

بهینه‌سازی کالوس‌زایی و بررسی میزان بیان ژن‌های فلاونول سنتاز و چالکون ایزومراز در مسیر تولید کوئرستین تحت تأثیر اشعه UV-B در کشت کالوس خیار تلخ (*Momordica charantia* L.)

زیبا فولادوند^۱، بهمن فاضلی‌نسب^{۲*}

^۱ دانشجوی دکتری، گروه ژنتیک مولکولی، دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

^۲ مربی، گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه زابل، زابل، ایران

تاریخ دریافت: ۹۷/۷/۷ تاریخ پذیرش: ۹۷/۹/۹

چکیده

کوئرستین یکی از انواع متابولیت‌های ثانویه است که در برگ و میوه‌های گیاه خیار تلخ (*Momordica charantia* L.) وجود دارد و به‌عنوان آنتی‌اکسیدان، آنتی‌ویروس و ضد سرطان شناخته می‌شود. هدف از تحقیق حاضر بهینه‌سازی کالوس‌زایی و بررسی میزان بیان ژن‌های فلاونول سنتاز و چالکون ایزومراز در مسیر تولید کوئرستین تحت تأثیر اشعه UV-B در کشت کالوس خیار تلخ می‌باشد. آزمایش در سال ۱۳۹۷ در پژوهشکده زیست فناوری دانشگاه زابل انجام شد. غلظت‌های مختلف تنظیم‌کننده‌های رشد (۰/۲، ۰/۵، ۱ و ۵ میلی‌گرم در لیتر) BAP و (صفر، ۰/۲۵، ۰/۵، ۱ و ۵-4-D) و ریز نمونه ساقه و برگ) جهت تولید کالوس در گیاه خیار تلخ در طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار ارزیابی شد. تأثیر اشعه UV-B (پنج گروه (شاهد (نور طبیعی)، ۵ دقیقه در معرض اشعه (بررسی بیان ژن در ۲۴ و ۴۸ بعد از اعمال تیمار) و ۱۰ دقیقه در معرض اشعه (بررسی بیان ژن در ۲۴ و ۴۸ بعد از اعمال تیمار)) بر بیان ژن‌های مسیر بیوسنتزی کوئرستین از جمله فلاونول سنتاز و چالکون ایزومراز (با استفاده از روش $2^{-\Delta\Delta CT}$)، میزان فعالیت آنزیم آنتی‌اکسیدانی فنیل‌آمونیاپاز (با استفاده از غلظت اسید سینامیک تولید شده) و فلاونوئید (از روش متانل اسیدی و دستگاه HPLC) در بهترین کالوس‌های انتخاب شده بررسی شد. نتایج تجزیه واریانس نشان داد که نوع و غلظت‌های مختلف تنظیم‌کننده‌های رشد بر القای کالوس اختلاف معنی‌داری داشته است. مقایسه میانگین داده‌ها نشان داد که بیشترین وزن خشک کالوس در غلظت ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر 2-4-D و ۱ میلی‌گرم در لیتر BAP برای ریز نمونه ساقه به‌دست آمد. بیشترین بیان ژن فلاونول سنتاز و چالکون ایزومراز در تیمار اعمال ۱۰ دقیقه اشعه UV-B در زمان ۲۴ ساعت بعد از شروع تیماردهی بدست آمده اما این بیان در ۴۸ ساعت بعد از اعمال تیمار کاهش یافته است. بیشترین بیان فنیل‌آمونیاپاز، کوئرستین و فلاونوئید در زمان ۵ دقیقه اعمال تیمار اشعه UV-B در ۴۸ ساعت بعد از اعمال تیمار بدست آمده است. از مقایسه کالوس‌های اشعه خورده و نخورده مشخص شد که میانگین تغییرات بیان نسبی ژن فلاون سنتاز و چالکون ایزومراز به ترتیب ۱/۴ و ۲/۴ برابر شرایط شاهد بود. در کل نتایج این تحقیق نشان داد که اشعه UV-B در سطح کالوس تأثیر مثبتی بر بیان ژن‌های مسیر بیوسنتز فلاونوئیدها داشته است.

واژه‌های کلیدی: میان ژن، خیار تلخ، فلاونوئید، فنیل‌آمونیاپاز، کالوس‌زایی، کوئرستین، BAP، 2,4-D

میزان و کیفیت پلی‌ساکاریدهای (BPS-F, BPS-H) و (BPS-I) میوه کارلا بررسی و به این نتیجه رسیدند که در روش فریز کردن اکثریت پلی‌ساکاریدها دارای کمیت و کیفیت بلایی بودند اما پلی‌ساکارید BPS-I که دارای بالاترین خاصیت آنتی‌اکسیدانی می‌باشد در خشک کردن به روش مادون قرمز به دست آمده است. در تحقیقی (Nasr and Pirani, 2016) خواص آنتی‌اکسیدانی و ضد میکروبی عصاره اتانلی خیار تلخ (کشت شده در منطقه مازندران) بررسی و مشخص کردند که میزان فنل و فلاونوئید به ترتیب ۲۸/۶ و ۱۹/۹۳ میلی‌گرم در میلی‌لیتر عصاره و همچنین IC50 آن برابر با ۲۵۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر بوده است. در تحقیقی (Lopes et al., 2018) بیشترین میزان خواص آنتی‌اکسیدانی (براساس DPPH) در عصاره استونی برای گوشت میوه خیار تلخ (1 mg ET g⁻¹ و ۲/۱۸) و عصاره هیدروالکلی برای پوست (1 mg ET g⁻¹ و ۷/۲) و بذر (1 mg ET g⁻¹ و ۳/۰۱) میوه خیار تلخ گزارش شده است.

یکی از مشکلات صنعت غذا و دارو، گسترش سویه‌های میکروبی مقاوم به داروها و آنتی‌بیوتیک‌ها بوده و امروزه به دلیل خاصیت سمی و سرطان‌زایی ترکیبات شیمیایی و سنتزی، استفاده از گیاهان دارویی جهت درمان بیماری‌های مزمن (مثل سرطان) توجه بسیاری از پژوهشگران را به خود معطوف و از این رو، استفاده از ترکیبات ضد میکروبی و آنتی‌اکسیدانی طبیعی مانند اسیدهای آلی، اسانس‌ها و عصاره‌های گیاهی می‌تواند جایگزین مناسب و ایمنی در مواد غذایی باشد (Negi, 2012). تحقیقات نشان داده منبع دریافت فنل‌ها و فلاونوئیدها در نقاط مختلف جهان به نوع رژیم غذایی مردم منطقه وابسته است. برای مثال در کشورهایی همچون ژاپن و چین مصرف چای سبز تأمین‌کننده این ترکیبات مورد نیاز بدن است در حالی که این مواد در کشورهای غربی با مصرف

خیار تلخ (*Momordica charantia* L.) که به نام‌های کدوی تلخ، خربزه تلخ و خیار چنبر تلخ نیز مشهور است، از خانواده Cucurbitaceae معمولاً در مناطق گرمسیری جهان از جمله آمازون، آفریقای شرقی، جزایر واقع در دریای کارائیب و جنوب آمریکا در حال کشت بوده و همچنین در مناطق گرمسیری ایران مثل سیستان و بلوچستان و هرمزگان و بوشهر کشت آن امکان پذیر شده است (Daniel et al., 2014). ترکیباتی از جمله ساپونین‌های استروئیدی، پروتئین شبه انسولین، فلاونوئیدها و آلکالوئیدها در این گیاه یافت می‌شود (Joseph and Jini, 2013). عصاره برگ کارلا به سنتز نانوذرات تیتانیوم در درمان مالاریا گونه *Plasmodium falciparum* پاسخ مثبت داده (Gandhi et al., 2018) و جهت درمان زخم معده (Raish et al., 2018) نیز استفاده شده است. خواص ضد میکروبی، ضد لوسمی (Rao, 2018) و ضد تومور (Fang et al., 2018; Saahithya et al., 2018) در عصاره میوه این گیاه بر علیه تعدادی از لاین‌های سلولی شامل لاین‌های سلولی سرطان کبد، لوسمی و سارکوما شناسایی شده است (Mwambete, 2009).

