مجله بیوتکنولوژی کشاورزی (دوره 4، شماره 1، بهار و تابستان 1391)

بهینه سازی کالوس‌زایی و سوسپانسیون سلولی پروانش (*Catharanthus roseus*)

جعفر احمدی*[1]، راضیه محمدی[2]، قاسمعلی گروسی[3]، رامین حسینی[3]

1- دانشیار دانشگاه بین المللی امام خمینی (ره) قزوین

2- کارشناس ارشد دانشگاه بین المللی امام خمینی (ره) قزوین

3- استادیار دانشگاه بین المللی امام خمینی (ره) قزوین

تاریخ دریافت: 1390/10/26، تاریخ پذیرش: 1391/02/18

چکیده

پروانش (*Catharanthus roseus*) گیاهی دارویی است که به دلیل تولید آلکالوئید های فراوان از جمله وین‌کریستین و وین‌بلاستین اهمیت دارد. کشت درون شیشه‌ای پروانش منابع مستعدی از بافت یا اندام‌ها از جمله کالوس، سوسپانسیون سلولی و گیاهچه را برای تولید متابولیت‌های ثانویه فراهم می‌کند. از آنجا که برای تولید انبوه کالوس و بهینه سازی سوسپانسیون سلولی جهت استخراج متابولیت های ثانویه مطالعات اندکی صورت گرفته است. برای این منظور دو آزمایش جداگانه بهینه سازی کالوس‌زایی و یک آزمایش بهینه سازی سوسپانسیون سلولی انجام شد. آزمایش اول کالوس زایی در قالب فاکتوریل با سه ریزنمونه ریشه، ساقه و برگ و ترکیب سطوح هومونهای 2,4-D + BAP و آزمایش دوم در قالب فاکتوریل با شش ریزنمونه برگ برون شیشه، برگ درون شیشه، ساقه، ریشه، گره و بذر و ده ترکیب هورمونی اجرا شد. آزمایش بهینه سازی سوسپانسیون سلولی نیز با شش تیمار هورمونی مختلف به همراه تیمار شاهد (فاقد تنظیم کننده) در قالب طرح آماری کاملا تصادفی اجرا شد. مقایسه میانگین نشان داد که بافت برگ بیشترین کالوس‌زایی داشت و قطعات ریشه و ساقه در رتبه‌های بعدی کالزایی بودند. در این آزمایش تیمارهای یک میلی گرم در لیتر 2,4-D به تنهایی و یا به همراه 0/5 میلی گرم در لیتر BAP یا KN بیشترین کالوس را تولید کردند. در سوسپانسیون سلولی بیشترین وزن خشک سلولی در محیط کشت‌های یک میلی گرم در لیتر 2,4-D و دو میلی گرم در لیتر 2,4-D به همراه یک میلی گرم در لیتر BAP اندازه گیری شد.

