

بررسی اثرات تنظیم‌کننده‌های رشد بر فرایند ریزازدیادی گیاه دارویی کارلا (*Momordica charantia*) و شناسایی ترکیبات ثانویه اندام‌های مختلف با استفاده از دستگاه طیف‌سنج جرمی (GC-MS)

محمد مبصری مقدم^۱، براتعلی فاخری^{۲*}، حسین کمال الدینی^۳، محمود سلوکی^۲، فاطمه حدادی^۲

۱- دانشجوی دکتری بیوتکنولوژی، گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی، دانشگاه زابل، زابل، ایران

۲- گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی، دانشگاه زابل، زابل، ایران

۳- گروه زیست‌شناسی، دانشگاه زابل، زابل، ایران

* مسئول مکاتبه: ba_fakheri@yahoo.com

DOI: 10.22034/CSRAR.2021.291381.1097

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۶/۲۷

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۳/۳۰

چکیده

امروزه گیاهان دارویی با توجه به عوارض جانبی کمتر بر روی سلامتی، مورد توجه قرار گرفته‌اند. بهینه‌سازی فرآیند کشت بافت برخی از این گیاهان از ریزنمونه‌های حاصل از بذر، امکان شناسایی، تولید تجاری متابولیت‌های ثانویه و دست‌ورزی ژنتیکی این گیاهان ارزشمند را فراهم می‌نماید. کارلا با نام علمی *Momordica charantia* از خانواده کدوئیان به‌دلیل متابولیت‌های ثانویه ارزشمند و خواص دارویی شناخته‌شده می‌تواند جایگاه مهمی را در بخش کشاورزی از آن خود سازد. در این مطالعه کالوس‌زایی و باززایی ریزنمونه‌های بذر گیاه کارلا در محیط کشت MS حاوی غلظت‌های مختلف هورمون‌های 2,4 D و BAP مورد مطالعه قرار گرفت. متابولیت‌های ثانویه با استفاده از گاز کروماتوگرافی - طیف‌سنج جرمی در عصاره‌های سوسپانسیون سلولی، ریشه، برگ و میوه گیاهان حاصل از فرایند کشت بافت شناسایی گردید که بیشترین تعداد مواد مؤثره به ترتیب ۴۹ ترکیب در ریشه، ۴۶ ترکیب در میوه، ۴۰ ترکیب در سوسپانسیون سلولی کالوس و ۳۷ ترکیب در برگ بود. نتایج کشت بافت نشان داد که بیشترین میزان کالوس‌زایی در غلظت ۳ میلی‌گرم در لیتر حاوی 2,4-D و بیشترین تولید شاخه در غلظت ۲ میلی‌گرم در لیتر BAP به‌دست آمد. همچنین بیشترین مقدار ریشه‌زایی در غلظت ۱ میلی‌گرم در لیتر حاوی هورمون IBA حاصل گردید.

واژه‌های کلیدی: القای کالوس، باززایی، بهینه‌سازی کشت بافت، متابولیت‌های ثانویه

مقدمه

هورمون‌های داخلی، خصوصاً هورمون‌های اکسین، اتیلن و ژبرلیک اسید را در این گیاه تحت تأثیر قرار می‌دهد (Jia et al., 2017). ارزش دارویی این گیاه به‌دلیل خواص آنتی‌اکسیدانی بالا، وجود فنل‌ها، فلاونوئیدها (Shan et al., 2012)، ایزوفلاون‌ها، ترپن‌ها، آنتروکوئینون‌ها و گلوکوزینولات‌های موجود در اندام‌های عمدتاً هوایی می‌باشد. این گیاه دارای مجموعه‌ای از ترکیبات مفید مثل ویتامین‌ها، مواد معدنی و آنتی‌اکسیدان‌ها (Kubola and Siriamornpun, 2008) می‌باشد که می‌تواند برای درمان طیف گسترده‌ای از بیماری‌ها استفاده شود و میوه آن غنی از ویتامین‌های B3, B9, B2, B1, C, E, A و همچنین، دارای پتاسیم، کلسیم، روی، فسفر و آهن می‌باشد (Daniel et al., 2014). این گیاه به علت داشتن خواص دارویی و متابولیت‌های ثانویه جزو گیاهان دارای ارزش مصرفی بالا دسته‌بندی گردیده

کارلا یا خربزه تلخ، گیاه یکساله، بومی مناطق گرمسیر با نام علمی *Momordica charantia* از خانواده کدوئیان (*Cucurbitacea*) است. ارقام وحشی و اهلی شده آن در مناطق گرمسیری حاره هم‌چون جنوب و شرق آسیا از قبیل سریلانکا، ویتنام، تایلند، مالزی، فیلیپین، پاکستان و جنوب چین کشت می‌شود (Sultana and Bari Miah, 2003). در جنوب شرق ایران در مناطق جنوب سیستان و بلوچستان و هرمزگان به صورت کاملاً پراکنده کشت می‌شود (Sarani et al., 2010). در طب سنتی و گیاهی، ریشه، ساقه، برگ، میوه و بذر این گیاه مصارف دارویی دارند (Grover and Yadav, 2004). طول روز کوتاه، درجه حرارت پایین و رطوبت بالا تشکیل‌دهنده ماده را تسریع می‌کند و طول روز بلند با درجه حرارت بالا تشکیل‌دهنده گل‌های نر را افزایش می‌دهد. در حقیقت شرایط محیطی سطح

چنین به توانایی بافت‌ها برای پاسخ به تغییرات هورمونی در طول کشت وابسته است (Gaspar *et al.*, 1996). اگرچه میزان تنظیم‌کننده‌های خارجی (هورمونی) به شدت به ژنوتیپ و مقدار هورمون داخلی گیاه بستگی دارد (Guo-li, 2008)، اما به‌طور کلی کنترل فرآیندهای تمایزیابی بستگی به حضور اکسین و سیتوکینین داشته و توازن بین آن‌ها تولید اندام هوایی و ریشه‌ها را سبب می‌شود (Kaikavoosi *et al.*, 2015). انتخاب یک ریزنمونه در مرحله رشد مطلوب نقش اساسی در موفقیت‌آمیز بودن کشت بافت در شرایط درون شیشه بازی می‌کند. پیچیدگی مورفولوژیکی یک ریزنمونه به همراه انتخاب تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی مناسب، تأثیر چشم‌گیری بر باززایی و القای کالوس دارد (Mikulík, 1999) کنترل و بهینه‌سازی کشت بافت گیاهان یکی از عوامل مهم موفقیت کشت و اصلاح آن‌ها است (Yen, 2019). تکثیر مؤثر گیاهان با کشت بافت می‌تواند به کلون‌سازی ژنوتیپ‌های مرغوب کمک کند و در کوتاه‌مدت برای تکثیر تجاری ژنوتیپ‌ها و خالص‌سازی متابولیت‌های ثانویه در مقیاس صنعتی استفاده شود (Barz *et al.*, 2012) و همچنین امکان تولید و دستیابی به متابولیت‌های باارزش مورد نظر را در تمام فصول سال و با مقدار و کیفیت دلخواه فراهم آورد (Malik *et al.*, 2007). کارلا دارای ترکیبات ثانویه زیادی است که این گیاه را به یک گیاه متمایز و ارزشمند در طب سنتی تبدیل نموده است (Bernhard *et al.*, 2019) ریزازدیادی کارلا آن از جمله موارد امیدبخش در جهت حفاظت ژنتیکی از این گونه و نگهداری گیاه مادری و علاوه بر آن گامی مؤثر در جهت انجام تحقیقات اصلاحی در آینده است که در پژوهش حاضر با هدف تعیین بهترین شرایط بهینه‌سازی کشت بافت بذر کارلا در شرایط آزمایشگاهی انجام شد.