در تحقیقی (Viridi et al., 2003) مشخص شده که استفاده از عصاره آبی گیاه کارلا به میزان ۲۰ میلی‌گرم در کیلوگرم وزن موش باعث کاهش ۴۸ درصدی قند خون در مقایسه با گلی بن کلامید به‌عنوان دارویی شیمیایی سنتز شده گردیده است. در تحقیقی دیگر (Perez et al., 2019) در شرایط آب و هوایی تگزاس میزان اسکوریک اسید میوه کارلا از ۴۲/۶۹ تا ۱۶۲/۹۷ میلی‌گرم به ازای ۱۰۰ میوه تازه گزارش شده است. در تحقیقی (Yan et al., 2019) روش‌های مختلف خشک کردن (فریز کردن، خشک کردن بوسیله نور مادون قرمز و خشک کردن بوسیله هوای گرم) بر

پیام‌رسان ثانویه داشته باشد. البته مراحل ابتدایی این فرآیند تنظیم شده می‌تواند توسط فیتوهورمون‌ها از جمله اتیلن (Singh et al., 1999) و ABA (Abscisic acid) کنترل شود (Larkindale and Knight, 2002).

در گیاه *Fagopyrum esculentum*، میزان رشد گیاه، تمایز و تولید توسط اشعه UV-B بازداشته می‌شود. اکسیداسیون لیپیدهای گیاهی و فعالیت آنزیم‌های پلی‌فنل‌اکسیدازی با افزایش اشعه UV-B افزایش می‌یابد و از طرف دیگر غلظت ترکیبات فنیل پروپانوییدی، فعالیت سوپراکسید دیسموتاز و غلظت آسکوربیک اسید در سطوح پایین اشعه UV-B افزایش می‌یابد و این در حالی است که در شدت‌های بالاتر روند کاهشی به خود می‌گیرد (Usman et al., 2011).

مشخص شده است که در کالوس گیاه خیار تلخ تعداد زیادی ترکیبات ثانویه وجود دارد و تحقیقات مختلف در این زمینه انجام شده است (Daniel et al., 2014).

میزان کم مواد مؤثره دارویی در تعدادی از بافت‌ها، چند مرحله‌ای بودن بیوستنز این ترکیبات در بافت‌های خاص، تأثیرات خاص و تقاضای بالا برای این مواد در گیاهان دارویی دلایل مهمی است که دانشمندان را به استفاده از روش‌های کشت بافت گیاهی از جمله تولید کالوس، سوسپانسیون و ریشه‌های مویی برای تولید متابولیت‌های ثانویه ترغیب می‌کند (Cragg and Newman, 2013). در شرایط ایده آل سلول‌های کالوس می‌توانند به سرعت، به صورت دائم و بدون محدودیت به رشدشان ادامه دهند، بنابراین کاندیداهای مناسبی برای تولید این ترکیبات محسوب می‌گردند (Chupeau et al., 2013). ترکیب ۷/۷ میکرو مولار NAA به همراه ۲/۲ میکرو مولار TDZ (Thidizuron) منجر به تولید کالوس‌های سبز و فشرده از ریزن نمونه‌های گیاهی در *M. Charantia* شده است.

سیب و پیاز و در کشورهای شرقی با مصرف سبزی‌ها و مواد غذایی تخمیری تأمین می‌شوند (Wach et al., 2007).

در کشور ایران به‌طور جامع نوع خاص استفاده از انواع مواد حاوی آنتی‌اکسیدان وجود ندارد اما با تبلیغات مختلف کارهایی از جمله مصرف سبزی‌ها به صورت خام و پخته، برگ گیاهان و درختان مختلف (به صورت دم‌نوش، عرقیات، اسانس، عصاره، مربا، شربت، ترشی، مواد شوینده (از جمله سدر) و حتی مصرف به صورت دلمه و غیره) صورت گرفته که پیرو تحقیقات مختلف باید از اندام‌های مختلف گیاهان که دارای نوع خاص مواد آنتی‌اکسیدانی بوده استفاده خاصی از آن‌ها بشود (Fazeli-Nasab and Mirzaei, 2018).

مسیرهای پیچیده تولید متابولیت‌های ثانویه تحت تأثیر کنترل‌کننده‌های قوی در سطح مولکولی بوده به‌طوری‌که بیوستنز متابولیت‌های ثانویه می‌تواند توسط محرک‌های غیر زیستی مثل اشعه UV، یون‌های فلزی و استرس‌های اسمزی، یا محرک‌های زیستی مثل عصاره مخمر، کیتوزان و مولکول‌های سیگنال‌دهنده مثل متیل‌جاسمونات و سالیسیلیک‌اسید تحت تأثیر قرار گیرد (Akula and Ravishankar, 2011). همچنین ضخامت برگ‌ها و میزان ترکیبات فنولیکی در برگ‌ها می‌تواند تحت تأثیر اشعه UV-B قرار گیرد. اشعه UV می‌تواند بیان ژن‌های مسیر بیوستنز فلاونوئیدها را تحت تأثیر قرار داده و منجر به تجمع این ترکیبات در گیاه گردد (Liu et al., 2012). تحقیقات نشان داده است که اشعه UV می‌تواند بر روی رشد، مورفوزن، دستگاه فتوسنتزی و ساختار DNA اثر داشته باشد (Frohnmeier and Staiger, 2003)، مسیرهای انتقال پیام UV-B که می‌تواند بیان ژن‌ها را تحت تأثیر قرار دهد هنوز ناشناخته مانده است، هر چند که به نظر می‌رسد که گونه‌های واکنشگر اکسیژن می‌توانند نقش مهمی را به‌عنوان

آنتی‌اکسیدانی فنیل‌آمونیاپاز در بهترین کالوس‌های انتخاب شده و متأثر از اشعه UV-B نیز بررسی گردد.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی: در این تحقیق نمونه‌های بذری خیار تلخ (*Momordica charantia*) از بانک بذر پژوهشکده کشاورزی دانشگاه زابل تهیه، شناسایی مجدد آن در آزمایشگاه گیاه‌شناسی دانشگاه زابل انجام و سپس مورد آزمایش قرار گرفتند.

القای کالوس: جهت تهیه نمونه برگ و ساقه استریل ابتدا بذور توسط الکل ۷۰ درصد به مدت ۳۰ ثانیه و سپس توسط هیپوکلریت سدیم ۵ درصد و توئین به مدت ۵ دقیقه ضدعفونی شدند و نهایت در محیط کشت MS ۱/۲ کشت شدند. بعد از جوانه‌زنی بذور و رسیدن نمونه‌ها به مرحله چهار برگی، نمونه‌های برگی و ساقه، بعد از شست‌وشو با استفاده از آب مقطر استریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار در محیط کشت MS تولیدی شرکت سیگما به همراه ترکیبات متفاوت BAP (۰/۲، ۰/۵، ۱ و ۵ میلی‌گرم در لیتر) و 2-4-D (صفر، ۰/۲۵، ۰/۵، ۱ و ۵ میلی‌گرم در لیتر) برای القای تولید کالوس استفاده شد. تعداد کالوس‌های تولید شده، حجم کالوس (Sobhanizade et al., 2017) و وزن خشک کالوس‌ها اندازه‌گیری شد. آنالیز واریانس با استفاده از SAS 9.2 و مقایسه میانگین داده‌ها با استفاده از آزمون دانکن در سطح احتمال ۵ درصد انجام شد.

