Iranian Journal of Horticultural Science
Vol 52, No 1, Spring 2021 (1-10)
DOI: 10.22059/ijhs.2019.263384.1496

علوم باغبانی ایران
دورهٔ ۵۲، شمارهٔ ۱، بهار ۱۴۰۰ (ص ۱۰-۱)

اثر سالیسیلیک‌اسید و متیل جاسمونات بر تولید فنل، فلاونوئید و رنگدانه‌های کالوس گیاه پروانش (*Catharanthus roseus* L.)

عطیه نیازآذری[۱]، ویدا چالوی[۲*] و سارا کبیرنتاج[۱]
۱ و ۲. دانش‌آموخته کارشناسی ارشد و دانشیار، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ساری، ایران
(تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۶/۱۷ - تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۹/۸)

چکیده

محرک‌های غیر زیستی سالیسیلیک‌اسید (SA) و متیل جاسمونات (MJ) می‌توانند سبب افزایش تولید متابولیت‌های ثانویه گیاهان شوند. در این پژوهش، اثر SA و MJ بر وزن تر، میزان فلاونوئید، فنل کل و رنگدانه‌های کالوس پروانش در دو آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی مطالعه شد. فاکتور اول در هر آزمایش غلظت محرک غیرزیستی SA یا MJ در چهار سطح صفر، ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میکرومولار و فاکتور دوم، مدت زمان استفاده از غلظت‌های مختلف محرک‌ها در دو سطح ۵ و ۱۰ روز بود که هر دو آزمایش با سه تکرار انجام شدند. بر اساس نتایج اثر متقابل زمان و SA بر کلیه صفات، به‌غیر از وزن تر کالوس و آنتوسیانین، معنی‌دار شد و اثر متقابل زمان و MJ بر میزان فنل کل، کلروفیل و کاروتنوئید معنی‌دار گردید (P<۰/۰۱). بیشترین میزان فنل کل (۵۵/۱۲۳ میلی‌گرم در گرم وزن تر) مربوط به تیمار ۱۰۰ میکرومولار MJ در ۵ روز بود و بیشترین میزان فلاونوئید (۲۱/٤٦٧ میلی‌گرم در گرم وزن تر) در تیمار ۵۰ میکرومولار SA در ۵ روز به‌دست آمد. بنابراین، غلظت‌های ۵۰ و ۱۰۰ میکرومولار محرک‌های غیرزیستی SA و MJ در ۵ روز می‌توانند برای افزایش میزان فلاونوئید و فنل کل کالوس پروانش مورد استفاده قرار گیرند.

واژه‌های کلیدی: آنتوسیانین، کاروتنوئید، کلروفیل، گیاه دارویی.

Effect of salicylic acid and methyl jasmonate on production of phenol, flavonoid and pigments of Madagascar periwinkle (*Catharanthus roseus* L.) callus

Atiyeh Niyazazari[1], Vida Chalavi[2*] and Sara Kabirnataj[1]
1, 2. M. Sc. Graduate and Associate Profesosr, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University, Sari, Iran
(Received: Sep. 08, 2019 - Accepted: Nov. 29, 2019)

ABSTRACT

Salicylic acid (SA) and methyl jasmonate (MJ) are abiotic elicitors which can increase production of secondary metabolites in plants. Effects of SA and MJ on fresh weight, flavonoids, total phenol and pigments of Madagascar periwinkle callus were investigated in two factorial experiments, in a completely randomized design. The first factor was the concentration of a different abiotic elicitor, SA or MJ in 4 levels of 0, 50, 100 and 200 µM, and the second factor was time of using different concentrations of elicitors at 2 levels of 5 and 10 days, with three replications. Based on results, the interaction between time and SA in all traits, unless fresh weigh of callus and production of anthocyanin, was significant and the interaction between time and MJ on total phenol, chlorophyll and carotenoids production was significant (P<0.01). The highest total phenol content (55.123 mg/g F.W.) was obtained from 100 µM MJ treatment for 5 days and the highest amount of flavonoid (21.467 mg/g F.W.) was obtained in 50 µM SA treatment for 5 days. Therefore, 50 and 100 µM concentrations of SA and MJ abiotic elicitors in 5 days can be used for increase the production of flavonoid and total phenol in *catharanthus roseus* L. callus.

Keywords: Anthocyanin, carotenoids, chlorophyll, medicinal plant.

* Corresponding author E-mail: v.chalavi@sanru.ac.ir

علوم باغبانی ایران
دورۀ ۵۲، شمارۀ ۱، بهار ۱۴۰۰ (ص ۱۰-۱)

Iranian Journal of Horticultural Science
Vol 52, No 1, Spring 2021 (1-10)
DOI: 10.22059/ijhs.2019.263384.1496

مقدمه

پروانش (*Catharanthus roseus* L.) از تیره خرزهره (Apocynaceae)، بومی مناطق گرمسیری و نیمه‌گرمسیری است (Talebi *et al*., 2011) که نه تنها به عنوان یک گیاه زینتی کاشته می‌شود، بلکه به دلیل داشتن بیش از ۱۳۰ نوع آلکالوئید ایندولی ترپنوئیدی، یک گیاه دارویی مهم هم به حساب می‌آید. به عنوان مثال در برزیل دم‌کرده برگ این گیاه برای بهبود زخم‌های مزمن، کمبود ویتامین C و همچنین به عنوان شستشو دهنده دهان و دندان استفاده می‌شود و در بریتانیا برای درمان دیابت و زخم معده به کار می‌رود (Mishra & Verma, 2017).

محرک‌های زیستی و غیرزیستی در چرخه تولید متابولیت‌های ثانویه نقش‌های مهمی دارند و می‌توان از آنان در شرایط درون‌شیشه‌ای برای افزایش متابولیت‌های ثانویه استفاده نمود (Fang *et al*., 1999). سالیسیلیک‌اسید و متیل جاسمونات از جمله محرک‌های غیرزیستی می‌باشند، که به عنوان دو تنظیم‌کننده رشد گیاهی در رشد و نمو گیاه نقش حیاتی دارند و همچنین به هنگام ایجاد تنش در گیاه با القای بیوسنتز متابولیت‌های ثانویه نقش دفاعی ایفا می‌کنند (Tanouri *et al*., 2014).

