره‌ها با آگروباکتریوم رایزوژنز تلقیح شدند. ریزنمونه‌های ساقه به‌علت آلودگی بالا، از بین رفتند و ریشه‌های موئین به‌ندرت قابل رشد بوده و اغلب قابلیت تشکیل انشعابات زیاد را دارا نبودند. ریزنمونه های لپه کاملا آلوده و نکروزه شدند و گره‌ها ساقه نابجا

ایجاد کردند. در نتیجه برگ به‌عنوان ریزنمونه مناسب انتخاب و جهت هم‌کشتی مورد استفاده قرار گرفت (شکل ۱). ریزنمونه‌ها طی زمان‌های متعدد برای تلقیح با باکتری مورد آزمایش قرار گرفتند. به‌علت کوچک و ظریف بودن گیاهچه‌های ۳ تا ۴ هفته، نمونه‌های برگی قادر به مقاومت در برابر باکتری و محیط جدید نبوده و نکروزه شدند و ریزنمونه‌های ۶ تا ۸ هفته، توانایی ریشه‌زایی نشان دادند. ظهور ریشه‌های موئین با محیط کشت و باکتری مناسب، از روز ۶ام آغاز شد و بقیه‌ی ریشه‌هایی که قابلیت رشد داشتند تا روز ۱۴ علایم رشدی را نشان دادند.

شکل ۱- ریزنمونه‌های مختلف تلقیح شده با آگروباکتریوم رایزوژنز؛ A) ساقه، B) کوتیلدون، C) گره، D) برگ

Figure 1- Different explants inoculated with *Agrobacterium rhizogenes*; A) stem, B) cotyledon, C) node, D) leaf

اثر محیط کشت‌ها و سویه‌های مختلف باکتری بر ظهور ریشه‌های موئین

در ریزنمونه‌های برگ تلقیح شده با سویه‌های آگروباکتریوم رایزوژنز، به‌طور میانگین بعد از ۱۳ روز ریشه‌های موئین ظاهر شدند. با توجه به نتایج تجزیه واریانس اثر سویه باکتری و محیط کشت ریشه‌زایی در سطح احتمال ۱ درصد بر تولید ریشه‌های موئین در گیاه پروانش معنی‌دار بود. علاوه بر این اثر متقابل سویه باکتری در محیط کشت ریشه‌زایی نیز در سطح احتمال ۵ درصد معنی‌دار بود (جدول ۱). به‌طور کلی بیشترین درصد ریشه‌زایی با سویه A4 در محیط‌کشت ۱/۴B5 (۶۰/۶۷٪) و سویه A4 در محیط کشت ۱/۲B5 (۵۴٪) و همچنین سویه ۱۵۸۳۴ در محیط کشت ۱/۴B5 (۵۲٪) مشاهده شد (جدول ۲). از بین سویه‌های باکتری به‌کار رفته، سویه A4 با میانگین ریشه‌زایی ۳۴/۷۲ درصد بیشترین درصد ریشه‌زایی را نشان داد، سویه ۱۵۸۳۴ با میانگین ریشه‌زایی ۲۱/۶۱ درصد در رتبه بعدی قرار داشت. کمترین درصد ریشه‌زایی هم با سویه A13 و K599 به‌ترتیب با میانگین ۶/۵ و ۷/۱۱ به‌دست آمد. در مورد محیط کشت‌های ریشه‌زایی، محیط‌کشت ۱/۴B5 و ۱/۲B5 با میانگین ریشه‌زایی ۳۴/۶۶ درصد و ۲۹/۱۱ درصد بیشترین تأثیر را در ایجاد ریشه داشتند. محیط کشت MS با میانگین ۱/۶۶ درصد کمترین میزان ریشه‌زایی را داشت. ریشه‌های موئین حاصل از سویه A4 در محیط کشت ۱/۴B5 با انشعابات بیشتر و رشد سریع تر ظاهر شدند و درصد ریشه‌زایی موئین در این تیمار بیشتر از بقیه سویه‌ها و محیط کشت‌ها بود (شکل ۲). در تمام سویه‌ها با کاهش غلظت محیط کشت، درصد ریشه‌زایی موئین افزایش نشان داد و این افزایش در محیط کشت B5 بیشتر از محیط کشت MS بود (جدول ۲).

جدول ۱- تجزیه واریانس درصد ریشه‌زایی موئین در محیط کشت‌ها و سویه‌های مختلف در گیاه پروانش

Table 1. Variance analysis of hairy root percentage in different media and strains in periwinkle

Mean squares	Degree of freedom	Sources of change
2118.543**	5	Bacterial strain
3242.92**	5	Rooting medium
165.494*	25	Bacterial strain × Rooting medium
98.398	72	Error
65		CV (%)