کلمات کلیدی: *پروانش، کالوس، سوسپانسیون سلولی، درون شیشه.*

* نویسنده مسئول: جعفر احمدی تلفن: 09123128278 Email:njahmadi910@yahoo.com

مقدمه

پروانش (*Catharanthus roseus*) گیاهی دارویی است که به دلیل وجود ترکیبات دارویی و آلکالوئیدها مورد توجه قرار گرفته است. از بین آنها وین‌کریستین و وین‌بلاستین مهم‌ترین آلکالوئیدهایی هستند که برای درمان انواع سرطان‌ها کاربرد دارند. با این حال عملکرد این دو ترکیب به طور نسبی پایین و مقدار تقریبی آنها در گیاه 0/0005 درصد است که همین باعث شده مطالعات بسیاری روی کشت بافت و سوسپانسیون پروانش صورت پذیرد (Yokoyama and Inomata,1998). با روش‌های کشت درون شیشه‌ای پروانش بافت‌های مختلف گیاهی برای تولید متابولیت‌های ثانویه از جمله آلکالوئیدها توصیه شده است که کالوس، سوسپانسیون سلولی، گیاهچه و ریشه‌های تراریخت در بیوراکتورها از آن جمله می‌باشند. در شرایط مناسب، سلول‌های کالوس در محیط سوسپانسیون می‌توانند به رشد دایم و بدون تغییر خود به طور نامحدودی ادامه دهند (Mujib *et al.*, 2000; Senoussi *et al.*, 2009). وقتی سلول‌های جدید در محیط سوسپانسیون تشکیل می‌شوند، به صورت پراکنده یا توده‌هایی در می‌آیند. این سلول‌ها سرعت تقسیم سلولی بیشتری نسبت به سلول‌های کالوس نشان می‌دهند. به این دلیل سوسپانسیون سلولی در شرایطی که تقسیم سلولی سریع و نسل‌های سلولی پر جمعیت نیاز باشد، کاربرد دارند (Phillips *et al.*, 1995). تولید متابولیت‌های ثانویه و نادر در گیاهان از طریق کشت سلولی و سوسپانسیون یکی از زمینه‌هایی است که در سال‌های اخیر به دلیل دارا بودن ارزش اقتصادی بالای این ترکیبات و یا هزینه بالای فراوری ترکیبات به صورت گسترده مورد استفاده قرار گرفته است (Sato *et al.*, 2001). همچنین کشت سلولی برای تولید متابولیت‌های با ارزش در محیطی کنترل شده و مستقل از تغییرات آب و هوایی سودمند است (Verpoorte *et al.*, 1991). در آزمایشی قطعات ساقه پروانش برای تشکیل کالوس در محیط MS مایع حاوی ترکیبات مختلف آلفا نفتالین اسیتیک اسید (NAA[1])، کاینتین (KN[2]) و 3-ایندول اسیتیک اسید (IAA[3]) کشت شدند و محیط MS[4] حاوی 5/37 میکرومول NAA + 4/65 میکرومول KN + 5/7 میکرومول IAA بهترین محیط برای تولید حداکثر کالوس شناخته شد (Zhao *et al.*, 2001). Waileng and Laikeng (2004) موفق شدند از بافت‌های برگ و ساقه گیاه *Orthosiphon stamineus* در محیط کشت MS حاوی تنظیم کننده‌های رشد توفوردی (2-4-D[5]) و NAA کالوس تولید کنند. کالوس‌های تولید شده از برگ که تردتر بودند، برای تهیه سوسپانسیون سلولی انتخاب شدند. در این آزمایش تنظیم کننده‌های 2,4-D و NAA با غلظت‌های مختلف برای محیط سوسپانسیون آزمایش شد. محیط حاوی یک میلی گرم در

[1] α-naphthalen eacetic acid
[2] Kinetin
[3] 3-indoleacetic acid
[4] Murashige and Skoog
[5] 2,4-dichlorophenoxyacetic acid