سالیسیلیک‌اسید یکی از ترکیب‌های فنلی است که دارای یک حلقه آروماتیک با گروه هیدروکسیل می‌باشد که در گیاهان یافت می‌شود و استفاده از آن به عنوان یک محرک بیرونی، به‌طور گسترده‌ای در فرآیندهای گیاهی اثر می‌گذارد (Chaichana & Srisulak, 2012). متیل جاسمونات و مشتقات آن از خانواده اکسی‌لیپین از ترکیبات لیپیدی مشتق شده‌اند که در فرآیندهای گیاهی مانند رشد و نمو دخالت دارند (Chaichana & Srisulak, 2012). نوع محرک غیرزیستی بر میزان القای متابولیت‌های ثانویه و رنگدانه‌های کالوس اثر دارد. به‌طور مثال، متیل‌جاسمونات نسبت به سالیسیلیک‌اسید هایپرسین بیشتری را در گیاه گل راعی (*Hypericum perforatum* L, Zamani *et al*., 2019; Rajabi *et al*., 2016) ایجاد نمود. در آزمایش دیگر، متیل جاسمونات نسبت به محرک غیرزیستی سالیسیلیک‌اسید، سبب افزایش مقدار متابولیت ثانویه نورآدرنالین در نمونه‌های گیاه خرفه (*Portulaca oleracea* L.) شد (Pirian & Piri, 2012). در پژوهشی که روی گیاه کنگر فرنگی (*Cynara scolymus* L.) انجام گرفت، مشاهده شد که محرک غیرزیستی سالیسیلیک‌اسید رنگدانه‌های کلروفیل a، b و کلروفیل کل را نسبت به متیل جاسمونات بیشتر افزایش داد (Tanouri *et al*., 2014). بنابراین تأثیرگذاری محرک غیرزیستی بستگی به نوع گیاه و همچنین نوع متابولیت ثانویه دارد.

افزون بر نوع محرک غیرزیستی، غلظت‌های مختلف آن‌ها هم در تولید و القای متابولیت‌های ثانویه درگیاهان اثر دارند. آنتوسیانین‌ها رنگدانه‌های گیاهی محلول در آب هستند که در گیاه به‌صورت رنگ‌های قرمز مایل به زرد تا آبی ظاهر می‌شوند؛ آنتوسیانین‌ها علاوه بر اینکه در رژیم غذایی بشر وجود دارند، به عنوان رنگ مصنوعی قرمز و مصارف دارویی هم اهمیت دارند که تجمع‌شان در گل‌ها، میوه‌ها، برگ‌ها و بافت‌های ذخیره‌ای بسیاری از گیاهان مشاهده شده است (Ram *et al*., 2013). هم‌چنین، جهت افزایش آنتوسیانین در گیاهان، پژوهش‌هایی انجام شده است. به عنوان مثال در غلظت ۱۰۰ میکرومولار متیل جاسمونات، افزایش معنی‌دار مقدار آنتوسیانین در ریشه گیاه همیشه بهار (*Calendula officinalis* L.) مشاهده شد؛ درحالی‌که در غلظت ۵۰ میکرومولار متیل جاسمونات، بیشترین مقدار فلاونوئید تولید گردید (Ghanati *et al*., 2010). در آزمایش دیگری در گیاه چای کوهی (*Stachys lavandulifolia* Vahi) مشاهده شد که از بین غلظت‌های ۱۰، ۵۰ و ۱۰۰ میکرومولار سالیسیلیک‌اسید، غلظت ۵۰ میکرومولار بیشترین میزان فنل کل را تولید نمود (Mehrabani *et al*., 2012). بهینه‌بودن غلظت ۵۰ میکرومولار سالیسیلیک‌اسید در تولید فنل کل در کشت سلولی شنبلیله (*Trigonella foenum graecum* L.) هم مشاهده شد؛ به‌طوری‌که با افزایش غلظت - سالیسیلیک‌اسید از ۱۲/۵ تا ۵۰ میلی‌گرم در لیتر،

* Corresponding author E-mail: v.chalavi@sanru.ac.ir

افزایش میزان فنل کل مشاهده شد (Esmaeilzadeh & Rezaei, 2013). به‌طور کلی، تأثیر غلظت محرک غیرزیستی بستگی به نوع گیاه و محرک دارد.

علاوه بر نوع و غلظت محرک غیرزیستی، مدت زمان قرار گرفتن کالوس‌ها در محیط‌های کشت دارای محرک‌ها، در تولید و القای متابولیت‌های ثانویه مؤثر واقع می‌شود، به‌طور مثال دیده شده است که افزایش مدت زمان از یک به دو هفته در استفاده از غلظت‌های مختلف محرک‌های متیل جاسمونات و سالیسیلیک‌اسید، در برخی از غلظت‌های کاربردی باعث کاهش تولید آلکالوئید کل شد (Chaichana & Srisulak, 2012). در بررسی دیگری مشاهده شد که میزان فنل کل در کالوس گیاه چای کوهی ۱۰ روز پس از قرار گرفتن در محیط دارای محرک، بیشتر از مدت زمان ۲۰ روز بود (Mehrabani *et al*., 2012). اثر محرک‌های غیرزیستی در گیاه پروانش (*Catharanthus roseus* L.) هم مورد بررسی قرار گرفته است. به‌طور مثال در آزمایشی مشاهده شد که کاربرد ۱۰۰ میکرومولار متیل‌جاسمونات، تفاوت معنی‌داری را در مقدار متابولیت‌های ثانویه ویندولین، کاتارانتین و وین‌بلاستین در زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت ایجاد نکرد، ولی در استفاده از ۱۰۰ میکرومولار سالیسیلیک اسید مشاهده شد که مدت زمان ۲۴ ساعت افزایش معنی‌داری را در مقدار ترکیبات مورد اشاره نسبت به زمان‌های ۴۸ و ۷۲ ساعت ایجاد نمود (Pan *et al*., 2010).

کشت بافت گیاهی یکی از بهترین روش‌های تکثیر گیاهان دارویی از جمله پروانش می‌باشد. این روش دارای برتری‌هایی مانند تولید انبوه، یکنواخت و عاری از هر گونه آلودگی در تمام طول سال می‌باشد. از آنجایی‌که گیاه پروانش یکی از گیاهان مهم دارویی است و ترکیب‌های فنل و فلاونوئید این گیاه کاربردهای فراوانی در صنایع داروسازی دارند، هدف این پژوهش، مطالعه اثر غلظت‌های گوناگون و مدت زمان تماس با سالیسیلیک‌اسید و متیل جاسمونات بر میزان تولید فنل کل، فلاونوئید و رنگدانه‌های کالوس گیاه پروانش است.