تیمارهای اشعه UV-B: بعد از انتخاب بهترین کالوس‌ها، در شرایط تیمار، کشت‌ها به پنج گروه تقسیم شده‌اند: گروه اول به‌عنوان کنترل (نگهداری در شرایط بدون نور)، گروه‌های دوم (۵ دقیقه در معرض اشعه UV و بررسی بیان در ۲۴ ساعت بعد از اعمال تیمار)، گروه سوم (۵ دقیقه در معرض اشعه UV و بررسی بیان در ۴۸ ساعت بعد از اعمال تیمار)، گروه چهارم (۱۰ دقیقه در معرض اشعه UV و بررسی بیان

در تحقیقی (Manye et al., 2004) سه نوع کالوس؛ سبز، سبز-زرد و زرد شکننده از جوانه‌های نابجای گیاه خیار تلخ بدست آورده‌اند و به این نتیجه رسیدند که نوع و غلظت‌ها مختلف هورمون‌های گیاهی بر نوع کالوس اثر معنی‌داری داشته است به‌طوری‌که غلظت ۴ میلی‌گرم در لیتر BA و ۲ میلی‌گرم در لیتر KT (کتین) باعث تولید کالوس سبز-زرد که فراوانی آن ۶۶/۷ درصد بوده گردیده است. مناسب‌ترین حالت جهت کالوس زایی جوانه‌های نابجای خیار تلخ را در محیط کشت MS و ۵ میلی‌گرم در لیتر هورمون ZT (زناتین) و ۵ میلی‌گرم در لیتر KT بدست آورده‌اند.

در تحقیقی (Guo-li, 2008) نوع و غلظت‌های مختلف هورمون‌های گیاهی بر جوانه کوتیلدون خیار تلخ بررسی و به این نتیجه رسیدند که ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BA و ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر NAA مناسب‌ترین هورمون جهت کالوس‌زایی بوند.

افزایش میزان کوئرستین در برگ‌های Brassica napus که تحت تأثیر اشعه UV-B است، مشاهده شده است و از طرف دیگر این افزایش سطح کوئرستین در *silence vulgaris* نیز گزارش شده است (Menghini et al., 1993; Tůmová and Tůma, 2011). با توجه به اینکه اکثریت آزمایش‌های انجام شده بر روی خیار تلخ در گیاه کامل انجام شده لذا تا رسیده گیاه خیار تلخ به دوره کامل رشد زمان زیادی طول خواهد کشید و در این مدت نیز تحت تأثیر عوامل مختلف محیطی زیستی و غیرزیستی قرار گرفته و مواد آنتی‌اکسیدانی آن تحت تأثیر قرار خواهد گرفت لذا در این تحقیق سعی خواهد شد تا ضمن اینکه ترکیبات و غلظت‌های مختلف تنظیم‌کننده‌های رشد (BAP و 2-4-D) و ریز نمونه (ساقه و برگ) جهت تولید کالوس در گیاه خیار تلخ ارزیابی شود. بیان ژن‌های مسیر بیوسنتزی کوئرستین از جمله فلاونول سنتتاز و چالکون‌ایزومراز و میزان فعالیت آنزیم

واکنش سنتز cDNA با استفاده از دستورالعمل کیت واکنش (Gene All, South Korea) استفاده شد. واکنش بررسی بیان ژن با استفاده از دستگاه (Corbett Research RG 3000) و پرایمرهای اختصاصی طراحی شده برای ژنهای فلاونول سنتاز، چالکون ایزومراز و اکتین به عنوان ژن کنترل داخلی انجام شد. پرایمرهای اختصاصی ژنهای مورد نظر که در مسیر بیوسنتز فلاونوئیدها وجود دارند با استفاده از بسته نرم افزاری DNASTAR طراحی شدند. پرایمرهای اختصاصی استفاده شده در این تحقیق و اطلاعات مربوط به آنها در جدول (۱) آمده است.

در ۲۴ ساعت بعد از اعمال تیمار) و گروه پنجم (۱۰ دقیقه در معرض اشعه UV و بررسی بیان در ۴۸ ساعت بعد از اعمال تیمار)

بررسی کمی بیان ژن با استفاده از روش Real Time-PCR با استفاده از کالوس های تازه گیاه *M.charantia* طبق دستورالعمل کیت استخراج RNA کل شرکت دنا زیست آسیا (مشهد، ایران) استخراج گردید. برای تعیین کیفیت و کمیت RNA استخراج شده از ژل آگاروز با غلظت (۱ درصد) و اسپکتروفتومتر (Eppendorf BioPhotometer) استفاده شد. سپس از ۵۰۰ نانوگرم RNA استخراج شده برای

جدول ۱: مشخصات آغازگرهای استفاده شده برای بررسی بیان ژنهای FLS, CHI در مسیر تولید کوئرستین در کشت کالوس

گیاه *Momordica charantia*

نام ژن	پرایمر جلوبرنده	پرایمر برگشتی	دمای اتصال	طول قطعه تکثیری
فلاونول سنتاز (FLS)	CTTAGAGGCACTGACACCT	CTTAATCGGAAAGGAGAC	۵۷/۵	۱۰۸ باز
چالکون ایزومراز (CHI)	GTTGAAAGAAGTCTCGGCG	TCTGTATGAGCCGGTACACC	۶۱	۱۵۰ باز
اکتین (Actin)	AGGAACCACCGATCCAGACA	GGTGCCCTGAGGTCCTGTT	۶۱/۹	۲۵۰ باز

آزمایشگاه قرار گرفتند. ۲ میلی لیتر از محلول به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۲۰۰۰ دور سانتیفریوژ شد. محلول رویی با استفاده از فیلترهای ۰/۲۲ میکرومتر فیلتر و توسط دستگاه HPLC آنالیز شدند. آنالیز با استفاده از دکتور UV و ستون C18 (4.6mm*250mm)، فاز ثابت شامل متانول: استونیتریل: آب (۱۰:۷۵:۱۰) و ۵ درصد اسید استیک به عنوان فاز متحرک انجام شد. نمودارهای کروماتوگرافیک بر اساس زمان بازدارندگی شان با نمونه استاندارد کوئرستین مورد بررسی قرار گرفتند (Chang et al., 2002).

آماده سازی و تخمین فعالیت آنزیم فنیل آمونیا لیااز: در این روش ۳۰۰ میلی گرم از بافت کالوس با ۶/۵ میلی لیتر بافر تریس-HCl (۸/۸ pH، ۵۰ میلی مولار) حاوی بتا مرکاپتواتانول (۱۵ میلی مولار) درهاون سرد شده سائیده شد. سپس عصاره به دست آمده با دور ۵۰۰۰۰g به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی گراد

حجم نهایی واکنش، ۲۰ میکرو لیتر شامل ۴ میکرو لیتر مخلوط واکنش Evagreen، ۰/۵ میکرو لیتر برای هر کدام از پرایمرها، ۱ میکرو لیتر برای cDNA بود. برنامه دستگاه نیز به صورت: دناتوراسیون اولیه در دمای ۹۵ درجه (۱۵ دقیقه)، ۴۰ سیکل؛ دناتوراسیون اولیه در دمای ۹۵ درجه (۱۵ ثانیه)، اتصال اختصاصی پرایمر (۳۰ ثانیه) و بسط نهایی در دمای ۷۲ درجه (۲۰ ثانیه) بود. بیان ژن نسبی برای هر کدام از ژنهای مورد نظر نسبت به ژن کنترل داخلی اکتین با استفاده از روش $2^{-\Delta\Delta CT}$ مورد بررسی قرار گرفت.

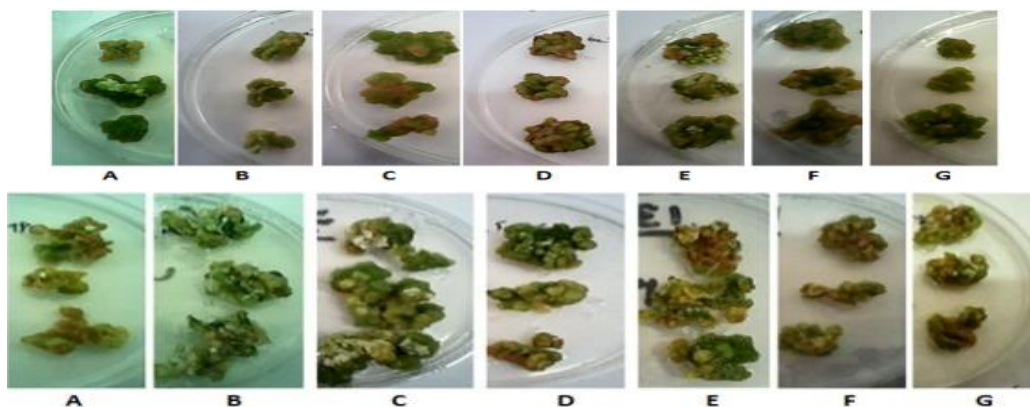
استخراج فلاونوئیدها و محتوای کوئرستین با استفاده از HPLC: ۰/۱ تا ۰/۵ گرم از کالوس های مورد نظر با ۱۰ میلی لیتر از محلول استخراج (متانول: اسید استیک: آب) با نسبت های (۱۰۰:۲:۱۰۰) ترکیب به مدت یک ساعت بر روی شیکر در دمای