لیتر 2,4-D رشد سریع‌تری نشان داد و بـه عنـوان محیط نگهداری سوسپانـسیون اسـتفاده شـد. Xu and Dong (2005) از قطعات سـاقه پـروانش در محیط MS حاوی 2 میلی گرم در لیتـر NAA بـه علاوه 2 میلی گرم در لیتر IAA و 0/1 میلی گـرم در لیتر KN کـالوس تولیـد کردنـد. کـالوس‌هـای تولید شده به مـدت 5 مـاه واکـشت و نگهـداری شدند و از آن‌ها جهت تهیه سوسپانسیون سـلولی بـا همـان ترکیـب هورمـونی اسـتفاده شـد. در آزمایشی با کـشت ریزنمونـه‌هـای بـرگ و ریـشه پـروانش در محـیط گـامبورگ حـاوی تنظـیم کننده‌های 2,4-D و 6-بنزیل آمینوپورین (BAP[1]) کالوس‌های متراکم تولید شد. این کـالوس‌هـا بـه محیط سوسپانسیون حاوی تنظیم کننده‌هـای 2,4-D و BAP منتقل شدند. سلول‌های سوسپانسیون 7 روزه برای بررسـی‌هـای سـلول شناسـی رنـگ آمیزی و تثبیت شـدند. بررسـی‌هـا نـشان داد کـه شکل سلول‌های جدا شده از کالوس‌های بـرگ و ریشه در حال تبدیل به یکدیگر بـوده و مـشخص شد که تنظیم کننده‌های رشد مستقل از بافت منشا می‌توانند سلول‌ها را در مسیرهای مختلـف رشـد پـیش ببرنـد (Dutta *et al.*, 2007). Valluri (2009) از برگ‌هـای پـروانش پـرورش یافتـه در گلخانه، در محیط مایع MS حاوی یک میلی گرم در لیتر 2,4-D به همراه یـک میلـی گـرم در لیتـر IAA و 0/5 میلی گرم در لیتـر KN سوسپانـسیون تهیه کـرد. در آزمایـشی از کـشت قطعـات نـوک سـاقه، بـرگ، سـاقه و ریـشه پـروانش در محـیط جامد MS به همراه BAP ،2,4-D , NAA , KN در طی30 روز کالوس تهیه شد و نـوک سـاقه در محیط حاوی یک میلی گرم در لیتر 2,4-D + یـک میلی گـرم در لیتـر KN بهتـرین کـالوس‌زایـی را نشان داد (Taha *et al.*, 2008). طـی تحقیقـی بـا استفاده از برگ های جوان در محیط MS حـاوی 0/23 میلی گرم در لیتر BAP + 0/44 میلـی گـرم در لیتر 2,4-D کالوس و سپس سوسپانسیون تولید شد. در این آزمایش غلظت‌های 10، 20، 30، 50، 70 و 90 گرم در لیتر ساکارز برای سوسپانسیون‌ها آزمـایش شـد. تیمـار 30 گـرم در لیتـر سـاکارز بیشترین وزن تر و خـشک سـلول را تولیـد کـرد (Lee *et al.*, 2006). اگر چه مطالعات مختلفی در خصوص کـشت درون شیـشه پـروانش صـورت گرفته است، اما بـا هـدف تولیـد انبـوه کـالوس و بهینـه سـازی سوسپانـسیون سـلولی بـه منظـور استخراج متابولیت‌هـای ثانویـه مطالعـات انـدکی صورت گرفته است. بدین منظور در ایـن مطالعـه بهینـه‌تـرین شـرایط بـرای تولیـد کـالوس و سوسپانسیون سلولی مورد تحقیق و بررسـی قـرار گرفت.

مواد و روش ها

تهیه مواد گیاهی و محیط کشت

از بـذر واریتـه Don پـروانش بـرای تهیـه گیاهچه‌های برون شیشه‌ای (کشت بذر در گلـدان و پرورش در گلخانه) و درون شیـشه‌ای اسـتفاده شد. گیاهچه‌هـای درون شیـشه از کـشت بـذر در محیط کشت MS تولید شدند. برای تهیه ریزنمونه

[1] . *6-benzylaminopurine*

از گیاهچه‌های درون شیشه‌ای، ریشه‌ها به قطعات حدود یک سانتی‌متری، برگ‌ها به قطعات یک سانتی‌متر مربعی و ساقه نیز به قطعات 1/5-1 سانتی‌متر برش داده شدند. ریزنمونه‌ها بلافاصله به محیط کشت منتقل شده و دور پتری دیش‌ها با پارافیلم بسته شد. سپس پتری‌ها در اتاقک رشد با درجه حرارت 25 درجه سانتی‌گراد و در تاریکی قرار داده شدند. برای تهیه محیط کشت، ساکارز با غلظت 30 گرم در لیتر به عنوان منبع کربن در آب مقطر حل شد. سپس نمک MS به مقدار مورد نیاز به محلول ساکارز افزوده شد. مواد افزودنی تیامین، ریبوفلاوین، بیوتین، فولیک اسید و کازئین هیدرولیزات به ترتیب با مقادیر 2، 0/1، 0/1، 0/1 و 250 میلی‌گرم در لیتر به محیط کشت اضافه گردید و pH محیط کشت 5/8 ± 0/1 تنظیم شد. در آخرین مرحله آگار به عنوان جامد کننده به میزان هفت گرم در لیتر، مورد استفاده قرار گرفت. پس از استریل محیط کشت و کاهش دما، تنظیم کننده‌هایی که قابل اتوکلاو نیستند، به محیط کشت افزوده شدند.