** و * به ترتیب معنی‌داری در سطح احتمال ۱ درصد و ۵ درصد

** and * Significant at the 1% and 5% probability level

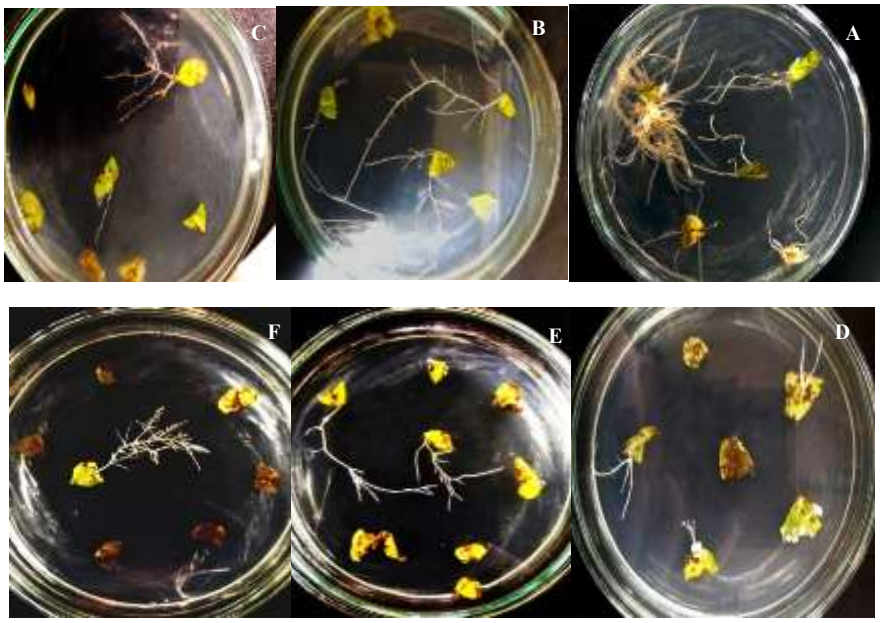
جدول ۲- تأثیر سویه آگروباکتریوم رایزوژنز و محیط کشت بر ریشه‌زایی موئین در ریزنمونه برگی گیاه پروانش.

Table 2- Effect of *Agrobacterium rhizogenes* strain and medium on hairy rooting in leaf explants of periwinkle.

hairy root percentage	Rooting medium	Bacterial strain	hairy root percentage	Rooting medium	Bacterial strain
6.67^{fgh}	B5	11325	36.67^{bcd}	B5	A4
20.33^{defg}	1/2B5		54^{ab}	1/2B5	
25.33^{def}	1/4B5		60.67^{a}	1/4B5	
0^{h}	MS		10^{fgh}	MS	
0^{h}	1/2MS		10.67^{efgh}	1/2MS	
7.33^{fgh}	1/4MS		36.33^{bcd}	1/4MS	
0^{h}	B5	A13	15.33^{efgh}	B5	15834
11.33^{efgh}	1/2B5		44^{abc}	1/2B5	
21^{defg}	1/4B5		52^{ab}	1/4B5	
0^{h}	MS		0^{h}	MS	
0^{h}	1/2MS		7^{fgh}	1/2MS	
6.67^{fgh}	1/4MS		11.33^{efgh}	1/4MS	
9.33^{fgh}	B5	K599	15.67^{efgh}	B5	A7
15.67^{efgh}	1/2B5		29.33^{cde}	1/2B5	
13^{efgh}	1/4B5		36^{bcd}	1/4B5	
0^{h}	MS		0^{h}	MS	
0^{h}	1/2MS		3.33^{gh}	1/2MS	
4.67^{gh}	1/4MS		6.67^{fgh}	1/4MS	

میانگین ۳ تکرار ± SE، طبق آزمون دانکن مقادیر با حروف متفاوت اختلاف معنی‌داری در سطح $P \leq 0.05$ دارند.

Average of 3 repetitions ± SE, according to Duncan test values with different letters have significant differences at $P \leq 0.05$



شکل ۲- ریشه‌های موئین ایجاد شده در محیط کشت ۱/۴B5 از ریزنمونه‌های تلقیح شده با سویه‌های A) A4، B) ۱۵۸۳۴، C) A7، D) ۱۱۳۲۵، E) A13، F) K599

Figure 2- Hairy roots formed in 1/4B5 medium from explants inoculated with strains A) A4, B) 15834, C) A7, D) 11325, E) A13, F) K599

تعیین محیط کشت مایع مناسب برای رشد ریشه موئین

پس از تعیین سویه A4 به‌عنوان بهترین سویه برای ریشه‌زایی، برای تعیین محیط کشت مایع مناسب برای رشد و گسترش سریع‌تر، ریشه‌های موئین از محیط کشت جامد وارد محیط کشت‌های مایع ۱/۸B5، ۱/۴B5، ۱/۲B5، B5، ۱/۸MS، ۱/۴MS، ۱/۲MS، MS شدند و پس از ۲۵ روز وزن تر آن‌ها اندازه‌گیری شد. با توجه به نتایج تجزیه واریانس (جدول ۳) محیط کشت‌های مختلف در سطح احتمال ۱ درصد بر رشد ریشه‌های موئین در گیاه پروانش تأثیر معنی‌داری داشتند.

محیط کشت مایع ۱/۴B5 بهترین محیط کشت برای رشد و گسترش بیشتر و سریع‌تر ریشه‌های موئین بود (شکل ۳). اگر چه در محیط کشت‌های جامد نیز اصل کاهش غلظت نمک‌های B5 با افزایش ریشه‌زایی و گسترش ریشه‌های موئین برقرار بود، امّا در محیط کشت با غلظت کمتر از ۱/۴B5 مانند ۱/۸B5 مواد مغذی ریشه‌ها کمتر شده و به مرور گسترش ریشه‌های موئین کاهش یافت و کمترین وزن تر ریشه‌های موئین نیز متعلق به محیط کشت مایع MS و B5 بود (شکل ۴).