مواد و روش‌ها

کالوس‌زایی، باززایی و ریشه‌زایی

به منظور مطالعه ریزازدیادی گیاه کارلا، بذره‌های تأیید شده از کمپانی DURGA در شهر Chandigarh هند تهیه و به آزمایشگاه کشت بافت دانشگاه زابل منتقل شد. سپس مراحل ضدعفونی سطحی بذرها انجام گرفت. بذرها ابتدا به مدت ۱۵ دقیقه با آب جاری و چند قطره مایع ظرف‌شویی شسته و سپس ۳ بار با آب مقطر غیراستریل آبکشی شدند. ضدعفونی نهایی قبل

است (Malekshahi *et al.*, 2019) و همچنین تحقیقات انجام شده نشان داده است که این گیاه دارای خواص ضد دیابتی است (Leung *et al.*, 2009). تحقیقات انجام شده بیانگر نقش مهم میوه‌ی این گیاه در کنترل و مهار سرطان (Jilka *et al.*, 1983)، دیابت، باکتری‌های بیماری‌زا (Saravani *et al.*, 2019) و ایدز می‌باشد (Singh *et al.*, 1998). تولید صنعتی این ترکیب به دلیل ساختار شیمیایی پیچیده، از لحاظ اقتصادی امکان‌پذیر نیست. بنابراین، فناوری کشت بافت به دلیل امکان استفاده از عوامل مختلف در محیط کشت روشی مؤثر در افزایش این ترکیبات باارزش می‌باشند (Agarwal, 2015).

کشت بافت ایزاری را برای تکثیر سریع تعداد زیادی از گیاهان و ایجاد پایه‌های سالم و حفظ ذخیره ژنتیکی آن‌ها فراهم نموده است (Sugandh Suman, 2017) کشت بافت روشی کاربردی در جهت تولید انبوه گیاهان در یک دوره زمانی کوتاه-مدت و بدون وابستگی به شرایط آب و هوایی منطقه و فصل کاشت می‌باشد (Agarwal, 2015). کشت بافت می‌تواند به‌عنوان یک راه‌کار مهم در تأمین بازار رو به گسترش جهانی گیاهان دارویی و متابولیت‌های ثانویه آن‌ها باشد. تاکنون در مورد اصلاح گیاهان دارویی پیشرفت چندانی انجام نشده است. برداشت گیاهان دارویی از عرصه‌ها و مراتع طبیعی تابع مسائل مختلفی است که می‌تواند تأثیرات متفاوتی بر اقلیم، پوشش گیاهی، تنوع جانوری و حتی فرهنگ منطقه مورد استفاده بگذارد (Renata Sõukand and Raivo Kalle, 2010).

از آنجاکه استفاده از گیاهان دارویی در ایران تاریخچه غنی و پرافتخاری دارد، این دانش سنتی را باید مطابق استانداردهای روز دنیا به دانشی کاربردی تبدیل کرد که جواب‌گوی نیازمندی‌های روز دنیا با زبان علمی و قابل قبول برای مراجع پزشکی و صنعت باشد. در این راستا، کشت و اهلی کردن گیاه دارویی کارلا به‌منظور ارتقای صفات کمی و کیفی فرآورده‌های گیاهی و ایجاد ژنوتیپ‌هایی با صفات مطلوب اهمیت خاصی دارد (Dodds and Roberts, 1985). برخی از این ترکیبات از طریق روش‌های مختلف همچون گاز کروماتوگرافی-طیف‌سنج جرمی و HPLC در عصاره‌های سوسپانسیون سلولی، ریشه، برگ و میوه اندازه‌گیری، شناسایی و معرفی شده‌اند (Park *et al.*, 2017).

اندام‌زایی در شرایط درون شیشه‌ای به عوامل مختلفی از جمله استفاده از هورمون‌های گیاهی، ژنوتیپ، دما، رطوبت و هم-

شد. آزمایش با سه تکرار در قالب طرح کاملاً تصادفی انجام و داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS 22 تجزیه گردیدند. تجزیه واریانس با استفاده از آزمون F و مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ۵ درصد صورت گرفت. در پایان نمودارها در محیط Excel رسم شدند.

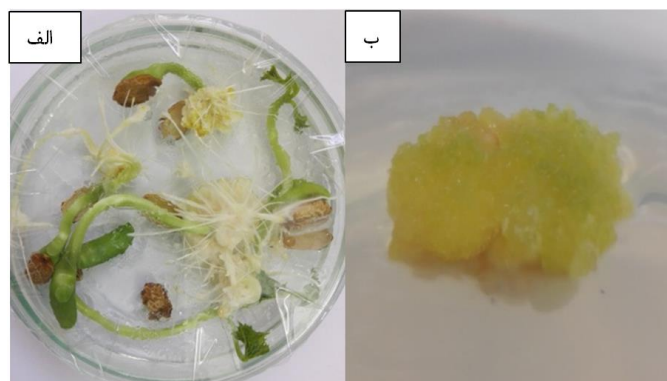
نتایج و بحث کالوس‌زایی

شروع فرایند کالوس‌زایی از بذره‌های جوانه‌زده در محیط کشت بعد از ۱۰ روز در نمونه‌های مورد مطالعه در محیط کشت MS واجد مقادیر متفاوت 2,4-D (۰، ۱، ۲، ۳، ۴، ۵، ۶ میلی‌گرم در لیتر) مشاهده شدند (شکل ۱). کالوس‌زایی در تمام محیط‌های کشت MS با غلظت‌های مختلف بجز محیط کشت فاقد 2,4-D مشاهده شد اما بین این تیمارها از نظر مقدار تولید کالوس تفاوت معنی‌داری مشاهده گردید و بیشترین مقدار کالوس‌زایی مربوط به تیمار تنظیم‌کننده رشد 2,4-D با غلظت ۳ میلی‌گرم در لیتر ثبت گردید (شکل ۲). مطالعات نشان داد (Sammaiah *et al.*, 2014) کالوس‌زایی با استفاده از برگ در محیط MS غنی‌شده با غلظت‌های مختلف و ترکیب 2,4-D با BAP و 2,4-D با TDZ می‌تواند همراه با حداکثر میزان القاء کالوس (۶۵٪) باشد. همچنین نتایج مشابهی در مطالعه بهینه‌سازی تولید کالوس در کارلا به‌دست آمد، هر چند برخی از محققین نتایج کشت بافت این گیاه را با استفاده از ترکیب سایر تنظیم‌کننده‌های رشد همچون BAP در محیط کشت نشان دادند (Sonali *et al.*, 2013).

از کشت در زیر هود لامینار ایرفلوی انجام گرفت. در ادامه‌ی این فرایند نمونه‌ها ابتدا با اتانول ۷۰ درصد به مدت ۶۰ ثانیه ضدعفونی شدند. بار دیگر نمونه‌ها با ۰/۱ درصد کلرید جیوه و هر بار به مدت ۲۴۰ ثانیه ضدعفونی شدند. در مرحله بعدی آن‌ها با آب مقطر استریل شستشو شدند. سپس این بذرها به صورت کاملاً تصادفی در محیط کشت موراشیگ و اسکوگ (MS) واجد مقادیر مختلف تنظیم‌کننده 2,4-D (۱، ۲، ۳، ۴، ۵ و ۶ میلی‌گرم در لیتر) جهت حصول کالوس کشت گردیدند. کالوس‌های به‌دست آمده از بهترین ترکیب جهت باززایی و تولید ساقه به محیط کشت واجد مقادیر مختلف BAP (۱، ۲، ۳ و ۴ میلی‌گرم در لیتر) منتقل شدند. در طول آزمایش نمونه‌ها در نور ۲۰۰۰ تا ۲۵۰۰ لوکس با دور ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی و در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد کشت شدند.