آزمایش‌های کالوس‌زایی

از دو آزمایش جداگانه برای بهینه سازی تولید کالوس استفاده شد. طرح آماری مورد استفاده در آزمایش اول، فاکتوریل با سه عامل ریزنمونه (ریشه، ساقه و برگ)، تنظیم کننده‌های رشد BAP (0/5، 1 و 1/5 میلی گرم در لیتر) و 2,4-D (صفر و 2 میلی گرم در لیتر) در قالب طرح پایه کاملا تصادفی با سه تکرار بود. آزمایش دوم کالوس‌زایی به صورت فاکتوریل با دوعامل ریزنمونه (برگ برون شیشه، برگ درون شیشه، ساقه، ریشه، گره و بذر) و ترکیب تنظیم کننده های رشد در محیط کشت (جدول 1) در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی با چهار تکرار اجرا شد.

آزمایش بهینه سازی سوسپانسیون سلولی

برای بهینه سازی سوسپانسیون سلولی از طرح آماری کاملا تصادفی با شش تیمار هورمونی مختلف (S1=0.5mg/L KN+1mg/L 2-4-D، S2=0.5mg/L BAP+1mg/L 2-4-D، S4= 0.5mg/L ، S3=1mg/L 2-4-D S5=1mg/L ،BAP+2mg/L 2-4-D S6=1mg/L ،BAP+2mg/L 2-4-D BAP+1mg/L 2-4-D) به همراه تیمار شاهد فاقد تنظیم کننده رشد (S7) در سه تکرار استفاده شد. برای تهیه محیط کشت پایه سوسپانسیون سلولی از فرمول محیط کشت آزمایشات کالوس‌زایی، بدون افزودن آگار استفاده شد. از قطعات کالوس تولید شده در آزمایش کالوس‌زایی برای انتقال به محیط مایع و تشکیل سوسپانسیون سلولی استفاده شد. آزمایش سوسپانسیون در ارلن‌های حاوی 50 میلی‌لیتر محیط کشت به همراه میزان مساوی کالوس انجام شد. ارلن‌ها روی شیکر با سرعت 100دور در دقیقه و دمای 25 درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند و بازکشت هر 14 روز انجام شد. در آزمایش سوسپانسیون صفات تعداد سلول در هر میلی‌لیتر، وزن خشک توده سلولی، حجم ایستای

سلول‌ها و حجم فشرده سلول‌ها برای هر تیمار سوسپانسیونی اندازه گیری شد. برای اندازه‌گیری وزن خشک، سوسپانسیون با سرعت 500 دور در دقیقه به مدت 5 دقیقه سانتریفیوژ و مایع رویی از سلول‌ها جدا شد. سلول‌ها روی کاغذ صافی قرار گرفتند تا آب اضافی آن‌ها خارج شود. سپس نمونه‌ها در آون با دمای 60 درجه سانتی‌گراد به مدت 24 ساعت خشک شده و وزن خشک توده سلولی توزین گردید. به منظور شمارش سلول‌ها و تک سلول کردن توده‌ها با استفاده از روش آنزیمی، 1 درصد سلولاز و 0/1 درصد پکتیناز به یک میلی لیتر از سوسپانسیون اضافه شد. سپس این مخلوط به مدت 15 دقیقه در 500 دور در دقیقه جهت سرعت دادن به تاثیر آنزیم‌ها سانتریفیوژ شد و با لام هموسیتومتر تعداد سلول‌ها شمارش شدند. جهت تشخیص سلول-های زنده و مرده از روش رنگ آمیزی سیتوپلاسم استفاده شد. برای رنگ‌آمیزی سلول‌ها، پس از تک سلول کردن یک میلی لیتر از محلول سوسپانسیون در شیشه ساعتی ریخته شد. سپس با چند قطره محلول کارمن زاجی به مدت دو دقیقه تیمار شد. با پیپت از مخلوط سلول‌های درون شیشه ساعتی یک قطره کوچک روی لام قرار گرفت و به آن مقداری گلیسیرین اضافه شد. به این ترتیب سلول‌ها برای مشاهده آماده شدند. سلول‌های مرده به صورت چروک خورده و سلول‌های زنده صورت متورم که دارای ساختارهای درونی‌اند، دیده شدند. مشاهده سلول‌ها با بزرگنمایی 100x میکروسکوپ Nikon Y S 100 انجام شد. تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها با استفاده از نرم افزار MSTATC انجام گرفت و برای مقایسه میانگین داده‌ها از آزمون چند دامنه‌ای دانکن استفاده شد.