مواد و روش‌ها

این پژوهش در سال ۱۳۹۶ در آزمایشگاه علوم باغبانی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری به‌صورت دو آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی انجام گرفت که فاکتور اول در هر آزمایش، محرک غیرزیستی سالیسیلیک‌اسید یا متیل جاسمونات در چهار سطح صفر، ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میکرومولار و فاکتور دوم، مدت زمان استفاده از غلظت‌های مختلف MJ و SA بر کالوس‌ها در محیط کشت MS جامد در دو سطح ۵ و ۱۰ روز بود که با سه تکرار مورد مطالعه قرار گرفت.

جهت تهیه کالوس پروانش، ابتدا بذرهای تهیه شده از شرکت پاکان بذر اصفهان به‌مدت ۱۰ دقیقه در محلول هیپوکلریت سدیم ۵۰٪ با غلظت ۵٪ کلر فعال حاوی ۱۰٪ توین ۸۰ ضدعفونی گردیده و سپس ۵ مرتبه در زیر هود با آب مقطر استریل شست‌وشو داده شد. به‌منظور جوانه‌زنی بذرها و همچنین رشد گیاهچه‌ها از محیط‌های کشت موراشیگ و اسکوگ (MS) (Murashige & Skoog, 1962) بدون تنظیم‌کننده رشد گیاهی استفاده گردید. بعد از جوانه‌زنی بذرها و رشد مناسب گیاهچه‌ها که یک ماه و نیم زمان برد، ریزنمونه‌های برگ به اندازه ۱ سانتی‌متر مربع تهیه و جهت القا و رشد مناسب کالوس به‌مدت ۷ هفته در محیط کشت MS دارای ۲ میلی‌گرم در لیتر تنظیم‌کننده رشد گیاهی نفتالین استیک اسید (NAA) نگهداری شدند. در نهایت کالوس‌های به‌دست‌آمده، در محیط‌های کشت MS جامد دارای غلظت‌های گوناگون سالیسیلیک‌اسید و متیل‌جاسمونات، به‌مدت ۵ و ۱۰ روز نگهداری شدند و اندازه‌گیری‌های این کالوس‌ها بعد از هر کدام از مدت زمان‌های ۵ و ۱۰ روز انجام شد. تمام مراحل این آزمایش در دمای ۲±۲۵ درجه سانتی‌گراد و شرایط نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی انجام شد.

اندازه‌گیری وزن تر کالوس‌ها با استفاده از ترازوی دیجیتال انجام شد و تعیین مقدار کلروفیل و کاروتنوئید بر طبق روش Goncalves *et al.* (2009) انجام گرفت. برای تعیین مقدار رنگدانه‌ها، ۰/۲۵ گرم کالوس تر از هر تکرار در حضور ۵ میلی‌لیتر استون در هاون چینی کاملاً ساییده شدند و سپس نمونه‌ها

به‌مدت ۶ دقیقه در ۶۰۰۰ دور سانتریفیوژ گردیدند. مقدار جذب محلول شفاف رویی توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر در طول موج‌های۴۸۰ ، ۵۱۰، ۶۴۵ و ۶۶۳ نانومتر قرائت شد و اعداد قرائت شده جهت تعیین مقدار کلروفیل a، b، کل و کاروتنوئید در رابطه‌های (۱) تا (۴) قرار گرفتند:

Chlo a (mg/g.F.W) = (رابطه ۱)
12.7(A663) - 2.69(A645) * V/1000 * W

Chlo b (mg/g.F.W) = (رابطه ۲)
22.9(A645) - 4.68(A663) * V/1000 * W

Chlo total (mg/g.F.W) = (رابطه ۳)
20.2(A645) + 8.02 (A663) * V/1000 * W

Car (mg/g.F.W) = (رابطه ۴)
7.6(A480) – 1.49(A510) * V/1000 * W

در این رابطه‌ها، A: طول موج، V: حجم محلول نهایی و W: وزن نمونه است.

مقدار فلاونوئید با استفاده از روش آلومینیوم کلرید بر حسب میلی‌گرم در گرم وزن تر (Keshavarz *et al.*, 2015) اندازه‌گیری شد. برای اندازه‌گیری فلاونوئید، ۰/۱ گرم از بافت کالوس با ۱ میلی‌لیتر متانول ۸۰٪ در حضور نیتروژن مایع ساییده شد و به‌مدت ۵ دقیقه در ۱۲۰۰۰ دور سانتریفیوژ گردید. از محلول شفاف رویی به عنوان عصاره در تعیین میزان فلاونوئید استفاده شد. جذب نمونه‌ها با استفاده از دستگاه اسپکتروفوتومتر در طول موج ۵۱۰ نانومتر قرائت گردید که این اعداد برای تعیین میزان فلاونوئید، به جای Y در رابطه (۵) قرار گرفتند.

$Y = 0.03X – 0.002$ (رابطه ۵)

میزان فنل کل با استفاده از روش Singleton *et al.* (1999) محاسبه شد. روش تهیه عصاره جهت سنجش میزان فنل کل، مشابه روش تهیه عصاره برای تعیین میزان فلاونوئید بود. جذب نمونه‌ها با استفاده از دستگاه اسپکتروفوتومتر در طول موج ۷۶۰ نانومتر قرائت شد که این اعداد برای تعیین میزان فنل کل، به جای Y در رابطه (۶) قرار گرفتند.

$Y = 0.0213X + 0.0016$ (رابطه ۶)

سنجش مقدار آنتوسیانین با استفاده از روش Wagner (1979) انجام شد. به این صورت که ۰/۵ گرم از بافت کالوس در هاون چینی با ۵ میلی‌لیتر متانل اسیدی (متانل خالص و اسیدکلریدریک خالص به نسبت حجمی ۹۹ به ۱) کاملاً ساییده و در فالکون‌های درپوش‌دار ۱۰ میلی‌لیتری ریخته شدند. فالکون‌های حاوی نمونه‌ها به‌مدت ۲۴ ساعت در تاریکی و در یخچال نگهداری شدند. سپس نمونه‌ها به‌مدت ۱۰ دقیقه در دور g ۴۰۰۰ سانتریفیوژ گردیدند. از محلول شفاف رویی برای قرائت در طول موج ۵۵۰ نانومتر استفاده شد. جهت تعیین مقدار آنتوسیانین، اعداد قرائت‌شده توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر به جای A در رابطه (۷) قرار گرفتند.