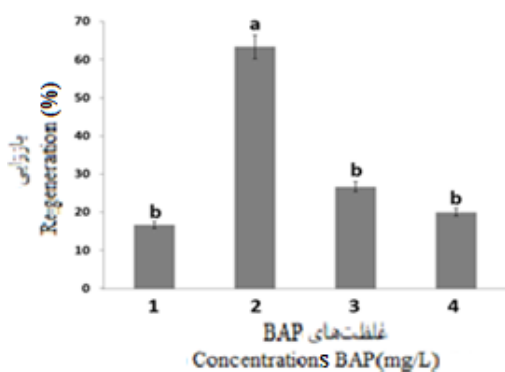
شناسایی متابولیت‌های ثانویه گیاه کارلا

جهت آماده‌سازی عصاره گیاهی سوسپانسیون سلولی، ریشه‌ها، برگ‌ها و میوه‌ها، اندام‌های مذکور با استفاده از نیتروژن مایع پودر شد و اندام‌های خردشده بطور مجزا در اتانول (۹۶ درصد) و آب مقطر برای ۷۲ ساعت قبل از عصاره‌گیری خیس و سپس توسط کاغذ صافی واتمن صاف شد و پس از تغلیظ عصاره اتانولی بوسیله دستگاه (Heidolph Instruments) Rotary evaporator تا زمان استفاده در ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری گردید. در نهایت پس از عصاره‌گیری از نمونه‌های شاهد و تیمارهای کشت بافت، با استفاده از GC-MS (Agilent, USA) متابولیت‌های ثانویه گیاه شناسایی و میزان حضور آن‌ها در اندام‌های مختلف بر اساس منحنی حاصل شده از نتایج مشخص



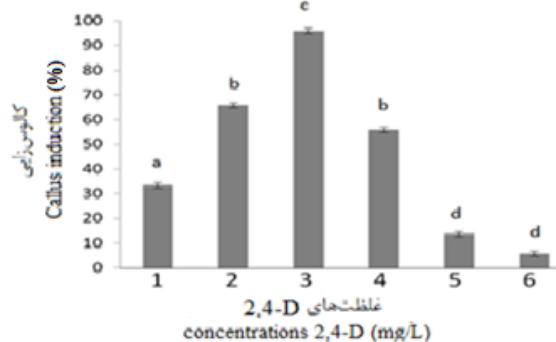
شکل ۱- القای کالوس در ریزنمونه‌های گیاه کارلا

Figure 1- Callus induction from explants



شکل ۳- تأثیر غلظت‌های مختلف BAP بر باززایی

Figure 3- Using different concentrations of IBA on Plantlets regeneration



شکل ۲- تأثیر غلظت 2,4-D بر کالوس‌زایی

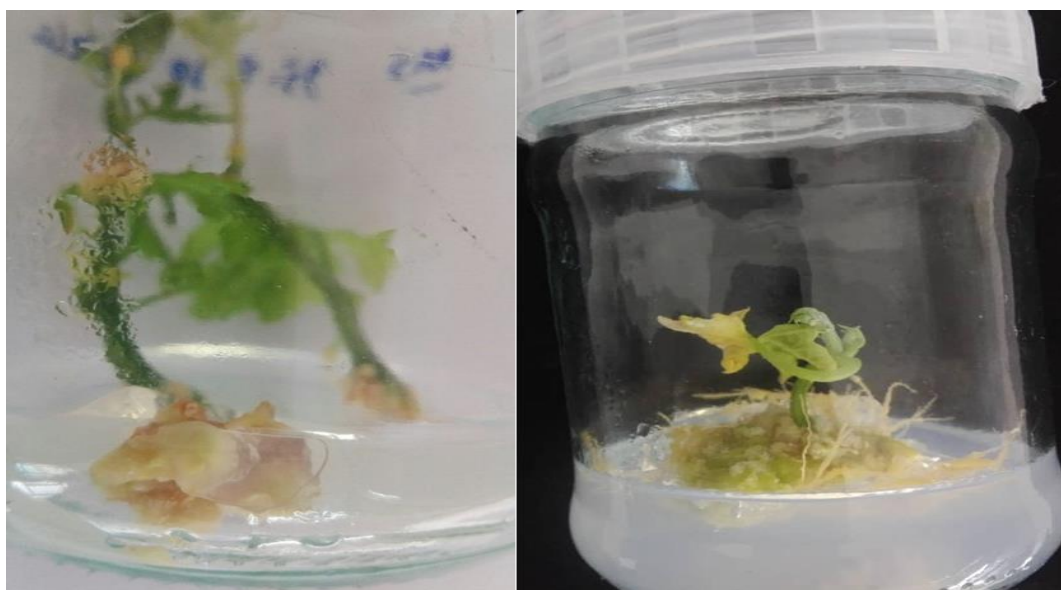
Figure 2- Different 2, 4- D concentrations effect on callus induction

مقدار این هورمون بالاتر از ۲ میلی‌گرم در لیتر، منجر به کاهش نرخ باززایی شاخساره‌ها شد که می‌تواند ناشی از اثر بازدارندگی این هورمون بر باززایی باشد.

فرایند باززایی برخلاف کالوس‌زایی فرآیندی زمان‌بر را نشان داد به طوری که اولین شاخساره‌های باززایی شده پس از گذشت ۲۸ روز و به صورت حداکثر سه جوانه شروع به ظاهر شدن نمودند که می‌توانست ناشی از برهم‌خوردن تعادل هورمونی در توده‌ی کالوس و یا فشار فرایند کشت بافت بر سلول‌های گیاهی باشد و در بسیاری از ارقام و گونه‌های گیاهی، پیش از این گزارش شده است (Bednarek *et al.*, 2007).

باززایی شاخساره

جهت باززایی شاخساره‌ها، کالوس‌های حاصل از بهترین ترکیب 2,4-D به محیط کشت MS حاوی غلظت‌های مختلف ترکیب هورمونی BAP و NAA (۰/۱ میلی‌گرم در لیتر) منتقل گردیدند. نتایج مقایسه میانگین‌ها برای غلظت‌های مختلف BAP نشان داد که با افزایش مقدار هورمون تا مقدار ۲ میلی‌گرم در لیتر تعداد ساقه‌های حاصل از باززایی افزایش می‌یابد و بیشترین تعداد ساقه از کالوس در محیط کشت حاوی ۲ میلی‌گرم در لیتر BAP به دست آمد (اشکال ۳ و ۴) که با مطالعات پیش از این نیز مطابقت داشت (Dorica and Alina, 2014) با افزایش



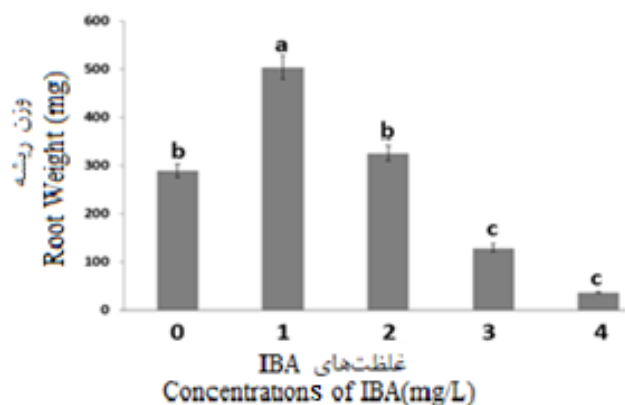
شکل ۴- باززایی شاخساره از کالوس حاصل از بذر گیاه کارلا

Figure 4- Plantlets Regeneration from Callus obtained from karela seeds

ریشه‌زائی

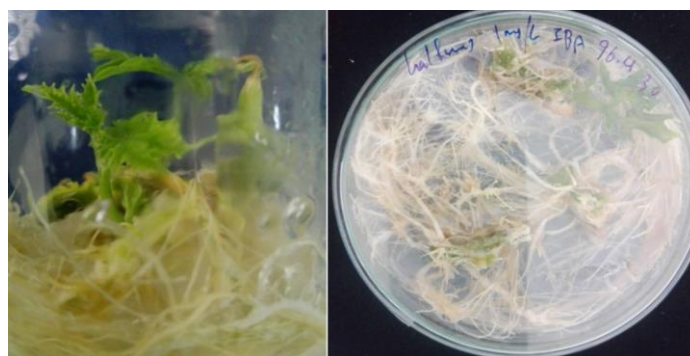
در ساقه‌های حاصل از فرایند کشت بافت، ریشه‌ها در روز ۳۰ پس از انتقال به محیط کشت واجد IBA از محل اتصال به ساقه جدا شده و وزن‌تر آن‌ها توزین شد. بر اساس نتایج ثبت شده، تیمارهای کشت شده در محیط کشت واجد IBA با غلظت ۱ میلی‌گرم بر لیتر، بیشترین وزن ریشه‌زائی را نشان دادند (شکل ۵ و ۶).