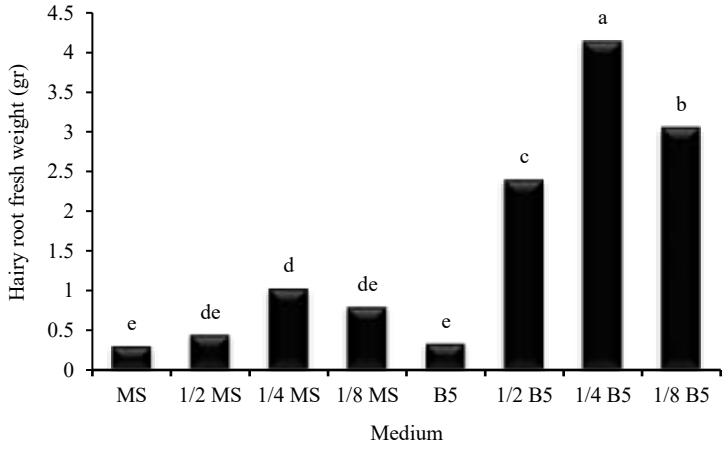
جدول ۳- تجزیه واریانس تأثیر محیط‌های کشت مایع مختلف بر وزن تر ریشه‌های موئین در گیاه پروانش

Table 3- Variance analysis of the effect of different liquid media on the fresh weight of hairy roots in periwinkle

Mean squares	Degree of freedom	Sources of change
6.4**	7	Medium
0.139	16	Error
26.19		CV(%)

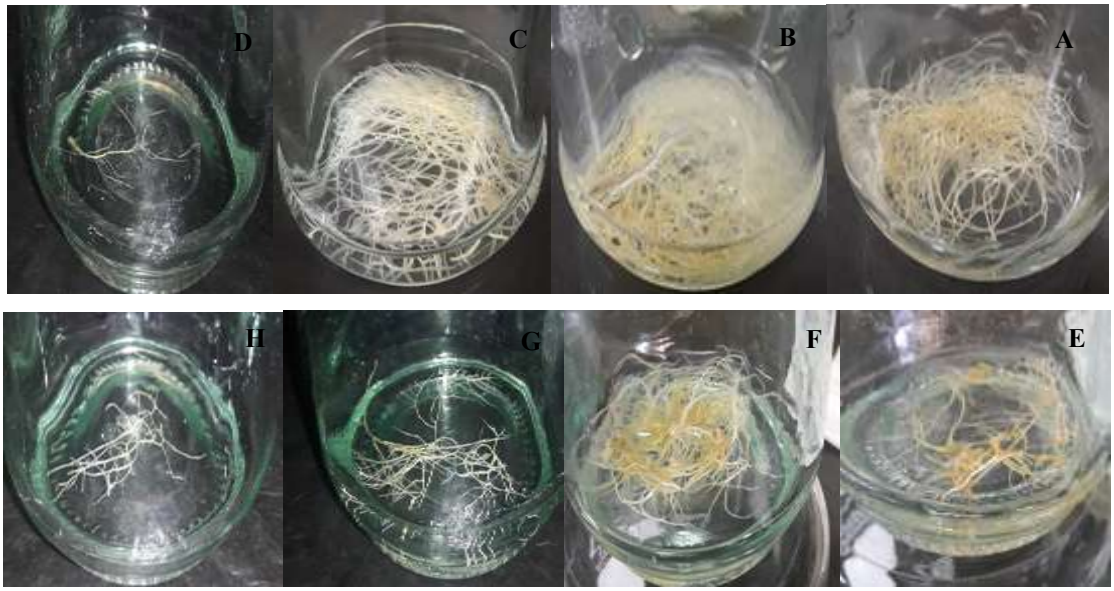
** معنی‌دار در سطح احتمال ۱٪

** Significant at the 1% probability level



شکل ۳- تأثیر محیط‌های کشت مایع مختلف بر وزن تر ریشه‌های موئین. میانگین ۳ تکرار ± SE، طبق آزمون دانکن مقادیر با حروف متفاوت اختلاف معنی‌داری در سطح $P \leq 0.05$ دارند.

Figure 3- Effect of different liquid media on the fresh weight of hairy roots. Average of 3 repetitions ± SE, according to Duncan test values with different letters have significant differences at $P \leq 0.05$



شکل ۴- مقایسه محیط کشت‌های مایع مختلف در رشد ریشه‌های موئین A) ۱/۸B5، B) ۱/۴B5، C) ۱/۲B5، D) B5، E) ۱/۸MS، F) ۱/۴MS، G) ۱/۲MS، H) MS

Figure 4- Comparison of different liquid media in hairy root growth A) 1/8B5, B) 1/4B5, C) 1/2B5, D) B5, E) 1/8MS, F) 1/4MS, G) 1/2MS, H) MS

پروتئین کل

بر اساس جدول تجزیه واریانس، بین تیمارها از نظر میزان پروتئین کل اختلاف معنی‌داری وجود دارد (جدول ۴). در تیمار ۲۰۰ میکرومولار متیل جاسمونات بیشترین مقدار پروتئین مشاهده شد. تیمار ۱۰۰ میکرومولار متیل جاسمونات هم به‌طور معنی‌داری پروتئین بیشتری نسبت به شاهد داشت (شکل ۵).