$A = ebc$ (رابطه ۷)

در این رابطه، A: عدد قرائت شده توسط دستگاه اسپکتروفومتر، e: ضریب خاموشی برابر با M^{-1} cm^{-1} ۳۳۰۰۰، b: عرض کووت برابر cm ۱ و c: مقدار آنتوسیانین است.

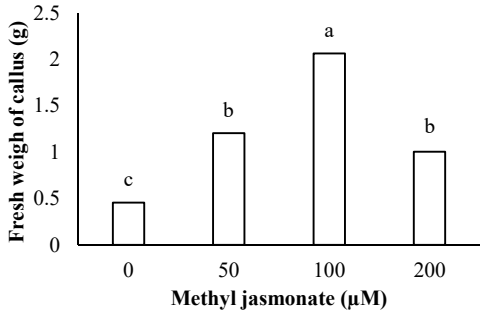
تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار آماری SAS و مقایسه میانگین از طریق آزمون LSD در سطح احتمال ۱ درصد انجام گرفت.

نتایج و بحث

وزن تر کالوس

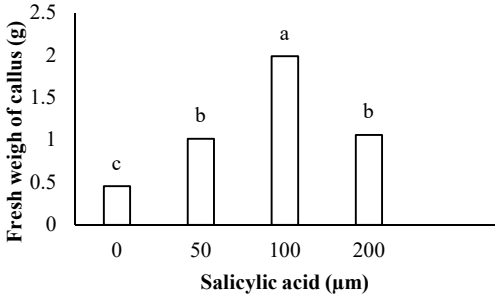
بر اساس نتایج به‌دست آمده از این آزمایش، اولین القای کالوس ریزنمونه‌های برگ گیاه دارویی پروانش در ۱۱ روز بعد از کشت مشاهده شد و همه ریزنمونه‌ها تا ۱۸ روز بعد از کشت، کالوس‌دهی کرده بودند. ۷ هفته بعد از کشت، کالوس‌ها رشد مناسبی داشتند و جهت انتقال به محیط‌های کشت MS دارای محرک‌های غیر زیستی سالیسیلیک‌اسید و متیل جاسمونات آماده بودند. اثر متقابل غلظت‌های گوناگون هر دو نوع محرک با مدت زمان تماس با محرک‌ها و زمان به تنهایی تأثیری بر وزن تر کالوس نداشتند، ولی اثر غلظت محرک‌های سالیسیلیک‌اسید و متیل جاسمونات بر وزن تر کالوس در سطح ۱ درصد معنی‌دار شد (جدول‌های ۱ و ۲) که بیشترین وزن تر (۲/۰۶۵ گرم) مربوط به تیمار ۱۰۰ میکرومولار متیل جاسمونات (شکل ۱) و بعد از آن مربوط به تیمار ۱۰۰

میکرومولار سالیسیلیک‌اسید (۱/۹۹ گرم) بود (شکل ۲). کمترین وزن تر کالوس (۰/۴۵۶ گرم) مربوط به تیمار شاهد بود (شکل‌های ۱ و ۲). احتمالاً ازآنجایی‌که رشد کالوس این گیاه در محیط کشت MS دارای تنظیم‌کننده رشد گیاهی NAA و بدون محرک غیر زیستی با سرعت زیادی انجام نمی‌شد، پس فاصله زمانی ۵ روز نتوانست تأثیر افزایشی بر رشد کالوس و در نتیجه وزن تر آن داشته باشد. در پژوهشی مشاهده نمودند که با افزایش غلظت متیل جاسمونات از ۱۰ به ۲۰ و ۳۰ میکرومولار، وزن تر کالوس افزایش یافت (Wang *et al*., 2015) که این نتیجه با نتایج حاصل از این آزمایش که وزن تر کالوس با افزایش غلظت متیل جاسمونات از ۵۰ به ۱۰۰ میکرومولار افزایش یافت همسو می‌باشد. به مانند نتایج این آزمایش، در پژوهش دیگری هم دیده شد که استفاده از غلظت‌های مختلف سالیسیلیک‌اسید، سبب افزایش وزن تر کالوس در مقایسه با تیمار شاهد گردید (Ram *et al*., 2013).



شکل ۱. مقایسه میانگین اثر متیل جاسمونات بر وزن تر کالوس پروانش.

Figure 1. Mean comparison effect of methyl jasmonate on fresh weigh of *Catharanthus roseus* L. callus.



شکل ۱. مقایسه میانگین اثر سالیسیلیک‌اسید بر وزن تر کالوس پروانش.

Figure 2. Mean comparison effect of salicylic acid effect on fresh weigh of *Catharanthus roseus* L. callus.

کلروفیل

مدت زمان، غلظت محرک‌های سالیسیلیک‌اسید و متیل جاسمونات و اثر متقابل مدت زمان با محرک‌ها بر مقدار کلروفیل a، b و کل تفاوت معنی‌داری را نسبت به تیمار شاهد نشان دادند (جدول‌های ۱ و ۲). به‌طوری‌که تیمار شاهد در ۱۰ روز بیشترین مقدار کلروفیل a (۸۶/۶ میکروگرم در گرم وزن تر)، b (۱۴۹/۵ میکروگرم در گرم وزن تر) و کل (۲۳۳/۷ میکروگرم در گرم وزن تر) را نشان داد (جدول‌های ۳ و ۴) و کمترین مقدار کلروفیل a (۱/۳ میکروگرم در گرم وزن تر) و کلروفیل کل (۳/۹ میکروگرم در گرم وزن تر) مربوط به کالوس‌های موجود در محیط کشت دارای ۱۰۰ میکرومولار سالیسیلیک‌اسید در ۵ روز بود (جدول۳). کمترین مقدار کلروفیل b (۰/۲ میکروگرم در گرم وزن تر) هم مربوط به غلظت ۲۰۰ میکرومولار سالیسیلیک‌اسید در ۵ روز بود (جدول ۳). در پژوهش‌هایی روی کالوس کنگر فرنگی هم نشان داده شد که با افزایش غلظت سالیسیلیک‌اسید از ۵۰ به ۱۰۰ میکرومولار، مقدار کلروفیل a کاهش یافت (Tanouri *et al*., 2014; Babel *et al*., 2014). بیشتربودن مقدار کلروفیل a، b و کل در تیمار شاهد نسبت به تیمارهای غلظت‌های مختلف سالیسیلیک‌اسید و متیل جاسمونات، در آزمایش روی کالوس کنگر فرنگی هم دیده شد (Samadi *et al*., 2014). کلروفیل در گیاه و بافت کالوس باعث تثبیت دی‌اکسیدکربن هوا می‌شود (Fukami & Hildebrant, 1967). از این‌رو، طبق نتایج به‌دست‌آمده از این آزمایش، تثبیت دی‌اکسیدکربن هوا در تیمار شاهد نسبت به سایر تیمارها بیشتر است. ازآنجاکه متابولیت‌های اولیه طی فرآیند فتوسنتز تولید می‌شوند، احتمالاً کاهش مقدار کلروفیل در تیمارهای غلظت‌های مختلف SA و MJ نسبت به تیمار شاهد، دلیلی برای کاهش تولید متابولیت اولیه است تا بافت کالوس متابوایت ثانویه تولید کند. متابولیت ثانویه از بافت کالوس در برابر تنش ایجادشده محافظت می‌کند (Samadi *et al*., 2014).