نتایج

القای کالوس: اولین واکنش‌های به تشکیل کالوس در قطعات ریز نمونه، بعد از گذشت ۹ روز مشاهده و این فرآیند پس از گذشت ۶۶ روز (واکشت‌های متوالی) کامل شد (شکل ۱) تجزیه تحلیل داده‌ها نشان داد که نوع و غلظت‌های مختلف تنظیم‌کننده‌های رشد بر القای کالوس اختلاف معنی‌داری داشته است (جدول ۲). مقایسه میانگین داده‌ها نشان داد که بیشترین وزن خشک کالوس در غلظت ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر 2-4-D و ۱ میلی‌گرم در لیتر BAP برای ریز نمونه ساقه و غلظت ۰/۲۵ میلی‌گرم در لیتر 2-4-D و ۱ میلی‌گرم در لیتر BAP برای ریز نمونه برگ به دست آمد.

مقایسه حجم کالوس‌ها نشان می‌دهد که غلظت‌های ۰/۲۵ میلی‌گرم در لیتر 2-4-D و ۰/۲ تا ۱ میلی‌گرم در لیتر BAP در کالوس‌های به دست آمده از برگ و ساقه‌ها دارای بیشترین حجم کالوس بودند.

سانتریفوژ (Eppendorf 5804R Germany) و نهایت عصاره آنزیمی یا همان محلول رویی برای سنجش فعالیت آنزیم مورد استفاده قرار گرفت. در یک لوله آزمایش ۱ میلی‌لیتر از بافر استخراج به همراه ۰/۵ میلی‌لیتر ال-فینیل آلانین (۱۰ میلی‌مولار)، ۰/۴ میلی‌لیتر آب دوبار تقطیر و ۱ میلی‌لیتر عصاره آنزیمی مخلوط و به مدت یک ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد نگهداری گردید. واکنش با اضافه کردن ۰/۵ میلی‌لیتر اسیدکلریدریک (۶ مولار) پایان یافت. محصول بوجود آمده با ۱۵ میلی‌لیتر اتیل استات استخراج و سپس اتیل استات بخار گردید. ماده جامد باقیمانده در ۳ میلی‌لیتر هیدروکسید سدیم (۰/۰۵ مولار) حل شد و غلظت اسید سینامیک با اندازه‌گیری میزان جذب در طول موج ۲۹۰ نانومتر و با استفاده از فرمول $A=\epsilon bc$ به دست آمد و ضریب خاموشی معادل $M-1cm-1$ ۹۵۰۰ در نظر گرفته شد. یک واحد از فعالیت PAL معادل ۱ میکرومول از سینامیک اسید تولید شده در یک دقیقه می‌باشد.



شکل ۱: کالوس‌های تشکیل شده با استفاده از ترکیبات مختلف هورمونی. کالوس‌های مربوط به ریز نمونه‌های برگ در ردیف

بالا و ریز نمونه‌های ساقه در ردیف نمایش داده شده است. ترکیبات هورمونی شامل:

A: 0.25 mg L⁻¹ 2-4-D - 0.2 mg L⁻¹ BAP, B: 0.25 mg L⁻¹ 2-4-D - 0.5mg L⁻¹ BAP, C: 0.25 mg L⁻¹ 2-4-D - 1mg L⁻¹ BAP, D: 0.5 mg L⁻¹ 2-4-D - 0.2 mg L⁻¹ BAP, E: 0.5 mg L⁻¹ 2-4-D - 0.5 mg L⁻¹ BAP, F: 0.5 mg L⁻¹ 2-4-D - 1 mg L⁻¹ BAP, G: 1 mg L⁻¹ 2-4-D - 0.2 mg L⁻¹ BAP.

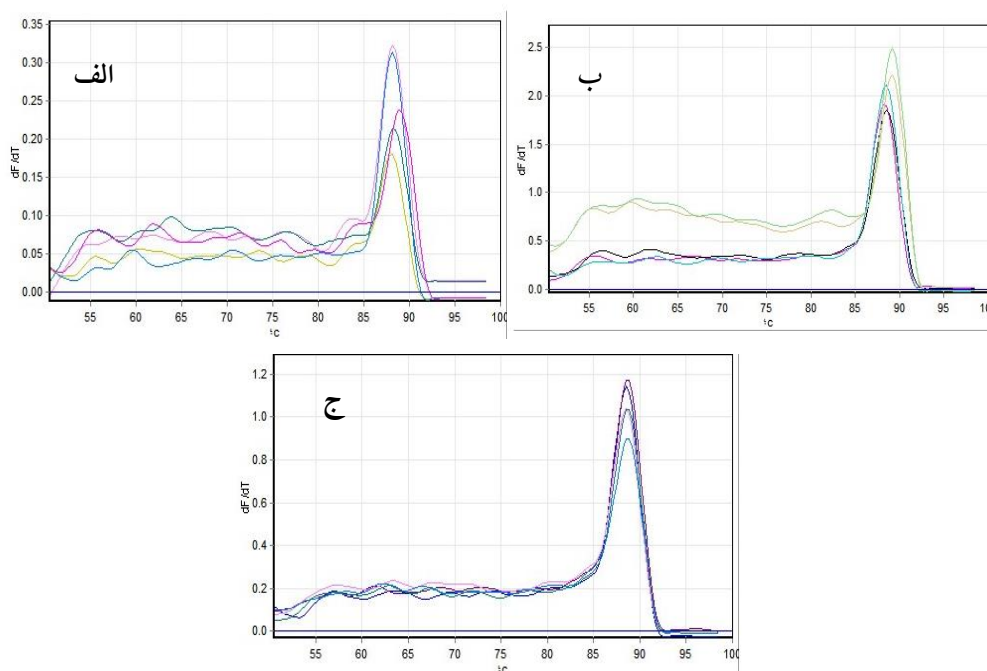
جدول ۲: آنالیز واریانس برای غلظت‌های مختلف BAP و 2-4-D برای وزن خشک کالوس‌های به‌دست‌آمده از برگ و ساقه در کشت کالوس گیاه *Momordica charantia*

ریز نمونه ساقه					ریز نمونه برگ				
میانگین مربعات			درجه آزادی	منبع	میانگین مربعات			درجه آزادی	منبع
درصد کالوس‌زایی	حجم کالوس	وزن خشک کالوس			درصد کالوس‌زایی	حجم کالوس	وزن خشک کالوس		
۶/۵۱۳۷**	۱۴/۰۱۰۷*	۰/۰۰۲۳۸۱۵۴**	۴	A	۷/۴۹۱۲**	۱۵۰/۷۴۲۴**	۰/۰۰۲۰۰۳۲۵**	۴	A
۷/۳۸۷۰۸*	۵۰/۶۴۳**	۰/۰۰۱۵۸۴۷۶**	۳	B	۸/۴۹۰۹*	۵۶/۹۰۲۴**	۰/۰۰۱۶۸۷۰۹**	۳	B
۲/۳۵۰۷**	۲۸۲/۷۳**	۰/۰۰۱۰۱۹۰۳**	۱۲	A*B	۲/۰۰۷۰۲**	۳۱۷/۶۸۲۴**	۰/۰۰۱۹۶۹۱۵**	۱۲	A*B

(BAP) = B, (2, 4-D) = A و * و ** معنی‌دار در سطح احتمال پنج و یک درصد

کنترل وجود دارد. منحنی‌های ذوب مرتبط با هر کدام از ژن‌های FLS، CHI و Actin ارائه شده توسط دستگاه در شکل (۲) آمده است.