جدول 1- ترکیب تنظیم کننده‌های رشد در آزمایش دوم کالوس‌زایی.

Table 1- Composition of growth regulators in the second callus induction trail.

MS_1	1 mg/l BAP + 1 mg/l 2-4-D	**MS_6**	0.5 mg/l KN + 1 mg/l 2-4-D
MS_2	0.5 mg/l BAP + 1 mg/l 2-4-D	**MS_7**	1 mg/l KN + 1 mg/l NAA
MS_3	1mg/l BAP + 1 mg/l NAA	**MS_8**	0.5 mg/l KN + 1 mg/l NAA
MS_4	0.5 mg/l BAP + 1 mg/l NAA	**MS_9**	1 mg/l 2-4-D
MS_5	1 mg/l KN + 1 mg/l 2-4-D	**MS_{10}**	1 mg/l NAA

نتایج

در آزمایش اول تولید کالوس همان گونه که جدول 2 نشان می‌دهد، منبع ریزنمونه از نظر صفت کالوس‌زایی، در سطح احتمال ($P\leq 0/01$) معنی‌دار شده و بیانگر تفاوت قدرت کالوس‌زایی بین سه بافت برگ، ساقه و ریشه است (شکل 1). مقایسه میانگین ریزنمونه‌ها نشان داد که بافت برگ با 81 درصد کالوس‌زایی بیشترین، ریشه با 70 درصد و ساقه با 34 درصد کالوس‌زایی در رتبه‌های بعدی قرار گرفتند. بین سه غلظت BAP (0/5، 1 و 1/5 میلی‌گرم در لیتر) تفاوت معنی-داری در سطح احتمال ($P\leq 0/05$) وجود داشت

که نشان از تاثیر غلظت‌های مختلف BAP بر کالوس‌زایی پروانش دارد. ولی بین دو غلظت 2,4-D (صفر و 2 میلی‌گرم در لیتر) تفاوت معنی‌داری دیده نشد که دلالت بر عدم وابستگی صفت کالوس‌زایی به این تنظیم کننده دارد. در این آزمایش برهمکنش اثر غلظت تنظیم کننده‌ها و ریزنمونه معنی‌دار شد و مشخص شد که مقدار مناسب غلظت و ترکیب دو تنظیم کننده BAP و 2,4-D بسته به نوع ریزنمونه تغییر می‌نماید و ریزنمونه‌ها نسبت به غلظت های مختلف و ترکیب دو تنظیم کننده واکنش‌های متفاوتی بروز می‌دهند. مقایسه میانگین برهمکنش سه جانبه تنظیم کننده‌های 2,4-D، BAP و ریزنمونه‌ها از طریق آزمون دانکن در جدول (3) ارائه شده است. در این آزمایش بیشترین میزان کالوس‌زایی به ترتیب برای ریزنمونه ریشه با ترکیب تنظیم کننده یک میلی گرم در لیتر BAP + صفر 2,4-D با میانگین 100 درصد کالوس‌زایی و برای ریزنمونه برگ با ترکیب یک میلی گرم در لیتر BAP + 2 میلی گرم در لیتر 2,4-D و ترکیب 1/5 میلی گرم در لیتر BAP + 2 میلی گرم در لیتر 2,4-D با میانگین 93 درصد کالوس‌زایی مشاهده شد. ریزنمونه ساقه در محیط کشت حاوی ترکیب یک میلی گرم در لیتر BAP + 2 میلی گرم در لیتر 2,4-D کمترین میزان کالوس را تولید نمود.