هدف از القای ریشه، تولید گیاهی دارای ساقه و ریشه (باززائی) و همچنین شناسایی متابولیت‌های ثانویه موجود در ساقه، برگ و ریشه بود. ساقه‌های باززائی شده جهت ریشه‌زائی به محیط کشت $MS_{1/2}$ حاوی غلظت‌های مختلف IBA (۰، ۱، ۲، ۳، ۴ میلی‌گرم در لیتر) منتقل شدند. جهت بررسی میزان ریشه‌زائی



شکل ۵- ریشه‌زائی در حضور مقادیر مختلف IBA

Figure 5- Root induction using defferent concentrations of IBA



شکل ۶- ریشه‌زائی در حضور IBA

Figure 6- Root induction using defferent concentration of IBA

بررسی ترکیبات ثانویه

نتایج نشان داد بیشترین میزان مواد مؤثره شناسایی شده مربوط به تعداد ۴۶ ترکیب در میوه گیاهان حاصل از کشت بافت بود (جدول ۱) که می‌تواند ناشی از فرایند فیزیولوژیک گیاه در کنار وجود پیش‌ماده‌های مختلف در محیط‌های کشت طی فرایند کشت بافت بوده باشد. این مسئله می‌تواند ناشی از رسیدگی گیاه و همچنین فرایند ذاتی انتقال مواد مؤثره در مرحله پرشدن میوه از سایر اندام‌ها به میوه باشد (جدول ۲).

تاکنون مطالعه‌ای برای ریزازدیادی گیاه دارویی کارلا از طریق بذر در شرایط اینویترو با هدف حصول حداکثر میزان متابولیت‌های ثانویه انجام نشده است هرچند باززائی از برگ، ساقه (Malik *et al.*, 2007) و کوتیلدون (Thiruvengadam *et al.*, 2010) آن بررسی شده است. در مطالعه‌ی گزارش شده با استفاده از برگ در محیط MS غنی شده با غلظت‌های مختلف و ترکیب 2,4-D با BAP و 2,4-D با TDZ می‌تواند همراه با حداکثر میزان القاء کالوس (۶۵٪) باشد (Sammaiah *et al.*, 2014).

جدول ۱- ترکیبات شناسایی شده در میوه گیاهان حاصل از فرایند کشت بافت

Table 1- Compounds identified from Fruits obtained from the tissue culture process

ردیف Row	ترکیب Component	زمان احتباس Retetion Time (min)	فضای منحنی ترکیب Component Pick Area
1	Butane, 1,2:3,4- diepoxy-, (±)-	2.69	0.205
2	1,2- Cyclopentanedione	3.68	0.306
3	Furfural	3.78	0.613
4	2-Furanmethanol	4.14	0.944
5	2(3H)-Furanone, 5- methyl-	4.39	0.484
6	2-Methyl-3-(methylthio)-1-propene	4.57	0.320
7	2(5H)- Furanone	5.20	0.283
8	1,2-Cyclopentanedione	5.52	14.946
9	2(5H)- Furanone, 5-methyl-	5.57	0.178
10	2-Furancarboxaldehyde, 5-methyl-	6.17	0.348
11	2H- Pyran-2,6(3H)- dione	6.81	3.147
12	1,2,3,4-Cyclopentanetetrol, (1α,2β,3β,4α)-	7.22	0.406
13	Benzeneacetaldehyde	7.83	0.197
14	2,3-Dimethylfumaric acid	9.03	0.764
15	Maltol	9.29	0.212
16	4H- Pyran- 4-one, 2,3- dihydro-3,5-dihydroxy-6-methyl-	9.95	1.044
17	Cyclohexanecarboxylic acid, 2-hydroxy-, ethyl ester	10.43	0.555
18	4H-Pyran-4-one, 3,5-dihydroxy-2-methyl-	10.85	1.732
19	5-Hydroxymethylfurfural	11.72	8.066
20	α-D-Glucopyranoside, O-α-D-glucopyranosyl-(1.fwdarw.3)-β-D-fructofuranosyl	12.07	0.222
21	Phenol, 2-methyl-5-(1-methylethyl)-	13.11	0.214
22	2-Amino-2-cyano-4-methylpentanethioamide	13.42	0.953
23	2,4-Hexadienedioic acid	14.89	1.028
24	Tetradecanoic acid	21	0.753
25	2,6,8-Trimethylbicyclo[4.2.0]oct-2-ene-1,8-diol	21.55	0.212
26	Phytol, acetate	22.16	2.990
27	3,7,11,15-Tetramethyl-2-hexadecen-1-ol	22.52	0.881
28	3,7,11,15-Tetramethyl-2-hexadecen-1-ol	22.78	1.604
29	17-Octadecynoic acid	23.15	0.216
30	n-Hexadecanoic acid	24.03	17.61
31	Phytol	25.95	1.636
32	9,12,15-Octadecatrienoic acid, (Z,Z,Z)-	26.39	12.334
33	Octadecanoic acid	26.65	2.881
34	7-Methyl-Z-tetradecen-1-ol acetate	28.26	0.180
35	Eicosanoic acid	29.05	0.286
36	Hexadecanoic acid, 2-hydroxy-1-(hydroxymethyl)ethyl ester	30.22	0.201
37	Stigmasterol	30.74	5.651
38	Diisooctyl phthalate	30.87	0.220
39	β-Amyrin	31.17	2.004
40	Linolenic acid, 2-hydroxy-1-(hydroxymethyl)ethyl ester (Z,Z,Z)-	32.57	1.224
41	1-Heptatriacotanol	32.76	2.497
42	: α-Amyrin	32.95	0.633
43	9,19-Cyclocholestene-3,7-diol, 4,14-dimethyl-, 3-acetate	33.97	5.465
44	Vitamin E	35.08	0.247
45	9,10-Secocholesta-5,7,10(19)-triene-3,24,25-triol, (3β,5Z,7E)-	35.95	1.039
46	Stigmasta-5,22-dien-3-ol, acetate, (3β)-	36.80	0.417

جدول ۲- ترکیبات مؤثره موجود در برگ گیاهان حاصل از کشت بافت

Table 2- Compounds identified from Plants Leaf, obtained from the tissue culture process