بررسی بیان ژن‌های مورد نظر تحت تأثیر تیمارهای اشعه UV-B: میزان بیان ژن‌های مورد نظر تحت تأثیر اشعه UV اندازه‌گیری شد، نتایج نشان می‌دهد که اختلاف معنی‌داری در سطح بیان ژن‌ها با شرایط



شکل ۲: منحنی‌های ذوب به‌دست‌آمده در Real Time PCR برای ژن‌های الف: Actin، ب: FLS، ج: CHI در کشت کالوس گیاه *Momordica charantia*

UV-B و بررسی بیان در ۲۴ ساعت بعد از اعمال تیمار بیشترین نقش و اثر افزایشی داشته را بر روی ژن‌های مسیر بیوستز کوئرستین داشته است (جدول ۳).

از طرفی اختلاف معنی‌داری بین زمان اعمال تیمار با اشعه UV-B در سطح ۵ و ۱۰ دقیقه بر میزان بیان نسبی ژن FLS و CHI وجود داشته و مقایسه میانگین داده‌ها نشان داد که تیمار ۵ دقیقه در معرض اشعه

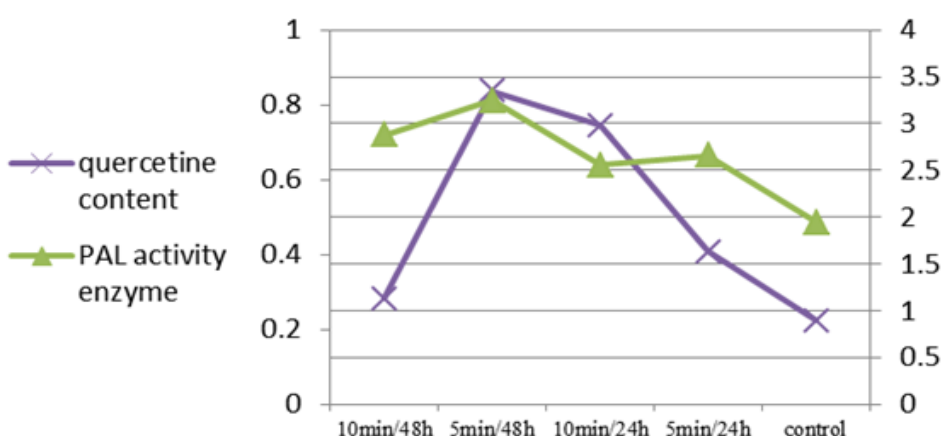
جدول ۳: مقایسه میانگین اثرات تیمارها در میزان بیان ژن‌های FLS و CHI در مسیر تولید کوئرستین در کشت کالوس گیاه *Momordica charantia*

میزان بیان نسبی ژن FLS	تیمار
۰/۰۵۹e	شاهد
۰/۶۴۹c	۵ دقیقه در معرض اشعه UV-B و بررسی بیان در ۲۴ ساعت بعد از اعمال تیمار
۲/۵۴b	۱۰ دقیقه در معرض اشعه UV-B و بررسی بیان در ۴۸ ساعت بعد از اعمال تیمار
۶/۴۵a	۵ دقیقه در معرض اشعه UV-B و بررسی بیان در ۲۴ ساعت بعد از اعمال تیمار
۰/۲۲۶d	۱۰ دقیقه در معرض اشعه UV-B و بررسی بیان در ۴۸ ساعت بعد از اعمال تیمار
میزان بیان نسبی ژن CHI	تیمارها
۰/۰۴۲e	شاهد
۰/۳۴۴c	۵ دقیقه در معرض اشعه UV-B و بررسی بیان در ۲۴ ساعت بعد از اعمال تیمار
۱/۷۵۶b	۱۰ دقیقه در معرض اشعه UV-B و بررسی بیان در ۴۸ ساعت بعد از اعمال تیمار
۲/۸۱a	۵ دقیقه در معرض اشعه UV-B و بررسی بیان در ۲۴ ساعت بعد از اعمال تیمار
۰/۱۱۷d	۱۰ دقیقه در معرض اشعه UV-B و بررسی بیان در ۴۸ ساعت بعد از اعمال تیمار

* میانگین‌های دارای حداقل یک حرف مشترک در هر ستون بر اساس آزمون LSD فاقد تفاوت معنی‌دار در سطح ۵ درصد می‌باشند

سنجش محتوای کوئرستین تحت تأثیر تیمارهای اشعه UV-B: محتوای کوئرستین در کالوس‌های تحت تأثیر تیمارهای اشعه UV-B دارای بیان متفاوتی بوده است. به طوری که میزان محتوای کوئرستین در زمان ۵ دقیقه اعمال تیمار اشعه UV-B نسبت به ۱۰ دقیقه و ۴۸ ساعت بعد از اعمال تیمار بیشتر شده است (شکل ۳). این می‌تواند نتیجه تأثیر اشعه UV-B بر روی بیان ژن‌های مسیر بیوسنتز فلاونوئیدها باشد.

سنجش فعالیت آنزیم PAL تحت تأثیر تیمارهای اشعه UV-B: تأثیر اشعه UV-B بر روی فعالیت آنزیم PAL نشان می‌دهد که ۵ و ۱۰ دقیقه تیمار با اشعه می‌تواند منجر به اختلاف معنی‌داری در تغییرات فعالیت آنزیم PAL نسبت به شرایط کنترل شود. اگرچه این افزایش فعالیت در زمان ۵ دقیقه نسبت به تیمار ۱۰ دقیقه محسوس‌تر بود و ۴۸ ساعت بعد از اعمال تیمار اشعه بیان ژن بیشتر شده است (شکل ۳).



شکل ۳: محتوای کوئرستین ($\mu\text{gg-1 dry weight}$)، فعالیت آنزیم PAL ($\text{unit/gr fresh weight}$)، در کشت کالوس گیاه *Momordica charantia* بعد از تیمار توسط اشعه UV-B: کنترل، ۵ دقیقه/۲۴ ساعت، ۱۰ دقیقه/۲۴ ساعت، ۵ دقیقه/۴۸ ساعت، ۱۰ دقیقه/۴۸ ساعت، (مدت زمان اشعه/ زمان برداشت نمونه بعد از تیماردهی).

بحث

در تعدادی از گونه‌های گیاهی، بالا رفتن میزان BAP می‌تواند باعث بهبود کالوس‌زایی گردد. بر اساس نتایج این تحقیق نیز مشخص شده که کمترین غلظت BAP در برابر غلظت بالاتر 2-4-D می‌تواند بالاترین کیفیت را نشان دهد. هورمون اکسین طبیعی در جوانه‌های گیاه تولید می‌شود، وجود همین اکسین طبیعی خود منجر به تولید کالوس در مقایسه با ساقه می‌گردد. پارامترهای اندازه‌گیری شده رشدی از جمله (وزن و حجم کالوس) در این مطالعه نشان می‌دهد که غلظت‌های دوم و سوم 2-4-D (۰/۲۵ و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر) در ترکیب با غلظت‌های دوم و سوم BAP (۰/۲ و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر) برای به دست آوردن بهترین کالوس‌ها در گیاه خیار تلخ مناسب می‌باشند. گزارش شده که بالاترین رشد القای کالوس را در کشت کدو به میزان ۹۴ و ۷۶ درصد بر روی ریز نمونه‌های برگ در محیط MS که شامل 2-4-D، با غلظت ۲ میلی‌گرم در لیتر، NAA با غلظت ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر و BAP با غلظت ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر شد. بالاترین میزان القای کالوس ۷۷ درصد، در ریز نمونه‌های کولئوپتیل بذر در غلظت ۴ میلی‌گرم در لیتر BAP در برابر ۰/۷۵ میلی‌گرم در لیتر NAA تولید شد، همچنین کالوس‌های القا شده در ریز نمونه‌های برگ در تیمار ۵ میلی‌گرم در لیتر 2-4-D باشد منجر به تولید جنین‌های گیاهی با میزان ۲۳ درصد شدند. کالوس‌های القا شده با استفاده از تیمار ۵ میلی‌گرم در لیتر BAP و ۱ میلی‌گرم در لیتر NAA می‌تواند منجر به تولید حدود ۱۲ درصد تا ۱۴ درصد جوانه شوند (Usman et al., 2011).