هدایت الکتریکی محیط کشت

اثر متیل جاسمونات بر روی میزان هدایت الکتریکی محیط کشت در سطح احتمال ۱٪ معنی‌دار بود (جدول ۴). بیشترین مقدار آن در تیمار ۲۰۰ میکرومولار متیل جاسمونات و کمترین مقدار آن در تیمار شاهد مشاهده شد (شکل ۵). اگر محرک‌ها را عامل آزاد شدن گونه‌های اکسیژن فعال در نظر داشته باشیم، در این صورت غشاء در حال تخریب شدن خواهد بود و در نتیجه میزان الکترولیت نیز افزایش خواهد یافت.

میزان مالون‌دی‌آلدئید

اثر متیل‌جاسمونات بر میزان مالون‌دی‌آلدئید در سطح احتمال ۱٪ معنی‌دار بود (جدول ۴). بیشترین مقدار مالون‌دی‌آلدئید در تیمار ۲۰۰ میکرومولار متیل جاسمونات مشاهده شد و کمترین مقدار آن در تیمار شاهد مشاهده شد (شکل ۵). سطح مالون‌دی‌آلدئید به عنوان نشانگر سطح رادیکال های آزاد سلولی که در شرایط استرس به غشای سلولی آسیب می رساند استفاده شده است (Jaleel et al., 2007).

میزان تولید کاتارانتین

تعیین مقدار کاتارانتین تولید شده در ریشه موئین پروانش بر اساس محلول استاندارد و تعیین زمان نگهداری مربوط به آن انجام گرفت. به مقدار ۲۰ میکرولیتر استاندارد کاتارانتین به دستگاه HPLC تزریق شد و زمان نگهداری، ۱۷/۹۶ دقیقه مشخص شد (شکل ۶). سطح زیر منحنی در دقیقه اعلام شده نشان دهنده‌ی مقدار کاتارانتین است (جدول ۴)، و با در دست داشتن غلظت اولیه‌ی استاندارد تزریق شده به دستگاه HPLC و مشخص بودن سطح زیر منحنی استاندارد، غلظت کاتارانتین هر نمونه توسط اندازه سطح زیر منحنی نمونه

تعیین شد. با توجه به نتایج تجزیه واریانس (جدول ۴) میزان کاتارانتین در ریشه‌های موئین گیاه پروانش به‌طور معنی‌داری در سطح احتمال ۵ درصد تحت تأثیر متیل جاسمونات قرار گرفت. نمونه‌های تیمار شده با متیل جاسمونات ۱۰۰ میکرومولار و متیل جاسمونات ۲۰۰ میکرومولار به ترتیب ۰/۱۵۰۵ و ۰/۱۴۳۱ میلی‌گرم کاتارانتین در گرم وزن تر داشتند که نسبت به نمونه‌های شاهد افزایش نشان دادند (شکل ۵).

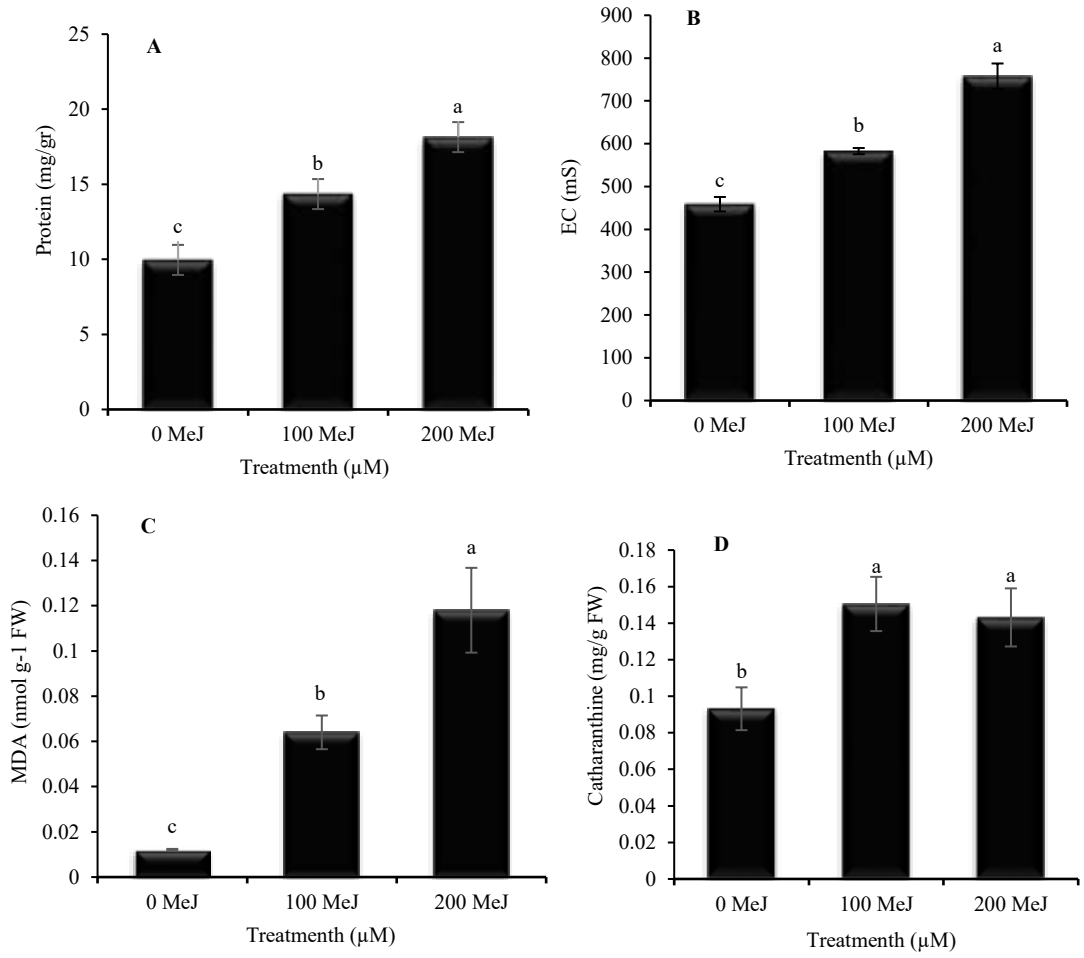
جدول ۴- تجزیه واریانس تأثیر متیل جاسمونات بر ویژگی‌های بیوشیمیایی ریشه‌های موئین پروانش