ردیف Row	ترکیب Component	زمان احتیاس Retention Time (min)	فضای منحنی ترکیب Component Pick Area
1	Methyl laurate	16.778	1.31
2	Lauric acid	17.697	4.49
3	(3-Ethynyl-3-methyloxiran-2-yl)methanol	20.784	0.85
4	NEOPHYTADIENE	21.796	2.06
5	2-Hexadecene, 3,7,11,15-tetramethyl-, [R-[R@,R@-(E)]]-	21.889	0.70
6	Methyl palmitate	23.046	1.96
7	Oleyl amide	23.772	1.12
8	12-STEAROLACTONE	24.93	22.31
9	12-STEAROLACTONE	25.438	0.61
10	Phytol	25.625	15.63
11	Methyl stearate	25.765	2.76
12	2,3,7-TRIMETHYLOCTANAL	27.083	1.38
13	13-Hexyloxacyclotridecan-2-one	27.493	1.29
14	1,5-Dicyclopentyl-3-(2-cyclopentylethyl)pentane	27.705	0.68
15	Methyl 2-cyano-3,4-Dimethyl-4-phenylcrotonate	28.235	4.78
16	9-Octadecenoic acid (Z)-, 2-hydroxy-1,3-propanediyl ester	28.629	0.84
17	18,18'-Bi-1,4,7,10,13,16-hexaoxacyclononadecane	29.096	1.43
18	Naphthalene, 1,2,3,4-tetrahydro-1-methoxy-	30.004	1.11
19	HEPTADECENE-(8)-CARBONIC ACID-(1)	31.488	0.80
20	3-(1,3-Dihydroxyisopropyl)-1,5,8,11,14,17-hexaoxacyclononadecane	31.789	0.96
21	18,19-Dihydroxy-1,4,7,10,13,16-hexaoxacycloicosane, (18S,19S)-	32.137	1.11
22	1-Butanesulfinyl isocyanate, 1,1,2,2,3,3,4,4,4-nonafluoro-	33.698	0.68
23	3-(1,3-Dihydroxyisopropyl)-1,5,8,11,14,17-hexaoxacyclononadecane	34.731	0.86
24	.gamma.-Tocopherol	36.604	2.80
25	Vitamin e	37.901	1.00
26	Cyclohexane, 1,1',1''-(1-propanyl-2-ylidene)tris-	38.332	2.95
27	[1,2'-Binaphthalene]-5,5',8,8'-tetrone, 1',4'-dihydroxy-2,3'-dimethyl-, (-)-	38.928	0.73
28	Oxiraneundecanoic acid, 3-pentyl-, methyl ester, trans-	39.442	2.85
29	Octadec-9-enoic acid	39.966	1.64
30	HEPTADECENE-(8)-CARBONIC ACID-(1)	40.916	1.57
31	Stigmasterol	41.284	2.71
32	1-methyl-2-(3-methyl-2-buten-1-yl)-1-(4-methyl-3-penten-1-yl)oxetane	41.621	4.71
33	.delta.7,25-Stigmastadienol	42.592	5.27
34	14-Pentadecenoic acid	42.981	0.64
35	1-Butanesulfinyl isocyanate, 1,1,2,2,3,3,4,4,4-nonafluoro-	43.718	1.79
36	Cyclotetradecane, 1,7,11-trimethyl-4-(1-methylethyl)-	45.892	0.58
37	1-allyl-3-methylindole-2-carbaldehyde	46.81	1.02

در برنج، جنسینگ و غیره را افزایش دهد (Kaikavoosi *et al.*, 2015; Yasuda *et al.*, 1972; Scowcroft, 1977). این نکته می‌تواند اهمیت مواد مورد استفاده در محیط کشت را نشان دهد و یقیناً می‌توان با کاربرد پریکوسورهای مختلف به صورت موردی تأثیر آن‌ها را بر نوع و میزان مواد مؤثره اندازه‌گیری نمود.

طی تحقیقی نیز فرایند کشت سلولی را عاملی مهم در ایجاد ترکیبات ثانویه متنوع دانستند (Varma *et al.*, 2010). هم‌چنین فرایند کشت بافت را راهکاری جهت تولید ترکیبات ثانویه بیشتر در گیاهان دارویی در مقیاس تجاری برشمرده‌اند (Sajc *et al.*, 2000). بسیاری از محققین نشان دادند که افزودن ترکیباتی نظیر اسیدهای آمینه، تنظیم‌کننده‌های رشد و غیره می‌تواند مواد مؤثره

جدول ۳- ترکیبات مؤثره موجود در ریشه گیاهان حاصل از کشت بافت

Table 3- Compounds identified from Root obtained from the tissue culture process

ردیف Row	ترکیب Component	زمان احتباس Retention Time (min)	فضای منحنی ترکیب Component Pick Area
1	Dimethyl sulfone	4.901	0.38
2	Isobutyraldehyde n-propylhydrazone	13.52	0.81
3	Capric acid	14.205	0.41
4	Ethyl decanoate	14.464	0.37
5	Lauric acid	17.733	5.80
6	Decanoic acid	19.014	1.05
7	1H-Indene, 1-methyl-	19.248	2.79
8	Tetradecanoic acid	20.805	3.90
9	2-(2-DIMETHYLAMINOETHOXY)ETHANOL	21.583	0.52
10	Isothiazole, 3-methyl-	23.056	0.86
11	Palmitic acid	23.767	5.56
12	N,N'-Diethyl-1,12-dodecanediamine	24.452	0.39
13	12-STEAROLACTONE	24.935	13.85
14	Oleic acid	25.609	0.70
15	Methyl stearate	25.76	0.37
17	Octadecanoic acid	26.388	1.01
18	Oleamide	26.579	0.83
19	3-Dimethylaminopropyl isocyanate	27.114	2.36
20	stereoisomer of 1,1',4,4'-tetrahydro-9,9'-bi-1,4-methanonaphthalene	27.524	3.31
21	trans-.delta.(sup 9)-Octadecenoic acid	28.24	1.15
22	4-cyano-7-phenyl-4,5-dihydro-7H-thiopyrano[3,4-b]furan	28.634	1.56
23	(7ar,14cc)-7a,14c-dihydronaphtho[2,1-b]naphtho-[1',2':4,5]furo[3,2-d]furan	29.106	4.05
24	2-(2-DIMETHYLAMINOETHOXY)ETHANOL	29.558	0.99
25	Oxacyclotridecan-2-one	30.009	0.96
26	1-Nonadecene	30.149	0.43
27	Hexadecanoic acid, 2-hydroxy-1-(hydroxymethyl)ethyl ester	30.445	4.15
28	N-(2-propenyl)-4-nitroaniline	30.689	1.12
29	spiro[1,3-dioxo-indene,-2,5'-2'-methyl-1',3'-dioxopyrrolo[3,4-c]indolizine	31.478	0.73
30	3-Methoxy-N-methylnaphthalimide	31.592	0.61
31	Cyclohexanol, 3,5-dimethoxy-, stereoisomer	31.804	1.21
32	N1,N1-Dimethyl-N2-(3-dimethylaminopropyl)formamidine	33.662	0.98
33	1-Aza-5,8-dihydroxyanthraquinone	34.451	1.24
34	3-(1,3-Dihydroxyisopropyl)-1,5,8,11,14,17-hexaoxacyclononadecane	34.736	0.48
35	18,19-Dihydroxy-1,4,7,10,13,16-hexaoxacycloicosane, (18S,19S)-	35.089	0.38
36	Phenol, 2-[2-(4-nitrophenyl)ethenyl]-, (E)- (CAS)	35.483	3.04
37	1,3,2-Dioxaphospholane, 2-chloro-4,5-bis(methoxycarbonyl)-, (E)-	37.138	0.32
38	9-Octadecenoic acid, methyl ester	37.683	0.48
39	Octanoic acid, heptyl ester	38.342	1.80
40	3,3'-Isopropilidenbis(1,5,8,11-tetraoxacyclotridecane)	39.468	0.39
41	Cyclopropaneoctanal, 2-octyl-	39.753	0.31
42	otochilone	40.314	0.57
43	(23R,24R,28S)-24-ethyl-23,28-cyclocholest-5-en-3.beta.-ol	41.621	7.64
44	2-Methyl-3-[(1S,2S)-1,3,3-trimethyl-2-(2-hydroxyethyl)cyclohexyl]tetrahydrofuran	41.969	0.72
45	1-allyl-3-methylindole-2-carbaldehyde	42.586	1.54
46	2,3,4-Trimethoxyphenylacetoneitrile	43.733	1.09
47	Benzoic acid, 4-hydroxy-3-(2-methoxybenzoyl)- (CAS)	44.626	2.65
48	9,19-Cyclolanost-25-en-3-ol, 24-methyl-, (3.beta.,24S)-	45.191	0.54
49	Cyclohexane, 1,1'-dodecylidenebis[4-methyl-	47.178	13.53