کالوس‌های ایجاد شده در کدو از ریز نمونه‌های هیپوکوتیل در کدو مدت ۷ روز در محیط کشت MS حاوی ۸۷/۶۴ میکرومولار ساکارز، ۰/۸ درصد آگار، ۳/۶۲ میکرومولار 2-4-D و ۲/۲۲ میکرومولار BAP،

رشد کردند که منجر به تولید جوانه شدند (Venkatachalam et al., 2018). همچنین ریز نمونه‌های هیپوکوتیل در گیاه *Cucumis sativus* نیز می‌توانند در مدت ۷ روز و در محیط کشت MS شامل ۸۷/۶۴ میکرومولار ساکارز، ۰/۸ درصد آگار، ۳/۶۲ میکرومولار 2-4-D، ۲/۲۲ میکرومولار BAP تولید جوانه را القاء کنند (Miguel and Alexandre, 2017). *Momordica dioxa* دارای بیشترین میزان القای کالوس (۸۰ درصد) با استفاده از ریز نمونه‌های برگ در محیط کشت MS، (۱ میلی‌گرم در لیتر 2-4-D، ۲ میلی‌گرم در لیتر BAP) است (Agarwal, 2015).

در تحقیقی (Huda and Sikdar, 2006) جهت کالوس‌زایی از جوانه انتهایی خیار تلخ به این نتیجه رسیدند که ۰/۰۵ میلی‌گرم در لیتر Kn و ۰/۱ میلی‌گرم GA₃ مناسب‌ترین هورمون جهت کالوس‌زایی بودند. جهت ریشه‌زایی مناسب‌ترین غلظت هورمونی را در یک میلی‌گرم در لیتر BA، ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر IBA و ۰/۳ میلی‌گرم در لیتر GA₃ نشان دادند. در تحقیقی (Agarwal and Kamal, 2004) مشخص شده است که غلظت‌های ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP، منجر به تولید میزان زیادی اندام هوایی در برابر کمترین میزان تولید کالوس می‌شود. در غلظت‌های بالاتر BAP، ساقه *M. Charantina* تحریک می‌گردد و از طرف دیگر منجر به القای متوسط کالوس می‌گردد. بر اساس مطالعات خاتمی و قناتی (Khatami and Ghanati, 2011) مشخص شده است که کشت کالوس در گیاه *Malva neglecta* که از ریز نمونه‌های برگ به دست آمده‌اند اگر تحت تأثیر اشعه UV-B-C قرار گیرند میزان ترکیبات جذب‌کننده اشعه از جمله فلاونوئیدها و آنتوسیانین‌ها و تانن‌ها اثرات مثبتی خواهند داشت که برای فلاونوئیدها و آنتوسیانین‌ها این افزایش به‌طور قابل ملاحظه‌ای وجود دارد. از طرف دیگر در مطالعات بر

در مطالعه‌ای که بر روی *Vitis vinifera* برای تولید *Trans-Resveratrol* در کشت کالوس مشخص شده است که بعد از القای تولید کالوس در محیط کشت B-5، تیمارهای اشعه UV با طول موج ۲۵۴ نانومتر بر روی کالوس‌های ۱۲ و ۱۵ روزه که به مدت ۱۰ و ۱۵ دقیقه اعمال شده‌اند، تیمارهای به مدت ۱۰ دقیقه که بعد از ۴۸ ساعت نمونه‌های آن‌ها برای فرآیند HPLC ارسال شده است دارای اثرات مناسبی بر روی تولید این متابولیت است (Keskin et al., 2009). در این تحقیق که بر روی کالوس‌های القاشده *Momordica charantia* انجام شده است تأثیر اشعه UV-B بر روی تولید کوئرستین به‌عنوان یکی از ترکیبات فلاونوئیدی مورد بررسی قرار گرفت، ملاحظه شد که در تیمار به مدت ۵ دقیقه که بعد از ۴۸ ساعت نمونه‌برداری از آن صورت گرفته است، بیشترین میزان تولید کوئرستین بود و با افزایش زمان تیماردهی به ۱۰ دقیقه بازم نسبت به شرایط کنترل افزایش تولید داشته‌ایم ولی نسبت به تیمار ۵ دقیقه که بعد از ۴۸ ساعت برداشت آن انجام شده است تأثیر به‌مراتب کمتری را نشان داده است.

فنیل آمونیاک‌ها، آنزیم کلیدی در متابولیسم *L-phenylalanine phenylpropanids* است که به ترانس-سینامیک اسید تبدیل می‌شود و مرحله اول در متابولیسم ترکیبات فنولیکی است. این مرحله بیوشیمیایی به‌عنوان یک مرحله کلیدی در شرایط دفاعی گیاه محسوب می‌گردد (Chang et al., 2008). مطالعات نشان می‌دهد که فعالیت PAL در بافت‌های رویشی برنج، ذرت و شلغم در برابر اشعه UV-B تحریک می‌شود (Seo et al., 2000). در گزارشی (Bijami et al., 2011) نشان داده شده که میزان فعالیت PAL به‌وسیله تیمار اشعه UV به مدت ۴ ساعت تحت تأثیر قرار می‌گیرد. در این مطالعه نیز مشخص شده است که میزان فعالیت حداکثری این

روی گیاه *Eurycoma Longofolia* نیز مشخص شده است که متابولیت‌های ثانویه از جمله آلکالوئیدها و ترپنوئیدها در کشت کالوس که تحت تأثیر اشعه UV قرار گرفته‌اند افزایش قابل ملاحظه‌ای را به نمایش گذاشته‌اند (Nicholas and Nicholas, 1997).

آنالیز پروفایل در تحقیق حاضر نشان داده است که پروتئین‌های درگیر در بیوسنتز متابولیت‌های ثانویه تحت تأثیر تحریک توسط اشعه UV قرار گرفته‌اند و در واقع در این روند رونویسی ژن‌های مرتبط با آنزیم‌های فرآیند بیوسنتز این ترکیبات تحت تأثیر قرار گرفته است، پروتئین‌هایی مثل FPP سنتاز، STD سنتاز، GPP سنتاز و اورنیتین کربوکسیلاز از جمله پروتئین‌های متأثر شده‌اند (Nicholas and Nicholas, 1997). در مطالعه‌ای دیگر بر روی *Vitis vinifera* نیز مشخص شده است که تولید متابولیت‌های ثانویه از جمله فنل‌ها، فلاونول‌ها، کانتین و فرولیک اسید تحت تأثیر اشعه UV قرار می‌گیرد، به‌طوری‌که بیشترین میزان تولید محصولات فنولیکی در تیمار ۵ دقیقه اشعه UV در صورتی که نمونه‌برداری بعد از ۲۴ ساعت صورت گیرد، از طرف دیگر در مورد محتوای فلاونولی نیز تیمار به مدت ۵ دقیقه و در زمان‌های برداشت ۲۴ و ۴۸ ساعت بعد از تیماردهی مؤثر بوده است (Cetin, 2014).

در تحقیق حاضر میزان نسبی بیان ژن‌های FLS و CHI که در مسیر تولید کوئرستین در ۵ دقیقه قرار گیری در معرض اشعه UV-B و بررسی بیان در ۲۴ ساعت بعد از اعمال تیمار بررسی و مشخص شد که به‌ترتیب ۶/۴۵ و ۳/۸۱ بیشتر شده است. در تحقیقی (Khatib et al., 2017) فعالیت آلفا گلوکوزیداز و کوئرستین حاصل از عصاره اتانلی خیار تلخ به‌ترتیب برابر ۳/۹۷ و ۰/۰۰۵۷ میلی‌گرم در میلی‌لیتر گزارش شده است.

تولید کوئرستین را داشته‌ایم به طوری که در شرایط تیمار ۵ دقیقه اشعه UV-B این امر اتفاق افتاده است و در بین دو ژن مورد مطالعه، بیان ژن FLS بیشتر تحت تأثیر قرار گرفته است.