جدول 2- تجزیه واریانس کالوس‌زایی برای ریزنمونه‌ها و تنظیم کننده های رشد در آزمایش اول.

Table 2- Variance analysis of callus production of explants and growth regulators in the first trail.

منبع تغییرات (S.O.V)	درجه آزادی (df)	میانگین مربعات (MS)
BAP	2	4.96^{*}
2,4-D	1	1.85^{ns}
BAP ×2,4-D	2	3.85^{*}
ریز نمونه (Explant)	2	106.96^{**}
BAP × Explant	4	16.24^{**}
2,4-D × Explant	2	10.96^{**}
BAP ×2,4-D × Explant	4	12.13^{**}
خطا (Error)	36	1.093
کل (Total)	53	

ns، * و **: به ترتیب غیر معنی دار، معنی دار در سطح احتمال 5 و 1 درصد.

جدول3- مقایسه میانگین برهمکنش اثرات تنظیم کننده‌های رشد BAP, 2,4-D و ریزنمونه‌ها در آزمایش اول.

Table 3. Mean comparison of BAP×2,4-D×explant interaction in the first trail.

BAP (mg/l)	2,4-D (mg/l)	ریزنمونه Explants	درصد کالوس زایی Callus production%	گروه بندی Grouping
0.5	0	ریشه (root)	90	abc*
0.5	0	ساقه (shoot)	40	hij
0.5	0	برگ (leaf)	60	efg
0.5	2	ریشه (root)	30	ijk
0.5	2	ساقه (shoot)	53.33	fgh
0.5	2	برگ (leaf)	73.33	cde
1	0	ریشه (root)	100	a
1	0	ساقه (shoot)	23.33	jk
1	0	برگ (leaf)	90	abc
1	2	ریشه (root)	80	bcd
1	2	ساقه (shoot)	20	k
1	2	برگ (leaf)	93.33	ab
1.5	0	ریشه (root)	50	gh
1.5	0	ساقه (shoot)	43.33	ghi
1.5	0	برگ (leaf)	76.67	bcde
1.5	2	ریشه (root)	70	def
1.5	2	ساقه (shoot)	26.67	ijk
1.5	2	برگ (leaf)	93.33	ab

* میانگین های دارای حروف مشابه با یکدیگر اختلاف معنی‌دار ندارند.

در آزمایش دوم تولید کالوس، همان گونه که از جدول 4 ملاحظه می‌شود، منبع ریزنمونه (برگ برون شیشه، برگ درون شیشه، ریشه، ساقه، بذر و جوانه) از نظر کالوس‌زایی، در سطح احتمال ($P\leq 0/01$) معنی‌دار شد و از این نظر بین شش ریزنمونه تفاوت معنی‌داری وجود داشت. مقایسه میانگین ریزنمونه‌ها (شکل 2) نشان داد که ریزنمونه برگ برون شیشه با میانگین وزن کالوس 1/25 گرم بیشترین کالوس‌زایی را دارا بود. ریزنمونه برگ درون شیشه با میانگین 0/44 گرم در مرتبه دوم قرار گرفت و ریزنمونه بذر با 0/12 گرم کمترین کالوس‌زایی را نشان داد. منبع تغییر تنظیم کننده در سطح احتمال ($P\leq 0/01$) معنی‌دار شد و مقایسه میانگین ترکیب تنظیم کننده‌های مختلف (شکل 3) از نظر میزان کالوس‌دهی نشان داد که MS_2 (0/5 میلی گرم در لیتر BAP + 1 میلی گرم در لیتر 2,4-D) و MS_6 (0/5 میلی گرم در لیتر KN + 1 میلی گرم در لیتر 2,4-D) به