ترکیبات موجود در محیط کشت در افزایش و تعدد مواد ثانویه در گیاهان تولید شده توسط فرایند ریزازدیادی بود (جدول ۳). از طرف دیگر نکته جالب توجه در نتایج وجود میزان تنها ۴۰ ماده مؤثره در سوسپانسیون سلولی کالوس بود (جدول ۴) که احتمالاً این میزان کمتر نسبت به ریشه عدم وجود فرایندهای مربوط به چرخه‌های فتوسنتزی در گیاه در حالت سلولی می‌باشد.

بررسی‌ها نشان داد برگ گیاهان حاصل از فرایند کشت بافت نیز با ثبت ۳۷ ترکیب ثانویه (جدول ۲) نشان‌دهنده تنوع کمتر این مواد نسبت به میوه بود که می‌تواند با توجه به فرایند انتقال مواد به سمت میوه‌ها امری توجیه‌پذیر باشد. نکته‌ی جالب در تعداد متابولیت‌های ثانویه شناسایی شده و موجود در ریشه بود که با ثبت تعداد ۴۹ ماده بیانگر نقش و اهمیت الیسیتورها و

جدول ۴- ترکیبات مؤثره موجود در سوسپانسیون سلولی کالوس

Table 4- Compounds identified from Callus suspension

ردیف Row	ترکیب Component	زمان احتیاس Retention Time (min)	فضای منحنی ترکیب Component Pick Area
1	2(3H)-Furanone, 5-ethyl-dihydro-4-methyl-, trans- (CAS)	13.587	0.77
2	Dodecanoic acid	17.666	0.27
3	Spiro[bicyclo[2.2.1]heptane-2,2'-[1,3]dioxolan]-3-one, 4,7,7-trimethyl-	19.342	1.13
4	1,3-Propanediamine, N,N-dimethyl- (20.96	11.85
5	4-Propylthiazole	21.744	0.73
6	2H-Pyran-2-one, tetrahydro-6-pentyl-	22.289	0.76
7	n-Propylmaleamic acid	23.072	0.41
8	Chrysophanol	23.736	1.22
9	4-(3,3-Dimethyl-3-silacyclohexyl)-3,3-dimethylutan-2-one	24.774	0.20
10	12-STEAROLACTONE	24.935	3.91
11	13-Hexyloxacyclotridecan-2-one	25.236	0.36
12	2-Acetylthiazole	26.528	0.74
13	3-(Dimethylamino)propyl isothiocyanate	27.067	0.97
14	(+)-8-Epi-costaclavine	27.809	23.94
15	n-Amyl n-heptyl ketone	28.058	0.60
16	2-Amino-3,5,7,8-tetramethyl-3H-imidazo[4,5-f]quinoxaline	28.64	1.19
17	N,N-Dimethyl-2-cyclohexyloxyethylamine	28.966	4.21
18	15-.beta.hydroxy-aristone	29.117	3.45
19	6-Undecanone	29.527	0.34
20	2-Acetylthiazole	29.983	0.62
21	2,5,10-Undecanetrione, 6,6-dimethyl-	30.476	0.38
22	(1S(*),5S(*),8S(*))-5-Methyltricyclo[6.3.0.0(1,5)]undec-2-en-4-one	30.684	0.22
23	1-Aza-5,8-dihydroxyanthraquinone	31.27	3.81
24	Z-1,2-Dicyano-1,2-bis(2-methylimidazo[1,2-a]pyridin-3-yl)ethene	31.478	0.91
25	1-Cyano-6-methylellipticine	31.592	0.37
26	Lysergic acid	31.768	7.92
27	3-Dimethylaminopropyl isocyanate	32.137	4.68
28	3-Dimethylaminopropyl isocyanate	32.547	1.99
29	1,1,4-Trimethyl-3-pyrazalone	33.662	1.39
30	2-Amino-3,5,7,8-tetramethyl-3H-imidazo[4,5-f]quinoxaline	34.456	0.81
31	5,11-Dihydro-9b,10-diazacyclohepta[a]cyclohepta[4,5]benzo[1,2,3-cd]azulene	34.705	4.62
32	6-Pentadecanone	35.11	0.24
33	6-Tridecanone	35.873	0.38
34	2-Amino-3,4,5,8-tetramethyl-3H-imidazo[4,5-f]quinoxaline	36.303	3.13
35	1,4-dimethoxy-14-methyl-1,3,5(10),6,8,11-hexaen-17-one	37.808	3.94
36	2,3-(3-methylphenyl),5-methyl-[1H]-inden-1-one	38.337	2.21
37	Stigmasterol	41.585	1.75
38	1-Aza-5,8-dihydroxyanthraquinone	43.017	2.34
39	Methyl 9-octadecenoate \$\$ METHYL OLEATE	43.785	0.22
40	N-mesityl-m-anisidine	44.621	1.01

tree.com) بیش از ۱۰۰ ترکیب شیمیایی در اندام‌های مختلف کارلا از مناطق مختلف دنیا بررسی شده است و نشان داده شد که میزان حضور و مقدار ترکیبات در اندام‌های مختلف متفاوت می‌باشد.

نتیجه‌گیری کلی

نتایج حاصل نشان داد استفاده از ۳ میلی‌گرم در لیتر از هورمون 2,4-D منجر به بالاترین درصد کالوس‌زایی گردید و بیشترین درصد باززایی نیز در تیمارهای واجد ۲ میلی‌گرم در لیتر BAP به‌دست آمد. از بین اندام‌های مختلف شامل برگ، ریشه و میوه مشخص گردید میوه می‌تواند دارای بالاترین تنوع مواد ثانویه باشد که با توجه به عملکرد بالای آن می‌تواند منبع مهمی جهت استخراج مواد مؤثره باشد. همچنین ریشه‌ی گیاهان ریشه‌دار شده در محیط کشت نیز بالاترین میزان مواد مؤثره را در خود داشت که این مسئله می‌تواند بستر مناسب جهت بررسی نقش ترکیبات مورد استفاده در محیط کشت بر نوع، میزان و استخراج مواد مؤثره در زمینه تحقیقات آتی را فراهم آورد. براساس نتایج مطالعه‌ی فوق، فرایند ریزازدیادی می‌تواند در کنار صرفه‌جویی در هزینه تولید و حذف مرحله کشت بذر، نقش مهمی را در افزایش و ایجاد تنوع متابولیت‌های ثانویه گیاه کارلا ایفا نماید و زمینه لازم را جهت مطالعه و استخراج مواد مؤثره مورد نیاز در صنایع دارویی فراهم آورد. کاربرد بهینه تنظیم‌کننده‌های رشد می‌تواند نقش برجسته‌ای در دستیابی به حداکثر تولید کالوس، باززایی و ریشه‌زایی در فرایند کشت بافت ایفا نماید.

سپاس‌گزاری

بدین‌وسیله نویسندگان از تمام همکاران و مسئول آزمایشگاه بیوتکنولوژی دانشگاه زابل تشکر و قدردانی می‌نمایند.