نتیجه‌گیری نهایی

در تحقیق حاضر القای تولید کالوس از ریز نمونه برگ نسبت به ساقه بهتر انجام شد. بیان ژن‌های FLS و CHI در کالوس‌هایی که در ۲۴ ساعت بعد از اعمال تیمار ۵ دقیقه در معرض نور UV-B قرار گرفته بودند نسبت به شاهد بیشتر شده است. به عبارت دیگر نتایج این تحقیق نشان داد که افزایش بیان این ژن‌ها در کنار افزایش فعالیت آنزیم PAL می‌تواند منجر به افزایش محتوای کوئرستین در کشت کالوس گردد؛ بنابراین کالوس‌های تولید شده در گیاه *Momordica charantia* L. می‌توانند به‌عنوان منبع مناسبی برای القای تولید کوئرستین در شرایط آزمایشگاهی محسوب گردند.

سپاسگزاری

این مقاله مرتبط با طرح پژوهشی شماره ۹۳۰۱۰۰۸ بوده که هزینه آن توسط معاونت پژوهشی دانشگاه زابل تامین شده است.

References

1. Agarwal, M. 2015. Tissue culture of *Momordica charantia* L.: A review. *Journal of Plant Sciences*, 3(1-1): 24-32.
2. Agarwal, M. and Kamal, R. 2004. In vitro clonal propagation of *Momordica charantia* L. *Indian Journal of Biotechnology*, 3(3): 426-430.
3. Akula, R. and Ravishankar, G.A. 2011. Influence of abiotic stress signals on secondary metabolites in plants. *Plant Signal Behav*, 6(11): 1720-1731.
4. Azuma, A., Yakushiji, H., Koshita, Y. and Kobayashi, S. 2012. Flavonoid biosynthesis-related genes in grape skin

آنزیم در شرایطی که تیمار ۵ دقیقه اشعه UV-B و نمونه‌برداری از آن در ۴۸ ساعت بعد صورت گرفته است مشاهده شده است، البته در شرایطی که تیمار ۱۰ دقیقه‌ای نیز اعمال شده است افزایش فعالیت آنزیم را داشته‌ایم اما میزان حداکثر فعالیت در همان تیمار معرفی شده مشاهده شده است. و با توجه به نقش کلیدی این آنزیم در کنترل تولید ترکیبات فنولی در گیاهان می‌تواند به‌عنوان یک کاندید مناسب برای مهندسی متابولیت در گیاه *Momordica charantia* نیز مورد توجه قرار گیرد.

در تحقیقی (Azuma et al., 2012) مشخص شده است که تیمار نور منجر به افزایش تولید آنتوسیانین و افزایش بیان ژن‌های DFR, F35H, F3H, CHI, CHS و OMT در انگور می‌گردد. به نظرمی رسد که سطح فلاونول به تغییرات شرایط نوری در انگور حساس است و منجر به القای تجمع فلاونول‌ها همراه با افزایش بیان فلاونول سنتاز می‌شود. گزارش شده است که تیمار نوری در کولتیوارهای مختلف انگور از جمله Shiraz Merlot, Cabernet Sauvignon, Pione موجب افزایش بیان ژن FLS خواهد شد (Fujita et al., 2006; Koyama et al., 2012). در این مطالعه نیز میزان حداکثری بیان ژن‌های FLS و CHI در شرایطی صورت گرفته است که حداکثر میزان

are differentially regulated by temperature and light conditions. *Planta*, 236(4): 1067-1080.

5. Bijami, A., Rezanejad, F. and Sasan, H.A. 2011. The effects of post-harvest UV-B radiation on some antioxidant compounds, PAL activity and total protein contents of ripe red tomato (*Lycopersicon esculentum*). *Iranian Journal of Plant Biology*, 2(6): 29-38.
6. Cetin, E.S. 2014. Induction of secondary metabolite production by UV-C radiation in *Vitis vinifera* L. *Öküzgözü callus cultures*. *Biol Res*, 47(1): 37.

7. Chang, A., Lim, M.-H., Lee, S.-W., Robb, E.J. and Nazar, R.N. 2008. Tomato phenylalanine ammonia-lyase gene family, highly redundant but strongly underutilized. *Journal of Biological Chemistry*, 283(48): 33591-33601.
8. Chang, C.-C., Yang, M.-H., Wen, H.-M. and Chern, J.-C. 2002. Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. *Journal of food and drug analysis*, 10(3).
9. Chupeau, M.-C., Granier, F., Pichon, O., Renou, J.-P., Gaudin, V. and Chupeau, Y. 2013. Characterization of the early events leading to totipotency in an *Arabidopsis* protoplast liquid culture by temporal transcript profiling. *The plant cell*, 25(7): 2444-2463.
10. Cragg, G.M. and Newman, D.J. 2013. Natural products: a continuing source of novel drug leads. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1830(6): 3670-3695.
11. Daniel, P., Supe, U. and Roymon, M. 2014. A review on phytochemical analysis of *Momordica charantia*. *Int J Adv Pharm Biol Chem*, 3(1): 214-220.
12. Fang, E., Froetscher, L., Scheibye-Knudsen, M., Bohr, V. and Ng, T. 2018. Emerging antitumor activities of the bitter melon (*Momordica charantia*). *Current protein & peptide science*, 19(1): PMID:29932035.
13. Fazeli-Nasab, B. and Mirzaei, N. 2018. Evaluation of total phenol and flavonoid content in a wide range of local and imported plants. *Scientific Journal of Ilam University of Medical Sciences*, 26(2): 141-154.
14. Frohnmeyer, H. and Staiger, D. 2003. Ultraviolet-B radiation-mediated responses in plants. Balancing damage and protection. *Plant physiology*, 133(4): 1420-1428.
15. Fujita, A., Goto-Yamamoto, N., Aramaki, I. and Hashizume, K. 2006. Organ-specific transcription of putative flavonol synthase genes of grapevine and effects of plant hormones and shading on flavonol biosynthesis in grape berry skins. *Bioscience, biotechnology and biochemistry*, 70(3): 632-638.
16. Gandhi, P.R., Jayaseelan, C., Kamaraj, C., Rajasree, S.R. and Mary, R.R. 2018. In vitro antimalarial activity of synthesized TiO₂ nanoparticles using *Momordica charantia* leaf extract against *Plasmodium falciparum*. *Journal of Applied Biomedicine*, 16(4): 378-386.
17. Guo-li, W. 2008. Establishment of in vitro regeneration system of *Momordica charantia* L. with different genotype. *Journal of Anhui Agricultural Sciences*, 36(28): 12125-12127.
18. Huda, A. and Sikdar, B. 2006. In vitro plant production through apical meristem culture of bitter gourd (*Momordica charantia* L.). *Plant Tissue Culture and Biotechnology*, 16(1): 31-36.
19. Joseph, B. and Jini, D. 2013. Antidiabetic effects of *Momordica charantia* (bitter melon) and its medicinal potency. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*, 3(2): 93-102 (doi: 110.1016/S2222-1808(1013) 60052-60053).
20. Keskin, N., Kunter, B., Yaşı, Ü.K., Işım, U. and İnkübasyon, U. 2009. The effects of callus age, UV irradiation and incubation time on trans-resveratrol production in grapevine callus culture. *Tarım Bilimleri Dergisi*, 15(1): 9-13.
21. Khatami, F. and Ghanati, F. 2011. Effects of UV irradiation on cell viability, anthocyanin, and flavonoid contents of callus-cultured *Malva neglecta* cells. *ICLST*, 3: 202-204.
22. Khatib, A., Perumal, V., Ahmed, Q., Uzir, B. and Murugesu, S. 2017. Low inhibition of alpha-glucosidase and xanthine oxidase activities of ethanol extract of *Momordica charantia* fruit. *Journal of Pharmaceutical Negative Results*, 8(1): 20-24.
23. Koyama, K., Ikeda, H., Poudel, P.R. and Goto-Yamamoto, N. 2012. Light quality affects flavonoid biosynthesis in young berries of Cabernet Sauvignon grape. *Phytochemistry*, 78: 54-64.
24. Larkindale, J. and Knight, M.R. 2002. Protection against heat stress-induced oxidative damage in *Arabidopsis*