کاروتنوئید

کاروتنوئید هم به مانند کلروفیل رنگدانه فتوسنتزی

است، که در این آزمایش طبق جدول‌های ۳ و ۴، تیمار شاهد در ۱۰ روز بیشترین مقدار کاروتنوئید (۶۱/۶ میکروگرم در گرم وزن تر) را سبب شد و کمترین مقدار کاروتنوئید (۱/۶ میکروگرم در گرم وزن تر) مربوط به غلظت ۵۰ میکرومولار متیل‌جاسمونات در ۵ روز بود (جدول ۴). تیمار شاهد و تیمارهای ۵۰، ۱۰۰، و ۲۰۰ میکرومولار سالیسیلیک‌اسید در ۵ روز تفاوت معنی‌داری را در مقدار کاروتونوئید سبب نشدند (جدول ۳).

جدول ۱. نتایج تجزیه واریانس اثر مدت زمان و سالیسیلیک‌اسید بر میزان فنل کل، فلاونوئید و رنگدانه‌های کالوس پروانش.

Table 1. Results of analysis variance effect of time and salicylic acid on phenol, flavonoid and pigments of *Catharanthus roseus* L. callus.

Source of variation	df	Mean of squares							
		Fresh weigh	Chlorophyll a	Chlorophyll b	Total chlorophyll	Carotenoid	Flavonoid	Total phenol	Anthocyanin
Time (T)	1	0.2223^{ns}	2906.2004**	10634.039**	17718.100**	1802.666**	226.5108**	2802.6009**	2.3562*
SA	3	1.5464**	2443.3015**	8282.418**	25195.113**	990.656**	101.7028**	377.3130**	22.9483**
T x SA	3	0.1058^{ns}	1968.5004**	6460.219**	10525.743**	1214.170**	61.1164**	95.4640*	0.1387^{ns}
Error	16	0.104162	9.4787	15.6824	364.5329	4.1129	7.19621	26.74478	0.38076
C.V (%)		31.17	16.27	16.74	40.75	16.05	25.79	16.41	22.07

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

*, **, ns: Significantly difference at 5 and 1% of probability levels and not significant, respectively.

جدول ۲. نتایج تجزیه واریانس اثر مدت زمان و متیل جاسمونات بر میزان فنل کل، فلاونوئید و رنگدانه‌های کالوس پروانش.

Table 2. Results of analysis variance effect of time and methyl jasmonate on phenol, flavonoid and pigments of *Catharanthus roseus* L. callus.

Source of variation	df	Mean of squares							
		Fresh weigh	Chlorophyll a	Chlorophyll b	Total chlorophyll	Carotenoid	Flavonoid	Total phenol	Anthocyanin
Time (T)	1	0.4398^{ns}	1985.620**	10452.113**	15774.753**	2450.260**	51.0125**	3598.0708**	1.6590**
MJ	3	1.0308**	1919.254**	8096.706**	23569.699**	988.519**	157.4729**	193.6745**	1.2810**
T x MJ	3	0.2367^{ns}	2215.673**	6491.334**	10968.669**	1053.060**	1.5460^{ns}	334.3033**	0.0088^{ns}
Error	16	0.194575	29.245	19.9218	391.3525	6.1425	4.13385	35.40352	0.06277
C.V (%)		37.77	24.48	18.41	39.52	19.63	19.46	19.54	12.87

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

*, **, ns: Significantly difference at 5 and 1% of probability levels and not significant, respectively.

جدول ۳. مقایسه میانگین اثر متقابل مدت زمان و سالیسیلیک‌اسید بر میزان فنل کل، فلاونوئید و رنگدانه‌های کالوس پروانش.

Table 3. Mean comparison interaction effect of time and salicylic acid on phenol, felavenoid and pigments of *Catharanthus roseus* L. callus.

Time (day)	SA (µM)	Chlorophyll a (µg/g F.W)	Chlorophyll b (µg/g F.W)	Total chlorophyll (µg/g F.W)	Carotenoid (µg/g F.W)	Flavonoid (mg/g F.W)	Total phenol (mg/g F.W)
5	0	10.833^{bc}	9.123^{bc}	54.23^{b}	1.800^{d}	15.123^{ab}	39.327^{bc}
	50	15.000^{b}	0.603^{c}	15.8^{bc}	5.700^{cd}	21.467^{a}	52.897^{a}
	100	1.333^{d}	0.370^{c}	3.93^{c}	4.400^{cd}	10.423^{bcd}	32.220^{cd}
	200	4.467^{cd}	0.290^{c}	4.73^{c}	3.967^{cd}	6.880^{cd}	44.827^{ab}
10	0	86.667^{a}	149.533^{a}	233.77^{a}	61.600^{a}	12.690^{bc}	11.057^{f}
	50	12.467^{b}	5.913^{bc}	18.37^{bc}	11.600^{b}	5.767^{de}	24.273^{de}
	100	10.800^{bc}	9.527^{bc}	20.37^{bc}	3.700^{cd}	7.016^{cde}	16.020^{ef}
	200	9.733^{bc}	13.810^{b}	23.57^{bc}	8.300^{bc}	3.843^{e}	31.470^{cd}

میانگین‌هایی که در هر ستون حروف مشابه دارند، از نظر آزمون LSD در سطح احتمال ۱ درصد تفاوت معنی‌داری ندارند.

Means within a column followed by the same letter are not significantly different at p<0.01 according to the LSD test.