ترتیب با میانگین 0/67 و 0/66 بیشترین کالوس را تولید کردند و ترکیب MS_9 (1 میلی گرم در لیتر 2,4-D) با میانگین 0/41 در مرتبه دوم قرار گرفت. ترکیب MS_{10} (1 میلی گرم در لیتر NAA) به همراه MS_8 (0/5 میلی گرم در لیتر KN + 1 میلی گرم در لیتر NAA) و MS_3 (1 میلی گرم در لیتر BAP + 1 میلی گرم در لیتر NAA) کمترین میزان کالوس‌زایی را داشتند. اثر متقابل ریزنمونه و ترکیب تنظیم کننده‌ها در سطح احتمال ($P\leq 0/01$) معنی‌دار شد و در مقایسه میانگین اثرات متقابل، ریزنمونه برگ برون شیشه در دو محیط کشت MS_2 (0/5 میلی گرم در لیتر BAP + 1 میلی گرم در لیتر 2,4-D) و MS_6 (0/5 میلی گرم در لیتر KN + 1 میلی گرم در لیتر 2,4-D) بیشترین کالوس‌زایی نشان داد و کمترین کالوس‌زایی مربوط به ریزنمونه بذر در محیط کشت MS_{10} (1میلی گرم در لیتر NAA) بود.

جدول 4- تجزیه واریانس صفت کالوس زایی برای ریزنمونه ها و تنظیم کننده های رشد در آزمایش دوم.

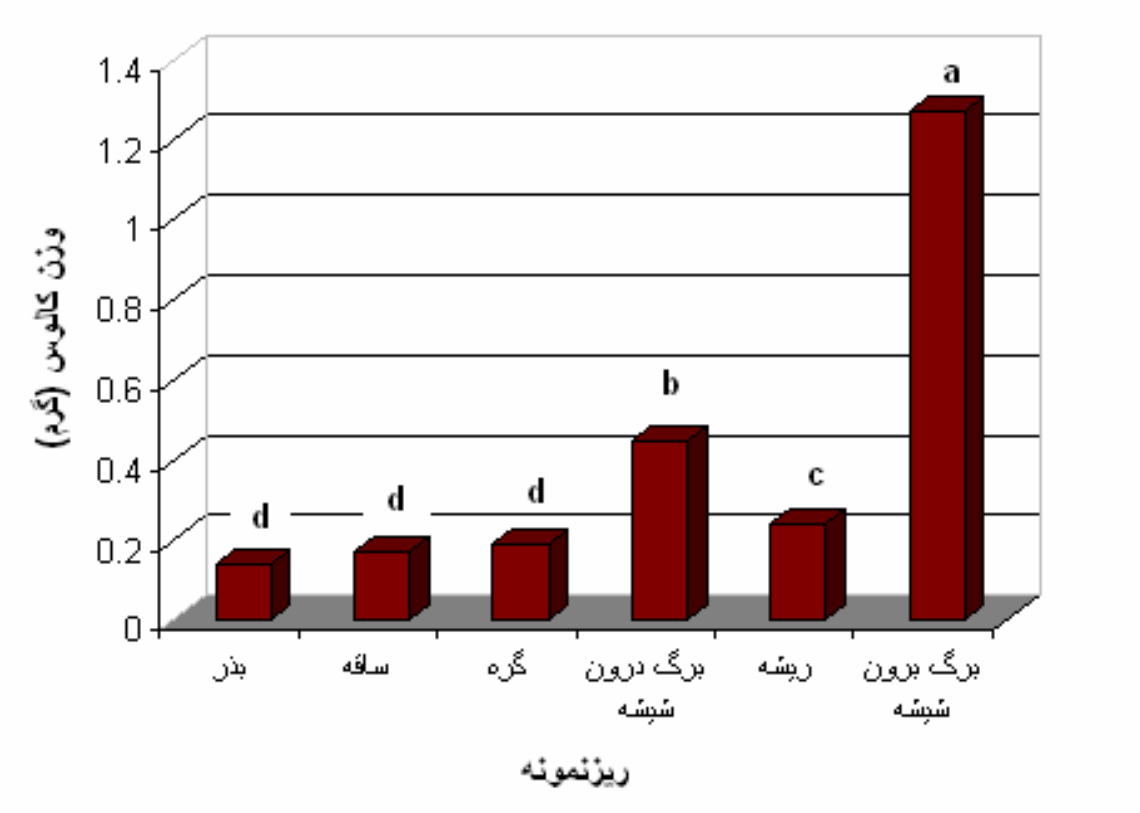
Table 4- Variance analysis of callus production of explants and growth regulators in the second trail.