Table 4- Variance analysis of the effect of methyl Jasmonate on the biochemical properties of hairy roots of periwinkle

Mean squares				Degree of freedom	Sources of change
Catharanthine	MDA	EC	Protein		
0.003*	0.008**	67701**	50.265**	2	Treatment
0.001	0.0005	1224	3.198	6	Error
24.52	34.35	5.83	12.63		CV (٪)

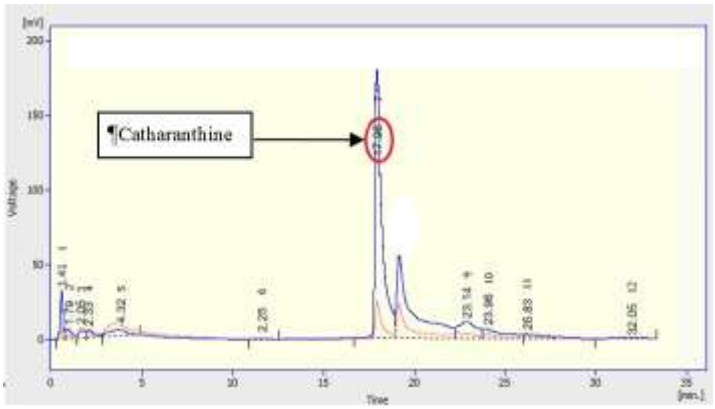
** و * به ترتیب معنی‌داری در سطح احتمال ۱ درصد و ۵ درصد

** and * Significant at the 1% and 5% probability level



شکل ۵- تأثیر متیل جاسمونات (MeJ) بر میزان پروتئین کل (A)، هدایت الکتریکی محیط کشت (B)، مالون‌دی‌آلدئید (C) و کاتارانتین (D) در ریشه‌های موئین پروانش. میانگین ۳ تکرار ± SE، طبق آزمون دانکن مقادیر با حروف متفاوت اختلاف معنی‌داری در سطح $P \leq 0.05$ دارند.

Figure 5- Effect of methyl jasmonate on total protein content (A), EC (B), MDA (C), and catharanthine (D) in hairy roots of Perennial. Average of 3 repetitions ± SE, according to Duncan test values with different letters have significant differences at $P \leq 0.05$



شکل ۶- زمان نگهداری استاندارد کاتارانتین در HPLC

Figure 6- Retention time of catharanthine standard in HPLC

بحث

در این پژوهش از بین ریزنمونه‌های ساقه، لپه، برگ و گره از ریزنمونه برگ ۶ تا ۸ هفته‌ای به‌عنوان ریزنمونه مناسب برای هم‌کشتی استفاده شد. تمام ریزنمونه‌های گیاهان پاسخ مشابهی را برای تولید ریشه موئین نمی‌دهند. در گیاه *Eurycoma longifolia* برای تولید ریشه موئین از بین ریزنمونه‌های برگ، دمبرگ، جنین، رویان بدنی و محور زیر لپه، فقط ریزنمونه هیپوکوتیل قادر به تولید ریشه موئین بود (Sajap et al., 2014).