گیاهان دارویی منابع مهم تولید ترکیبات آلی به نام متابولیت‌های ثانویه هستند که ارزش دارویی آن‌ها را سبب شده است. انواع مختلفی از این مواد و ترکیبات آلی در گیاهان مختلف شناسایی شده است (Kaykavoosi et al., 2015; Oksman and Inze, 2004). میزان تولید و حضور این ترکیبات در گیاهان تابع عوامل ژنتیکی و محیط می‌باشد و عموماً در حفظ و بقای گونه‌ها نقش عمده‌ای دارد (Wink, 2010). بر اساس نتایج مطالعات صورت گرفته توسط محققان مختلف فرایند کشت بافت می‌تواند به‌دلیل تأثیر ترکیبات، مواد و فعالیت‌های مختلف فرایند فوق، سبب تغییر در میزان متابولیت‌های ثانویه و عملکرد گیاهان در تولید این مواد گردد (Gholami, 2017; Kaikavoosi et al., 2015).

گیاه کارلا به‌عنوان یک گیاه مغذی با میزان بالای اسیدآمین، ویتامین‌های مختلف و عناصر معدنی مفید به‌دلیل وجود ترکیبات ثانویه بسیار قوی و مؤثر از دیرباز مورد توجه بوده است (Choudhary, 1967). این گیاه دارای ترکیبات بسیار مهمی در حوزه دارویی هم‌چون *Charantin* از مجموعه ترکیبات *hypoglycemic* از پیش‌سازهای ساپونین می‌باشد. *Momordenol*، *P-insulin*، *Momordicine* و *Goyaglycosides* بسیاری از ترکیبات دیگر در این گیاه شناسایی شده‌اند که می‌توانند در حوزه درمان و پیشگیری دیابت، ایدز، فشار خون و افزایش سیستم ایمنی کارایی داشته باشند (Fang and NG, 2011). شناسایی ترکیبات ثانویه موجود در این گیاه و بررسی تأثیر فرایند کشت بافت بر تولید و یا حذف ترکیبات مختلف می‌تواند زمینه تحقیقاتی مناسبی را جهت درک صحیح از فرایند کشت بافت و ریزازدیادی بر روی مواد مؤثره دارویی در این گیاه فراهم سازد. در کامل‌ترین گزارش موجود در خصوص ترکیبات ثانویه کارلا (www.rain-)

References

- Agarwal, M. 2015. Tissue culture of (*Momordica charantia L*). A review. *Journal Plant Science*, 3: 24-32.
- Barz, W., Reinhard, E. and Zenk, M. 2012. Plant Tissue Culture and Its Bio-technological Application Proceedings of the First International Congress on Medicinal Plant Research, Section B, Held at the University of Munich, Germany September 6–10, 1976, Springer Science and Business Media.
- Bednarek, P.T., Orlowska, R., Koebner, R.M. and Zimny, J. 2007. Quantification of the tissue-culture induced variation in barley *Hordeum vulgare L*. *BMC Plant Biology*, 7-10.

- Bernhard, T., Matthias, A., Sebastian, T., Björn Egert., Susanne. B., Supannika S., James, D.M., Sabine, E.K. and Narinder, P.S. 2019. Bitter gourd, (*Momordica charantia* L.), breeding lines differ in secondary metabolite content according to market type. *Journal of Applied Botany and Food Quality*, 92: 106-115.
- Dodds, J.H. and Roberts, L.W. 1985. Experiments in plant tissue culture, International Potato Center.
- Dorica, B. and Alina, S. 2014. The Bitter melon callus growth (*Momordica charantia* L.) in different in vitro systems. *Journal of Horticulture*, 18(2): 133-136.
- Fang, E.F. and NG, T.B. 2011. Bitter gourd (*Momordica charantia*) is a cornucopia of health: a review of its credited antidiabetic, anti-HIV, and antitumor properties. *Current Molecular Medicine*, 11(5): 417-436.
- Gaspar, T., Kevers, C., Penel, C., Greppin, H., Reid, D.M. and Thorpe, T.A. 1996. Plant hormones and plant growth regulators in plant tissue culture. *In vitro Cellular and Developmental Biology-Plant*, 32: 272-289.
- George, E.F. 1993. Plant propagation by tissue culture. Part 1: *The technology*, Exegetics limited.
- Gholami, A.A. 2017. Production of secondary metabolites through genetic engineering and plant tissue culture. *Journal of Biosafety*, 10: 17-36.
- Grover, J. and Yadav, S. 2004. Pharmacological actions and potential uses of (*Momordica charantia*): a review. *Journal of Ethnopharmacology*, 93: 123-132.
- Guo-li, W. 2008. Establishment of in vitro Regeneration System of (*Momordica charantia* L). with Different Genotype [J]. *Journal of Anhui Agricultural Sciences*, 36(28): 12125-12127.
- Jia, S., Shen, M., Zhang, F. and Xie, J. 2017. Recent advances in (*Momordica charantia*): functional components and biological activities. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(12): 2555.
- Jilka, C., Strifler, B., Fortner, G.W., Hays, E.F. and Takemoto, D.J. 1983. In vivo antitumor activity of the bitter melon (*Momordica charantia*). *Cancer Research*, 43: 5151-5155.
- Kaikavoosi, K., Kad, T.D., Zanan, R.L. and Nadaf, A.B. 2015. 2-Acetyl-1-pyrroline augmentation in scented indica rice (*Oryza sativa* L) varieties through Δ 1-pyrroline-5-carboxylate synthetase (P5CS) gene transformation. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 177: 1466-1479.
- Kubola, J. and Siriamornpun, S. 2008. Phenolic contents and antioxidant activities of bitter gourd (*Momordica charantia* L.) leaf, stem and fruit fraction extracts in vitro. *Food Chemistry*, 110: 881-890.
- Leung, L., Birtwhistle, R., Kotecha, J., Hannah, S. and Cuthbertson, S. 2009. Anti-diabetic and hypoglycaemic effects of (*Momordica charantia*): a mini review. *British Journal of Nutrition*, 102: 1703-1708.
- Malekshahi, H., Bahrami, G., Miraghaee, S., Ahmadi, S.A., Sajadimajd, S., Hatami, R., Mohammadi, B. and Keshavarzi, S. 2019. (*Momordica charantia*) reverses type II diabetes in rat. *Journal of Food Biochemistry*, 43(11):e13021.
- Malik, S., Zia, M. and Chaudhary, M. 2007. In vitro plant regeneration from direct and indirect organogenesis of (*Memordica charantia*). *Pakistan Journal of Biological Sciences: PJBS*, 10: 4118-4122.
- Mikulik, J. 1999. Propagation of endangered plant species by tissue cultures. *Acta Universitatis Palackianae Olomucensis, Biologica*, 37: 27-33.
- Oksman, K.M. and Inze, D. 2004. Plant cell factories in the post-genomic era: new ways to produce designer secondary metabolites. *Trends in Plant Science*, 9: 433-440.
- Park, H.Y., Saini, R.K., Gopal, J., Keum, Y.S., Kim, D.H., Lee, O. and Sivanesan, I. 2017. Micropropagation and subsequent enrichment of carotenoids, fatty acids, and tocopherol contents in *Sedum dasyphyllum* L. *Journal Frontiers in Chemistry*, 5: 77-89.
- Renata, S. and Raivo, K. 2010. The perception of landscape as a source of medicinal plants. *Journal of the Humanities and Social Sciences*, 1464(3): 207-226.
- Sajc, L., Grubisic, D. and Vunjak-Novakovic, G. 2000. Bioreactors for plant engineering: an outlook for further research. *Biochemical Engineering Journal*, 4: 89-99.