جدول ۴. مقایسه میانگین اثر متقابل مدت زمان و متیل جاسمونات بر میزان فنل کل و رنگدانه‌های کالوس پروانش.

Table 4. Mean comparison interaction effect of time and methyl jasmonate on phenol and pigments of *Catharanthus ruseus* L. callus.

Time (day)	MJ (µM)	Chlorophyll a (µg/g F.W)	Chlorophyll b (µg/g F.W)	Total chlorophyll (µg/g F.W)	Carotenoid (µg/g F.W)	Total phenol (mg/g F.W)
5	0	10.833^{b}	9.123^{b}	54.23^{b}	1.800^{d}	39.327^{b}
	50	11.300^{b}	0.713^{b}	11.90^{b}	1.667^{d}	41.563^{ab}
	100	15.733^{b}	2.420^{b}	16.20^{b}	2.833^{d}	55.123^{a}
	200	14.100^{b}	1.210^{b}	15.33^{b}	3.767^{d}	34.757^{b}
10	0	86.667^{a}	149.533^{a}	233.77^{a}	61.600^{a}	11.057^{d}
	50	9.633^{b}	9.227^{b}	18.87^{b}	6.067^{cd}	10.870^{d}
	100	14.467^{b}	10.793^{b}	25.27^{b}	12.867^{b}	18.807^{cd}
	200	13.967^{b}	10.863^{b}	24.87^{b}	10.367^{bc}	32.083^{bc}

میانگین‌هایی که در هر ستون حروف مشابه دارند، از نظر آزمون LSD در سطح احتمال ۱ درصد تفاوت معنی‌داری ندارند.
Means within a column followed by the same letter are not significantly different at p<0.01 according to the LSD test.

در همین راستا Abbaspour & Ehsanpour (2016) مشاهده نمودند که تیمارهای شاهد و ۱۰۰ میکرومولار سالیسیلیک‌اسید تفاوت معنی‌داری با هم نداشتند. کمتر بودن مقدار کاروتنوئید در تیمارهای غلظت‌های مختلف SA و MJ در ۵ روز نسبت به غلظت‌های مختلف این محرک‌ها در ۱۰ روز، احتمالاً به مانند توضیحاتی که در بخش کلروفیل گفته شد، به دلیل کم شدن تولید متابولیت اولیه و افزایش تولید متابولیت ثانویه است تا کالوس از تنش ایجاد شده از محرک‌های به کار برده شده، محافظت شود.

فلاونوئید

محرک‌های متیل جاسمونات و سالیسیلیک‌اسید و مدت زمان به تنهایی در سطح ۱ درصد معنی‌دار گردیدند (جدول‌های ۱ و ۲). اثر متقابل مدت زمان و متیل‌جاسمونات معنی‌دار نشد (جدول ۲) ولی اثر متقابل مدت زمان و سالیسیلیک‌اسید در سطح ۱ درصد معنی‌دار گردید (جدول ۱). بیشترین مقدار فلاونوئید (۲۱/۴۶۷ میلی‌گرم در گرم وزن تر) در تیمار ۵۰ میکرومولار سالیسیلیک‌اسید در ۵ روز مشاهده شد (جدول ۳). در همین راستا در آزمایش دیگری هم مشاهده شد که کمترین غلظت کاربردی سالیسیلیک‌اسید نسبت به غلظت‌های بالاتر آن و همچنین نسبت به تیمار شاهد، بیشترین میزان فلاونوئید در کالوس‌ها را به‌همراه داشت (Zamani *et al*., 2015). سالیسیلیک‌اسید سبب افزایش رونویسی mRNA خاص آنزیم فنیل‌آلانین آمونیالیاز می‌شود که این آنزیم منجر به پاسخ‌های دفاعی گیاه و بیوسنتز ترکیبات فنولیک از جمله فلاونوئید می‌شود (Zamani *et al*., 2015). کاهش مقدار فلاونوئید با افزایش مدت زمان نتیجه‌ای است که در آزمایش دیگری هم مشاهده شد به این صورت که کالوس‌هایی که به‌مدت ۱۵ روز تحت اثر ۱۰۰ میکرومولار متیل جاسمونات قرار گرفتند، میزان فلاونوئید بیشتری را نسبت به‌مدت زمان ۲۰ روز داشتند و همین‌طور میزان فلاونوئید در مدت زمان ۲۰ روز بیشتر از مقدار آن در ۲۵ روز بود (Wang *et al*., 2015).

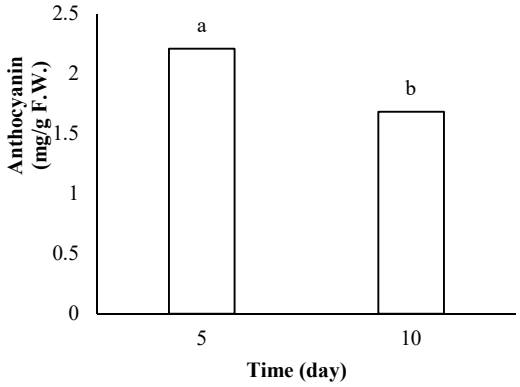
میزان فنل کل

از بین تمام تیمارهای مورد آزمایش در زمان‌های ۵ و ۱۰ روز، محیط‌های کشت دارای ۱۰۰ میکرومولار متیل جاسمونات در ۵ روز، بیشترین میزان فنل کل (۵۵/۱۲۳ میلی‌گرم در گرم وزن تر) را در کالوس‌ها سبب شدند (جدول ۴) و کمترین میزان فنل کل (۱۰/۸۷۰ میلی‌گرم در گرم وزن تر) در غلظت ۵۰ میکرومولار متیل جاسمونات در ۱۰ روز مشاهده شد (جدول ۴). پروانش از جمله گیاهان غنی از ترکیبات فنلی می‌باشد که مقدار این ترکیبات در اثر تنش‌های زنده و غیر زنده درآن افزایش می‌یابد. این ترکیبات فنلی به‌عنوان ترکیبات ارزشمند دارویی در این گیاه شناخته می‌شوند. (Talebi *et al*., 2011). طبق مشاهدات، تیمار ۱۰۰ میکرومولار متیل جاسمونات و بعد از آن ۵۰ میکرومولار سالیسیلیک‌اسید در ۵ روز افزایش معنی‌داری را نسبت به سایر غلظت‌های کاربردی‌شان در میزان فنل کل داشتند (جدول‌های ۳ و ۴)، که این مشاهده در آزمایش دیگری هم صورت گرفت به این صورت که با بالا بردن غلظت متیل جاسمونات تا ۱۰۰ میکرومولار، میزان فنل کل در کالوس‌ها افزایش یافت، ولی با بالاتربردن غلظت این محرک غیرزیستی، کاهش میزان فنل کل منتج شد (Samadi *et al*., 2014). افزودن سالیسیلیک‌اسید به محیط کشت باعث القای تنش اکسیداتیو در کالوس می‌شود که به دنبال آن القا و تجمع فنل کل جهت کاهش این خسارت صورت می‌گیرد (Tanouri *et al*., 2014). در تأثیر متیل جاسمونات روی افزایش مقاومت گوجه در مقابل نکروتروف آلترناریا دیده شد که با افزایش غلظت متیل جاسمونات، میزان ترکیبات فنلیکی افزایش یافت (Kepczynska & Krol, 2012).