نتایج این پژوهش نشان داد سویه A4 از آگروباکتریوم رایزوژنز در القاء ریشه‌های موئین گیاه پروانش عملکرد به مراتب بهتری دارد و در ترکیب با محیط کشت B5 ۱/۴ جامد، بالاترین درصد ریشه‌زایی را فراهم می‌کند. این یافته با گزارش‌های پیشین مبنی بر تأثیر سویه و ترکیب محیط کشت بر راندمان ریشه‌زایی در گونه‌های دیگر مانند *Solanum lycopersicum* مطابقت دارد و نشان می‌دهند تفاوت‌های ژنتیکی سویه‌ها نقش کلیدی در فعال‌سازی ژن‌های *rol* دارند. Kardoost Parizi & Mahmoudnia (2016) در آزمایشی تأثیر سه سویه باکتری A4، 11325 و 2656 را بر ریشه‌زایی موئین گیاه پروانش مورد ارزیابی قرار داده و گزارش کردند که اثر متقابل معنی‌داری بین سویه آگروباکتریوم و ریزنمونه گیاه وجود دارد. بر اساس یافته‌های موجود سویه A4 و ریزنمونه برگ بیشترین میزان تولید ریشه موئین را با ۵۳/۷۶ درصد نشان دند. همچنین همین سویه در ریزنمونه ساقه ۳/۰۸ درصد تولید ریشه موئین داشته است. بر اساس نتایج Sohrabi-Nejad et al. (2018) دو محیط کشت B5/۲ و MS/۲ از نظر درصد تولید ریشه موئین اختلاف معنی‌داری نشان داده‌اند. محیط کشت B5/۲ با ۳۵/۸۴ درصد، نسبت به محیط کشت MS/۲ با ۲۵/۶۷ درصد، برای بالا بردن میزان تولید ریشه موئین در *Calendula officinalis*، محیط مناسب‌تری بوده است. رشد ریشه‌های موئین در محیط‌های مایع نیز توسط B5 ۱/۴ بهترین عملکرد را نشان داد که احتمالاً ناشی از تعادل مطلوب یون‌ها و مواد مغذی در این محیط است. تفاوت قابل توجه رشد میان محیط‌های مایع مختلف حاکی از آن است که نسبت مبتنی بر غلظت B5 و MS با تغییرات جزئی در غلظت و ترکیب ویتامین‌ها می‌تواند به بهینه‌سازی بیشتر بیان ژن‌های مرتبط با رشد ریشه موئین کمک کند. محیط کشت‌های مختلف از نظر غلظت یا ترکیب برخی از نمک‌ها با هم متفاوت هستند. غلظت یا ترکیب بالای نمک‌ها در محیط کشت می‌تواند جذب مواد غذایی توسط گیاه را تحت تأثیر قرار دهد. محیط کشت MS بیشترین غلظت یا ترکیب نمک‌ها را به‌همراه دارد. علاوه بر وجود تفاوت در عناصر پرمصرف، محیط کشت B5 برخلاف محیط کشت MS فاقد گلایسین است، امّا تیامین بیشتری دارد. گونه‌ها و حتی ارقام مختلف یک گونه ممکن است به عناصر غذایی

متفاوتی نیاز داشته باشند و همین موضوع ممکن است بر ریشه‌زایی آن‌ها تأثیر داشته باشد (Hazrati et al., 2022). به‌عبارت دیگر، زمانی که از محیط کشت B5 با غلظت‌های کمتر (۱/۲B5 و یا ۱/۴B5) استفاده شد، تأثیر بسیار بهتری در رشد ریشه‌های موئین داشت. این نتایج بیانگر این است که ریشه‌های موئین به محیط کشت و ترکیبات آن از نظر میزان رشد و ریخت شناسی ریشه عکس‌العمل بارزی نشان می‌دهند. می‌توان چنین تصور کرد که ریشه‌های موئین برای استقرار، رشد مناسب و حفظ ساختار به محیط کشت رقیق شده‌ای نیاز دارند. به نظر می‌رسد حداقل بخشی از این تأثیر ناشی از عکس‌العمل ریشه‌های موئین به فشار ایزوتونیک محیط هستند.

تیمار با متیل‌جاسمونات با دو غلظت ۱۰۰ و ۲۰۰ میکرومولار، موجب افزایش معنی‌دار محتوای پروتئین کل، هدایت الکتریکی، میزان مالون دی‌آلدئید و کاتارانتین شد. این نتایج حاکی از القاء پاسخ استرسی کنترل شده و فعال شدن مسیرهای متابولیکی مرتبط با سنتز پروتئین و متابولیت‌های ثانویه است. افزایش هدایت الکتریکی نشان‌دهنده نشت یونی تنظیم شده از سلول‌های ریشه موئین است که به تقویت تبادل یونی و دسترسی به پیش‌سازهای ضروری برای سنتز کاتارانتین کمک می‌کند. پژوهش‌های اخیر نشان داده‌اند تیمار کشت ریشه‌های موئین با متیل جاسمونات می‌تواند علاوه بر القاء مسیرهای زیستی متابولیت‌های ثانویه، سبب افزایش قابل توجه پروتئین کل در این سیستم‌های کشت شود؛ به‌طور مثال، در کشت‌های ریشه موئین *Solanum lycopersicum* پس از افزودن ۱۰۰ میکرومولار متیل جاسمونات به محیط کشت به‌مدت ۷۲ ساعت، میزان پروتئین کل به‌طور معنی‌داری تا ۳۵ درصد افزایش یافت که ناشی از القاء بیان ژن‌های مرتبط با سنتز پروتئین و بهبود جذب نیتروژن بود. بنابراین متیل جاسمونات می‌تواند به‌عنوان یک محرک برای ارتقاء کیفیت بیوماسی در ریشه‌های موئین گیاهان مورد بهره‌برداری قرار گیرد (Amani et al., 2024). پژوهش‌ها نشان داده‌اند اعمال متیل جاسمونات به کشت‌های ریشه موئین موجب افزایش معنی‌دار هدایت الکتریکی محیط کشت می‌شود؛ به‌عنوان مثال، در کشت ریشه موئین *Datura stramonium*، افزودن ۱۰۰ میکرومولار متیل جاسمونات به محیط کشت به مدت ۴۸ ساعت، هدایت الکتریکی را از ۱/۲ به ۱/۸ میلی‌زیمنس بر سانتی‌متر افزایش داد که این تغییر بازتاب دهنده نشت بیشتر یون‌ها از غشاهای سلولی و تقویت تبادل یونی بین ساختار ریشه و محیط کشت است (Amani et al., 2024). Hamidi (2013) در پژوهشی گزارش کرد با افزودن ۱۵۰ میکرومولار متیل جاسمونات به‌عنوان محرک، افزایش تولید وین بلاستین نسبت به ریشه موئین شاهد مشاهده شد، امّا استفاده بیشتر از متیل‌جاسمونات (۳۰۰ میکرومولار) سبب کاهش تولید آلکالوئید شد.