- Sammaiah, D., Srilatha, T., Anitha, D.U. and Ugandhar, T.** 2014. Plant let regeneration from leaf explants through organogenesis in Bitter Melon (*Momordica Charantia L.*). *Academic Journal of Interdisciplinary Studies*, 3(5): 79-84.
- Sarani, M., Fanaii, H. and Koohkan, Sh.** 2010. Evaluation of (*Memordica charantia*) yield and resistance in Sistan region. National medicinal Plants Conference. Iran, Sary, No:1. (In Persian).
- Saravani, K., Javadian, E., Mohsenbeygi, M. and Hassanshahian, M.** 2019. Study the antimicrobial effects of (*Momordica charantia*) on pathogenic bacteria. *Journal of Medical Bacteriology*, 8: 1-7.
- Scowcroft, W.** 1977. Somatic cell genetics and plant improvement. *Advances in Agronomy*, 29: 39-81.
- Shan, B., Xie, J.-H., Zhu, J.-H. and Peng, Y.** 2012. Ethanol modified supercritical carbon dioxide extraction of flavonoids from (*Momordica charantia L.*) and its antioxidant activity. *Food and Bioproducts Processing*, 90: 579-587.
- Singh, A., Singh, S.P. and Bamezai, R.** 1998. (*Momordica charantia*) peel, pulp ,seed and whole fruit extract inhibits mouse skin papillomagenesis. *Toxicology Letters*, 94: 37-46.
- Sonali, J., Iyyakkannu, S. and Byoung, R.J.** 2013. Effect of cytokinins on *in vitro* multiplication of (*Sophora tonkinensis*). *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 3(7): 549-553.
- Sugandh, S.** 2017. Plant tissue culture: a promising tool of quality material production with special reference to micropropagation of banana. *Biochemical and cellular Archives*, 17(1):1-26.
- Sultana, R. and Bari Miah, M.** 2003. In vitro propagation of karella (*Momordica charantia Linn.*) from nodal segment and shoot tip. *Journal Biology Sciences*, 3: 1134-1139.
- Thiruvengadam, M., Rekha, K.T., Yang, C.-H., Jayabalan, N. and Chung, I.-M.** 2010. High-frequency shoot regeneration from leaf explants through organogenesis in bitter melon (*Momordica charantia L.*). *Plant Biotechnology Reports*, 4: 321-328.
- Varma, V.** 2010. Advancements in the production of secondary metabolites. *Journal of Natural Products*, 3: 112-123.
- Wink, M.** 2010. Biochemistry of Plant Secondary Metabolism, Second Edition. Annual Plant Reviews Volume 40 Blackwell Publishing Ltd.
- Yasuda, S., Satoh, K., Ishii, T. and Furuya, T.** 1972. Studies on the cultural conditions of plant cell suspension culture. *Fermentation Technology Today*, 697-703.
- Yen ,Y.** 2019. Theories Behind Plant Tissue Culture. College of Agriculture and Biological Sciences, South Dakota State University. Plant and Soil Sciences eLibrary (PASSeL) Lesson.

Evaluation of the effect of growth regulators on the micropropagation process of medicinal plant (*Momordica charantia*), and identification of secondary compounds of different organs using GC-MS

Mohammad Mobasseri Moghadam^{1*}, Baratali Fakheri², Hossein Kamaladiny³, Mahmood Solouki², Fatemeh Haddadi³

¹ PhD. Student in Biotechnology, Department of Plant Breeding and Biotechnology, University of Zabol, Zabol, Iran

² Department of Plant Breeding and Biotechnology, University of Zabol, Zabol, Iran

³ Department of Biology, University of Zabol, Zabol, Iran

*Corresponding Author: ba_fakheri@yahoo.com

Received: 20 June 2021

Accepted: 18 September 2021

DOI: 10.22034/CSRAR.2021.291381.1097

Abstract

Introduction: Karela (also known as Bitter melon or bitter gourd) is a tropical annual plant of the Cucurbitaceae family with the scientific name *Momordica charantia*. Due to the plant's complex chemical structure, industrial production of many of its useful compounds is not feasible. Therefore, propagation using *in vitro* culture technology is an efficient method for increasing these valuable compounds by optimizing various factors and compounds in the culture medium. Various factors, including plant hormones, genotype, and temperature, as well as the plants' response to *in-vitro* activities, as well as the response of plant cells and tissues to hormonal balance during cultivation and propagation, influence the success of *in vitro* organogenesis. In general, the control of differentiation processes depends on the presence of auxin and cytokinin, as well as their equilibrium and interaction, which results in the production of aerial parts and roots. Traditional medicine recognizes karela as a distinctive and valuable plant due to the presence of its valuable constituents. Using various techniques such as gas chromatography (GC) and mass spectrometer, some of these compounds have been measured, identified, and introduced in extracts of cell suspension, root, leaf, and fruit.

Materials and Methods: In order to study the micropropagation of Karela plant, certified seeds were obtained from the DURGA company in Chandigarh (India) and transferred to the University of Zabol's tissue culture laboratory. The seeds were washed with running water and a few drops of liquid dish soap for 15 minutes before being rinsed three times with distilled water. Under a laminar airflow hood, seeds were immersed in 70% ethanol for 60 seconds, followed by 0.1% mercuric chloride for 240 seconds, and then rinsed in distilled water. Calluses obtained from the optimal combination were transferred to culture medium containing varying concentrations of BAP (1, 2, 3, and 4 mg/L). The cultures were incubated at 28°C with 2000 to 2500 lux of light and a 12-hour light/12-hour dark cycle.

In order to determine the secondary metabolites, plant extract, cell suspension, roots, leaves, and fruits were ground with liquid nitrogen and subjected separately to ethanol (96%) and distilled water for 72 hours. Using GC-MS, the compounds of ethanolic extracts from control samples and tissue culture treatments were identified (Agilent, USA). On the basis of the results-obtained curve, the presence of secondary compounds in various plant parts was determined. The experiment was conducted using a completely random design with three replications, and the data were analyzed using SPSS 22 software. The F test was used to analyze variance, and the Duncan's multiple range test was used to compare means at a 5% probability level.

Results and Discussion: Induction of callus from germinated seeds began after 10 days in MS medium containing various concentrations of 2,4-D (1, 2, 3, 4, 5, and 6 mg/L), whereas no callus was induced in the absence of 2,4-D. There was a significant difference between these treatments in

terms of callus production, with the highest callus induction occurring at 3 mg/L 2,4-D.

Calluses obtained from the best concentration of 2,4-D were transferred to regeneration MS medium containing different concentrations of BAP and NAA (0.1mg/L). The results showed that the number of stems per callus increased with increasing amounts of BAP, up to 2 mg/L, and the highest number of stems per callus was obtained in the culture medium containing 2 mg/L BAP. Due to the inhibitory effects of this growth regulator on the regeneration process, The addition of BAP at concentrations greater than 2 mg/L decreased the rate of shoot regeneration.

The evaluation of secondary metabolites revealed that the highest concentration of active substances (46 compounds) was found in the fruits of plants grown in tissue culture, which may be due to the physiological changes of the plant as well as the presence of numerous precursors in the *in vitro* culture medium. This issue can be caused by the ripening of the plant as well as the natural inherent process of transferring effective substances from other organs to the fruit in the fruit filling phase.

Conclusion: The use of 3 mg/L 2,4-D led to the highest percentage of callus formation, and 2 mg/L BAP led to the highest percentage of regeneration, according to the results. Among the various explants, including leaves, roots, and fruits, it was discovered that the fruit contained the greatest number of secondary metabolites and, due to its high performance, can serve as a significant source for extracting effective substances. In addition, the roots had the highest concentration of effective substances, making them a suitable platform for investigating the role of the compounds used in the culture medium on the type, concentration, and extraction of effective substances, and aiding in a proper understanding of the tissue culture and micropropagation effects on the over-expression and formation of secondary metabolites in karela plants.

Keywords: Callus induction, Direct regeneration, Optimization of tissue culture, Secondary metabolites