آنتوسیانین

در این آزمایش، اثر متقابل مدت زمان با محرک‌ها برای

آنتوسیانین معنی‌دار نشد، ولی مدت زمان و محرک‌ها به تنهایی بر مقدار آنتوسیانین اثر داشتند (جدول‌های ۱ و ۲) و همچنین مشاهده شد که در کاربرد متیل جاسمونات، گذر زمان از ۵ به ۱۰ روز سبب کاهش معنی‌دار در مقدار آنتوسیانین شد (شکل ۱). در همین راستا پژوهشگران دیگر مشاهده نمودند که با افزایش مدت زمان تیمار متیل‌جاسمونات از ۳ به ۶، ۹ و سپس ۱۲ روز مقدار آنتوسیانین به صورت تدریجی کاهش یافت (Fang *et al*., 1999).



شکل ۳. مقایسه میانگین اثر زمان کاربرد متیل جاسمونات بر تولید آنتوسیانین در کالوس پروانش.

Figure 3. Mean comparison effect of time of methyl jasmonate application on production of anthocyanin in *Catharanthus roseus* L. callus.

در هر دو نوع محرک غیرزیستی به‌کار برده شده در این آزمایش، میزان فلاونوئید، فنل کل و آنتوسیانین در دوره دوم زمانی۱۰ روز کاهش یافت، ولی در مورد کلروفیل a، b و کل و همچنین کاروتنوئید، افزایش مقدارشان طی همین مدت زمان، مشهود بود (جدول‌های ۳ و ۴). فنیل پروپانوئیدها نظیر فنل‌های متصل به دیواره، فلاونوئیدها و آنتوسیانین‌ها، متابولیت‌های ثانویه‌ای هستند که به‌طور گسترده در گیاهان وجود دارند و هنگامی که گیاهان در معرض تنش قرار می‌گیرند بیوسنتزشان افزایش می‌یابد (Ghanati *et al*., 2010). همان‌طورکه پیش‌تر گفته شد کلروفیل و کاروتنوئید رنگدانه‌های فتوسنتزی‌اند. در طی فرآیند فتوسنتز متابولیت‌های اولیه تولید می‌شوند و سنتز متابولیت اولیه در هنگام تنش کاهش می‌یابد تا با تولید متابولیت ثانویه نقش دفاعی ایفا شود. بنابراین بیشتر شدن مقدار کلروفیل و کاروتنوئید در مدت زمان ۱۰ روز و کاهش‌یافتن میزان فنل کل، فلاونوئید و آنتوسیانین در همین مدت زمان می‌تواند به این دلیل باشد که در مدت زمان ۵ روز که مقدار کلروفیل و کاروتنوئید کمتر و میزان فنل کل، فلاونوئید و آنتوسیانین بیشتر از مدت زمان ۱۰ روز بود، پاسخ‌های دفاعی این متابولیت‌های ثانویه در کالوس‌ها، به‌دلیل تازه در معرض تنش قرارگرفتن، بیشتر بود و در دوره زمانی دوم چون با پاسخ‌های دفاعی دوره زمانی اول، آسیب ناشی از تنش کم شده بود، تولید متابولیت ثانویه هم کم شد.

نتیجه‌گیری کلی

متابولیت‌های ثانویه گیاهان دارویی برای اهداف غذایی و درمانی حائز اهمیت می‌باشند. به همین علت هر عاملی که بتواند تولید این متابولیت‌ها را افزایش دهد ارزشمند است. امکان تغییرات تولید این متابولیت‌ها در سلول‌ها و بافت‌ها نسبت به گیاهان کامل بیشتر است. به همین دلیل در این آزمایش، تأثیر محرک‌های متیل‌جاسمونات و سالیسیلیک‌اسید بر میزان فنل کل، فلاونوئید و رنگدانه‌ها در بافت کالوس پروانش مورد مطالعه قرار گرفت که مشاهده شد میزان فلاونوئید، فنل کل و رنگدانه‌های کالوس تحت اثر نوع، غلظت و مدت زمان تماس با محرک‌ها قرار دارند. رنگدانه‌های کلروفیل و کاروتنوئید در کالوس‌های موجود در محیط کشت بدون محرک در ۱۰ روز بیشتر بود. کمترین غلظت کاربردی سالیسیلیک‌اسید در ۵ روز، بیشترین میزان فلاونوئید را نسبت به تیمارهای دیگر به دنبال داشت. میزان فنل کل با افزایش غلظت متیل جاسمونات تا ۱۰۰ میکرومولار در ۵ روز افزایش یافت، ولی در غلظت بالاتر کاهش میزان فنل کل مشاهده شد. در مقایسه تأثیر دو بازه زمانی ۵ و ۱۰ روز بر مقدار وزن تر کالوس پروانش، تفاوت معنی‌داری دیده نشد و در مورد آنتوسیانین بازه زمانی ۱۰ روز باعث کاهش معنی‌دار مقدار آن نسبت به بازه زمانی ۵ روز شد. بنابراین این احتمال وجود دارد که بتوان با بهینه سازی غلظت و مدت زمان تماس کالوس با محرک، تولید متابولیت ثانویه در کالوس گیاه پروانش را افزایش داد.