نتیجه‌گیری

در پژوهش حاضر، روش بهینه شده برای ایجاد ریشه موئین در *Catharanthus roseus* و انتخاب هدفمند متیل جاسمونات به‌عنوان محرک، یک روش قوی برای تقویت تولید کاتارانتین ارائه داد. مشخص شد که بیشترین درصد ریشه‌زایی موئین در ترکیب سویه‌ی A4 و محیط کشت ۱/۴B5 جامد به‌دست آمد. بهترین محیط مایع برای رشد ریشه موئین نیز محیط کشت ۱/۴B5 بود. بررسی اثر محرک متیل جاسمونات بر میزان پروتئین، مالون‌دی‌آلدئید، هدایت الکتریکی و مقدار کاتارانتین در ریشه‌های موئین پروانش انجام شد. تجمع و تولید کاتارانتین در کروماتوگرام HPLC در ریشه موئین این گیاه تأیید شد و محرک متیل جاسمونات در هر دو غلظت ۱۰۰ و ۲۰۰ میکرومولار افزایش مقدار تولید کاتارانتین را به همراه داشت. علاوه بر افزایش سریع شاخص‌های رشد، استفاده متیل جاسمونات به‌عنوان محرکی زیستی می‌تواند به‌عنوان یک استراتژی مؤثر برای افزایش تولید ترکیبات دارویی در مقیاس بیوراکتوری مطرح شود. این رویکرد هم از نظر اقتصادی مقرون به‌صرفه است و هم

امکان تولید پایدار آلکالوئیدهای کمیاب با کیفیت بالا را فراهم می‌آورد. ترکیب بهینه سویه‌های باکتری، محیط کشت و محرک زیستی، بستری مناسب برای مقیاس‌گذاری این سیستم در شرایط صنعتی ایجاد می‌کند. با این وجود، پیشنهاد می‌شود با شناسایی ژن‌های مسیر کاتارانتین در پروانش، تأثیر محرک‌های دیگر بر بیان این ژن‌ها نیز مورد بررسی قرار گیرد. این رویکرد نه تنها درک ما از متابولیسم ثانویه گیاه را بیشتر می‌کند، بلکه یک راه حل مقیاس پذیر برای تولید صنعتی ترکیبات دارویی با ارزش نیز فراهم می‌کند.

References

Amani, S., Mohebodini, M., Khademvatan, S., Jafari, M., & Kumar, V. (2024). Modifications in gene expression and phenolic compounds content by methyl jasmonate and fungal elicitors in *Ficus carica*. Cv. Siah hairy root cultures. *BMC Plant Biology*, *24*(1), 520. https://doi.org/10.1186/s12870-024-05178-2

Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*. *Elsevier*, *72*(1–2), 248–254. https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3

Faraz, R., Gokhale, M., & Gothalwa, R. (2020). Hairy root culture through agrobacterium rhizogenes for enhancement of secondary metabolites production in medicinal plants: a review. *Journal of Advanced Microbiology*, *4*(1), 45-58. https://doi.org/10.5530/jam.4.1.4

Gutierrez Valdes, N., Häkkinen, S. T., Lemasson, C., Guillet, M., Oksman-Caldentey, K. M., Ritala, A., & Cardon, F. (2020). Hairy root cultures a versatile tool with multiple applications. *Frontiers in Plant Science, 11*, 33. https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00033

Hamidi, E. (2013). *Optimization of root production conditions in the periwinkle plant (Catharanthus roseus) and the effect of using the methyl jasmonate on the production of its important medicinal alkaloids* [Master's thesis, Ferdowsi University of Mashhad]. Elmnet. https://elmnet.ir/doc/10693900-65281 [In Persian]