- involves calcium, abscisic acid, ethylene, and salicylic acid. *Plant physiology*, 128(2): 682-695.
25. Liu, M., Cao, B., Zhou, S. and Liu, Y. 2012. Responses of the flavonoid pathway to UV-B radiation stress and the correlation with the lipid antioxidant characteristics in the desert plant *Caryopteris mongolica*. *Acta Ecologica Sinica*, 32(3): 150-155.
 26. Lopes, A.P., Petenuci, M.E., Galuch, M.B., Schneider, V.V.A., Canesin, E.A. and Visentainer, J.V. 2018. Evaluation of effect of different solvent mixtures on the phenolic compound extraction and antioxidant capacity of bitter melon (*Momordica charantia*). *Chemical Papers*: 1-9.
 27. Manye., Y., Zhao., M., Lan., L. and Chen., F. 2004. Establishment of in vitro regeneration system of bitter melon (*Momordica charantia* L.). *Chinese Science and Technology Periodical Database*, 10(1): 44-48.
 28. Menghini, A., Capuccella, M., Mercati, V., Mancini, L. and Buratta, M. 1993. Flavonoid contents in *Passiflora* spp. *Pharmacological Research*, 27: 13-14.
 29. Miguel, F. and Alexandre, J. 2017. Estudios sobre regeneración y transformación genética en pepino (*Cucumis sativus* L.) vía *Agrobacterium tumefaciens* thesis, <https://doi.org/10.4995/Thesis/10251/90405>
 30. Mwambete, K. 2009. The in vitro antimicrobial activity of fruit and leaf crude extracts of *Momordica charantia*. A Tanzania medicinal plant. *African health sciences*, 9(1): 34-39.
 31. Nasr, N. and Pirani, G. 2016. A review of anti-oxidant effects of the ethanol extract of the medicinal plant carla (*Momordica charantia*) cultivated in northern region of Iran (mazandaran-simorgh city). *Biological Forum – An International Journal*, 8(1): 518-521.
 32. Negi, P.S. 2012. Plant extracts for the control of bacterial growth: Efficacy, stability and safety issues for food application. *International Journal of Food Microbiology*, 156(1): 7-17.
 33. Nicholas, K. and Nicholas, H. 1997. GeneDoc: A tool for editing and editing multiple sequence alignments. Distributed by the author.
 34. Perez, J.L., Jayaprakasha, G.K., Crosby, K. and Patil, B.S. 2019. Evaluation of bitter melon (*Momordica charantia*) cultivars grown in Texas and levels of various phytonutrients. *J. Sci. Food Agri.*, 99(1): 379-390.
 35. Raish, M., Ahmad, A., Ansari, M.A., Alkharfy, K.M., Aljenoobi, F.I., Jan, B.L., Al-Mohizea, A.M., Khan, A. and Ali, N. 2018. *Momordica charantia* polysaccharides ameliorate oxidative stress, inflammation, and apoptosis in ethanol-induced gastritis in mucosa through NF-kB signaling pathway inhibition. *Int. J. Biol. Macromol.*, 111: 193-199.
 36. Rao, C.V. 2018. Immunomodulatory Effects of *Momordica charantia* Extract in the Prevention of Oral Cancer. *Cancer Prev. Res. (Phila)*, 11(4): 185-186.
 37. Saahithya, R., Sridhar, R., Hemalatha, S. and Sriram, P. 2018. Haematological changes in experimentally induced pancreatic atypical acinar cell tumor in male wistar rats and its alleviation by *Momordica charantia*. *The Pharma Innovation Journal*, 7(4): 1054-1105.
 38. Seo, S.H., Bai, D.G. and Park, H.Y. 2000. High Frequency Shoot Regeneration from Leaf Explants of Cucumber. *Journal of Plant Biotechnology*, 2(1): 51-54.
 39. Singh, A., Selvi, M.T. and Sharma, R., 1999. Sunlight-induced anthocyanin pigmentation in maize vegetative tissues. *Journal of Experimental botany*, 50(339): 1619-1625.
 40. Sobhanizade, A., Solouki, M. and Fazeli-Nasab, B. 2017. Optimization of callus induction and effects of biological and non-biological elicitors on content of phenol/flavonoid compounds in *Nigella sativa* under in-vitro conditions. *Cell and Tissue Journal*, 8(2): 165-184.
 41. Tûmová, L. and Tûma, J. 2011. The effect of UV light on isoflavonoid production in *Genista tinctoria* culture in vitro. *Acta Physiologiae Plantarum*, 33(2): 635-640.
 42. Usman, M., Hussain, Z. and Fatima, B. 2011. Somatic embryogenesis and shoot

- regeneration induced in cucumber leaves. Pak J Bot, 43(2): 1283-1293.
43. Venkatachalam, P., Jinu, U., Sangeetha, P., Geetha, N. and Sahi, S.V. 2018. High frequency plant regeneration from cotyledonary node explants of *Cucumis sativus* L. cultivar 'Green Long' via adventitious shoot organogenesis and assessment of genetic fidelity by RAPD-PCR technology. 3 Biotech, 8(1): 60.
44. Viridi, J., Sivakami, S., Shahani, S., Suthar, A., Banavalikar, M. and Biyani, M. 2003. Antihyperglycemic effects of three extracts from *Momordica charantia*. J. Ethnopharmacol., 88(1): 107-111.
45. Wach, A., Pyrzyńska, K. and Biesaga, M. 2007. Quercetin content in some food and herbal samples. Food chemistry, 100(2): 699-704.
46. Yan, J.-K., Wu, L.-X., Qiao, Z.-R., Cai, W.-D. and Ma, H. 2019. Effect of different drying methods on the product quality and bioactive polysaccharides of bitter melon (*Momordica charantia* L.) slices. Food chemistry, 271: 588-596.

Optimization callus induction and Study of FLS and CHI gene expression in quercetin biosynthesis pathway in callus culture with UV-B radiation of *Momordica charantia* L.

Fooladvand, Z.¹, Fazeli-Nasab, B.^{2*}

¹Ph.D. Student., Dept. of Molecular Genetic, Faculty of Science, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

²Coach, Department of Agronomy and Plant Breeding, Faculty of Agricultural, University of Zabol, Zabol, Iran

Received: 2018-9-29 Accepted: 2018-11-30

Abstract

Quercetin is one of the most natural secondary metabolites, which found in fruits and leaves of *Momordica charantia* and characterized as an antioxidant, antiviral and anticancer compound. The present study aimed to optimize the callus induction and to determine the expression of flavonol synthase and chalcone isomerase genes in the pathway of quercetin production under UV-B rays in bitter cucumber callus cultivation. The experiment was conducted in 2018 at Agricultural Biotechnology Institute of Zabol University. In this research different concentrations of plant hormones ((2, 4-D (0, 0.25, 0.5, 1 and 5 mg/L) and BAP (0.2, 0.5, 1 and 5 mg/L)) and explant (Leaf and Stem) was used to callus induction in *Momordica charantia* using complete random design with three replications. Effect of UV-B radiation in five groups: control, natural light, 5 min exposure (gene expression at 24 and 48 after treatment) and 10 min exposure (gene expression at 24 and 48 after treatment)) on the expression of quercetin biosynthetic pathway genes including flavonol synthase (FLS) and chalcone isomerase (CHI) (by $2^{-\Delta\Delta CT}$ method), phenyl ammonia-lyase (PAL) antioxidant activity (by cinnamic acid concentration), and flavonoid content (by HPLC method)) in the selected best calluses. Analysis of variance were showed that different types and concentrations of plant hormones had difference significant on callus induction. Mean square of data showed that the most callus dry weight was obtained from 0.5 mg/L 2,4-D and 1 mg/L BAP for stem explant. The highest expression of FLS and CHI were observed within 24 hours after 10-min UV-B treatment, but it decreased at 48 h after treatment. The highest expression of PAL, quercetin and flavonoid were obtained within 48 hours after 5-min UV-B treatment. Comparison of irradiated and untreated calluses revealed that the average changes of relative expression of FLS and CHI were 1.4 and 2.4 times higher than control, respectively. Overall, the results were showed that UV-B radiation at the callus level had a positive effect on the expression of flavonoids biosynthetic pathway genes.

Keywords: BAP, Flavonoid, FLS, Quercetin, *Momordica charantia*, 2, 4-D

*Corresponding author; bfazeli@uoz.ac.ir