REFERENCES

1. Abbaspour, J. & Ehsanpour, A. (2016). The impact of salicylic acid on some physiological responses of *Artemisia aucheri* Boiss. Under *in vitro* drought stress. *Journal of Acta Agriculturae Slovenica*, 107(2), 287-298.
2. Babel, P., Devpura, V. & Purohit, S. (2014). Salicylic acid induced changes in growth and some biochemical characteristics in *in vitro* cultured shoots of *chlorophytum borivilianum* Sant. et Fernand. *International Journal of Recent Scientific Research*, 5(4), 774-779.
3. Chaichana, N. & Srisulak, D. (2012). Effects of methyl jasmonate and salicylic acid on alkaloid production from *in vitro* culture of *Stemona* sp. *International Journal of Bioscience, Biochemistry and Bioinformatics*, 2(3), 146-150.
4. Esmaeilzade, B. S. & Rezaei, N. A. (2013). Increased trigonelline production by salicylic acid in fenugreek (*Trigonella foenum-graecum* L.) cell culture. *Journal of Cell & Tissue (JCT)*, 5(2), 165-172. (in Farsi).
5. Fang, Y., Smith, M. & Pepin, M. (1999). Effects of exogenous methyl jasmonate in elicited anthocyanin-Producing cell cultures of ohelo (*Vaccinium pahalae*). *Journal of Society for in Vitro Biology*, 35(1), 106-113.
6. Fukami, T. and Hildebrandt, A.C. (1967). Growth and chlorophyll formation in edible green plant callus tissues in vitro on media with limited sugar supplements. *The Botanical Magazine Tokyo*, 80(947), 199-211.
7. Ghanati, F., Bakhtiyariyan, S. & Abdolmaleki, P. (2010). Effect of methyl jasmonate on secondary metabolites of *Calendula officinalis* L. *Journal of Modarres Science & Biotechnic*, 1(1), 21-33. (in Farsi).
8. Goncalves, E., Cruz, R., Abreu, M., Brandao, T. & Silva, C. (2009). Biochemical and colour changes of watercress (*Nasturtium officinale* R. Br.) during freezing and frozen storsge. *Journal of Food Engineering*, 93(1), 32-39.
9. Kepczynska, E. & Krol, P. (2012). The phytohormone methyl jasmonate as an activator of induced resistance against the necrotroph *Alternaria porri* f. sp. *Solani* in tomato plants. *Journal of Plant Interactions*, 7(4), 307-315.
10. Keshavarz, R., Majid Mahdiyeh, M., Abnosi, M.H. & Amirjani, M.R. (2015). Effect of hydrogen peroxide on induction of secondary metabolites in periwinkle (*Catharanthus roseus* L.) callus. *Journal of Cell & Tissue (JCT)*, 6(3), 389-396. (in Farsi).
11. Mehrabani, B., Nazeri, S. & Piri, K. (2012). Evaluation of total produced phenol in Chaei Koohi (*Stachys lavandulifolia* Vahi) callus culture and possibility of its enhancement using Elicitors. *Journal of Agricultural Biotechnology*, 4(2), 77-88. (in Farsi).
12. Mishra, J.N. & Verma, N.K. (2017). A brief study on *Catharanthus roseus*: A review. *International Journal of Research in Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 2(2), 20-23.
13. Murashige, T. & Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bio assays with Tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15, 473-497.
14. Pan, Q., Chen, Y., Wang, Q., Yuan, F., Xing, Sh., Tian, Y., Zhao, J., Sun, X. & Tang, K. (2010). Effect of plant growth regulators on the biosynthesis of vinblastine, vindolin and catharanthin in *Catharanthus roseus*. *Journal of Plant Growth Regulators*, 60, 133-141.
15. Pirian, K. & Piri, Kh. (2012). Effect of methyl jasmonate and salicylic acid on noradrenalin accumulation in hairy roots of *Portulaca oleracea* L. *International Research Journal of Applied and Basic Sciences*, 3(1), 213-218.
16. Rajabi, A., Abbaspour, H. & Sinki, J. M. (2016). Evaluation of chemical elicitors methyl jasmonate and salicylic acid effect on produce stimulation of hypericin in *Perforatum hypericum*. *Journal of New Cellular & Molecular Biotechnology*, 6(22), 41-50. (in Farsi).
17. Ram, M., Prasad, K., Singh, S., Hada, B. & Kumar, S. (2013). Influence of salicylic acid and methyl jasmonate elicitation on anthocyanin production in callus cultures of *Rosa hybrid* L. *Journal of Plant Cell Tissue Organ Cult*, 113(3), 459-467.
18. Samadi, S., Ghasemnezhad, A., Alizadeh, M. & Alami, M. (2014). Influence of elicitors on photosynthesis pigments, caffeic acid, chlorogenic acid and proline content of *Cynara scolymus* callus *Iranian Journal of Horticultural Science*, 47(3), 435-443. (in Farsi).
19. Singleton, V.L., Orthofer, R. & Lamuela-Raventos, R.M. (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods in Enzymology*, 299, 152-178.
20. Talebi, M., Etesam, F. & Seyedtabatabaei, B. E. (2011). Indirect regeneration of *Catharanthus roseus* L. through leaf explants culture and different combination of plant growth regulators. *Journal of Greenhouse Culture Science and Technology*, 2(8), 35-44. (in Farsi).

21. Tanouri, A., Ghasemnezhad, A. & Alizadeh, M. (2014). Effect of methyl jasmonate and salicylic acid on morphological traits and inside pigments in callus of *Cynara scolymus*. *Journal of Crop Improvement*, 16(4), 857-869. (in Farsi).
22. Wagner, G. (1979). Content and vacuole/extravacuole distribution of neutral sugars, free amino acids, and anthocyanin in protoplasts. *Plant Physiol*ogy, 64(1), 88-93.
23. Wang, J., Qian, J., Yao, L. & Lu, Y. (2015). Enhanced production of flavonoids by methyl jasmonate elicitation in cell suspension culture of *Hypericum perforatum*. *Bioresources and Bioprocessing*, 2, 1-9.
24. Zamani, S., Ghasemnezhad, A., Alizadeh, M. & Alami, M. (2015). Investigation on phenylalanine ammonia-lyase and phenylpropanoid combination activity of medicinal plant *Cynara scolymus* L. affected by salinity and salicylic acid in in-vitro conditions. *Journal of Eco Phytochemistry of Medicinal Plants*, (3)4, 28-39. (in Farsi).
25. Zamani, M., Moradi, H., Chalavi, V. & Kazemitabar, S. K. (2019). Effect of salicylic acid and methyle jasmonat elicitors on hypericin production in *Hypericum perforatum* L. cv. Topas callus culture. *Iranian Journal of Horticultural Science*, 49 (4), 915-923. (in Farsi).