Hazrati, R., Zare, N., Asghari-Zakaria, R., Sheikhzadeh, P., & Johari-Ahar, M. (2022). Factors affecting the growth, antioxidant potential, and secondary metabolites production in hazel callus cultures. *AMB Express*, *12*(1), 109. https://doi.org/10.1186/s13568-022-01449-z

Hazrati, R., Zare, N., Asghari-Zakaria, R., Sheikhzadeh, P., & Jouhari, M. (2023). Green synthesized Ag nanoparticles stimulate gene expression and paclitaxel production in *Corylus avellana* cells. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *107*, 5963–5974. https://doi.org/10.1007/s00253-023-12683-1

Jaleel, C. A., Gopi, B., Sankar, P., Manivannan, A., Kishorekumar, R. S., & Panneers, L. (2007). Studies on germination, seedling vigour, lipid peroxidation and proline metabolism in *Catharanthus roseus* seedling under salt stress. *South African Journal of Botany*, *73*(2), 190–195. https://doi.org/10.1016/j.sajb.2006.11.001

Kardoost Parizi, V., & Mahmoudnia Meymand, M. (2016). *Investigation of factors affecting the induction and production of hairy roots in the catharanthus roseus plant.* The Fourth International Conference on Applied Research in Agricultural Sciences, Tehran, Nikan Institute of Higher Education. https://civilica.com/doc/615958/ [In Persian]

Morton, E. R., & Fuqua, C. (2012). Laboratory maintenance of Agrobacterium. *Current Protocols in Microbiology*, *25*(1), Chapter 1, Unit 3D. https://doi.org/10.1002/9780471729259.mc03d01s24

Murashige, T., & Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, *15*(3). https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x

Oakeley, H. (2023). Modern medicines from plants: Botanical histories of some of modern medicine's most important drugs (1st ed.). CRC Press.

Ozyigit, I. I., Dogan, I., Hocaoglu-Ozyigit, A., Yalcin, B., Erdogan, A., Yalcin I. E., Cabi, E., & Kaya, Y. (2023). Production of secondary metabolites using tissue culture-based biotechnological applications. *Frontiers in Plant Science, 14*, 1132555. https://doi.org/10.3389/fpls.2023.1132555

Pan, Q., Mustafa, N. R., Tang, K., Choi, Y. H., & Verpoorte, R. (2015). Monoterpenoid indole alkaloids biosynthesis and its regulation in *Catharanthus roseus*: A literature review from genes to metabolites. *Phytochemistry Reviews, 15*(2), 221–250. https://doi.org/10.1007/s11101-015-9406-4

Pandey, A., Jaiswal, D., Agrawal, M., & Agrawal, S. B. (2023). Secondary metabolites biosynthesis and related gene expression under Ultraviolet-B radiation. *In Stress-responsive Factors and Molecular Farming in Medicinal Plants*, 155–168. https://doi.org/10.1007/978-981-99-4480-4_10

Rajendran, J., Pandiyan, M., Karthick, S., Shin, H. W., Choi, S. H., & Ramesh, M. (2023). Methyl jasmonate and salicylic acid as powerful elicitors for enhancing the production of secondary metabolites in medicinal plants: an updated review. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 153*, 447–458. https://doi.org/10.1007/s11240-023-02485-8

Sahandi, A., Pazhouhandeh, M., & Mohajjel Shoja, H. (2016). The effect of rolC gene on the medicinal plant Catharanthus roseus. *Genetic Engineering and Biosafety Journal*, *5*(1), 41-50. http://gebsj.ir/article-1-126-fa.html [In Persian]

Sajap, A. S., Rozihawati, Z., Omar, D., & Lau, W. H. (2014). *Isaria fumosorosea* and *metarhizium anisopliae* for controlling *Atteva sciodoxa* (Lepidoptera: yponomeutidae), a pest of *Eurycoma longifolia*. *Journal of Tropical Forest Science*, 84-91. https://www.jstor.org/stable/23617017

Sathasivam, R., Choi, M., Radhakrishnan, R., Kwon, H., Yoon, J., Yang, S. H., & Park, S. U. (2022). Effects of various *Agrobacterium rhizogenes* strains on hairy root induction and analyses of primary and secondary metabolites in *Ocimum basilicum*. *Frontiers in Plant Science*, *13*, 983776. https://doi.org/10.3389/fpls.2022.983776

Sohrabi-Nejad, Z., Marashi, H., & Moshtaghi, N. (2018). Optimization of hairy root cultivation of the medicinal plant *Officinalis Calendula* for the production of the medicinal compound oleanolic acid. *Journal of Plant Research (Journal of Iranian Biology*), *3*(31). https://plant.ijbio.ir/article_1161.html [In Persian]

Tikhomiroff, C., Allais, S., Klvana, M., Hisiger, S., & Jolicoeur, M. (2002). Continuous selective extraction of secondary metabolites from *Catharanthus roseus* hairy roots with silicon oil in a two-liquid-phase bioreactor. *Biotechnology Progress*, *18*(5), 1003-1009. https://doi.org/10.1021/bp0255558

Zare, N., & Hazrati, R. (2025). Seasonal changes in secondary metabolites and antioxidant activity of *Corylus avellana*. *International Journal of Horticultural Science and Technology*, *12*(4), 435-444. https://doi.org/10.22059/IJHST.2024.370283.752