منبع تغییرات (S.O.V)	درجه آزادی (df)	میانگین مربعات (MS)
تکرار (Rep)	3	0.02^{ns}
ریزنمونه (Eplant)	5	1.824^{**}
تنظیم کننده (Regulator)	9	0.085^{**}
Regulator × Eplant	45	0.095^{**}
خطا (Error)	177	0.012
کل (Total)	239	

ns، * و **: به ترتیب غیر معنی دار، معنی دار در سطح احتمال 5 و 1درصد.

شکل 1- کالوس‌زایی ریزنمونه‌های کشت شده در آزمایش اول (a، برگ؛ b، ساقه و c، ریشه).

Figure 1. Callus production of explants in the first trail (a, Leaf; b, Shoot; c, Root).



شکل 2- مقایسه ریزنمونه‌ها از لحاظ میزان وزن کالوس در آزمایش کالوس‌زایی دوم.

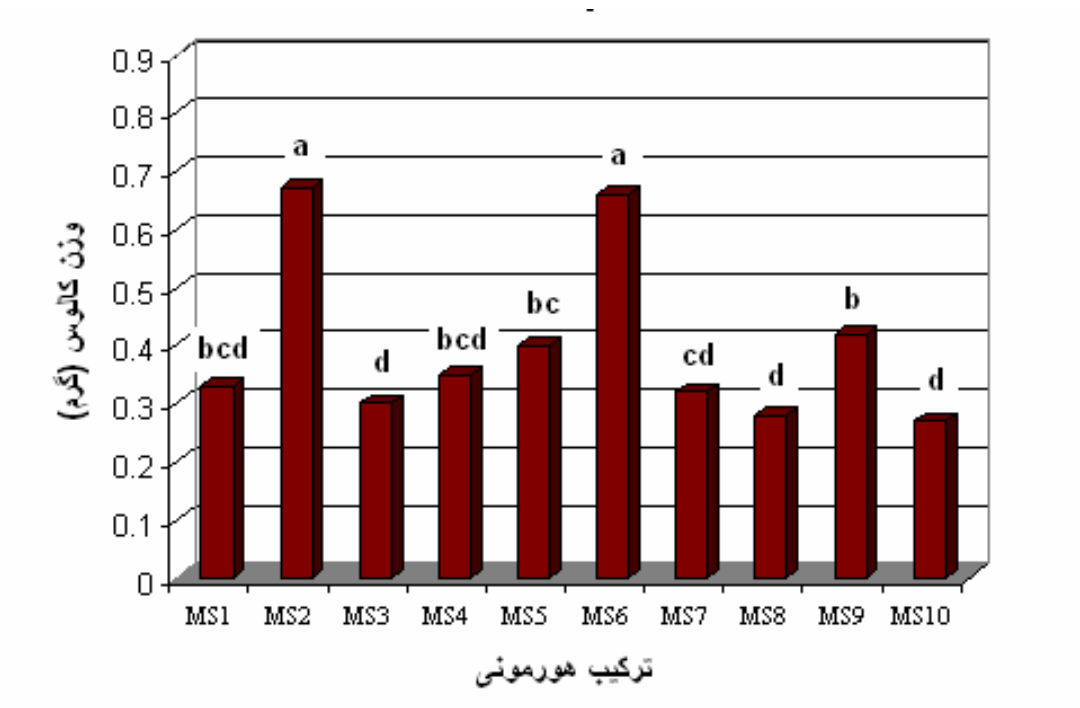
Figure 2. Comparison of explants for callus weight in the second trail.

فعالیت سلولی در شرایط محیط‌های کشت سوسپانسیونی

حجم ایستای سلول‌ها[1] (SCV)

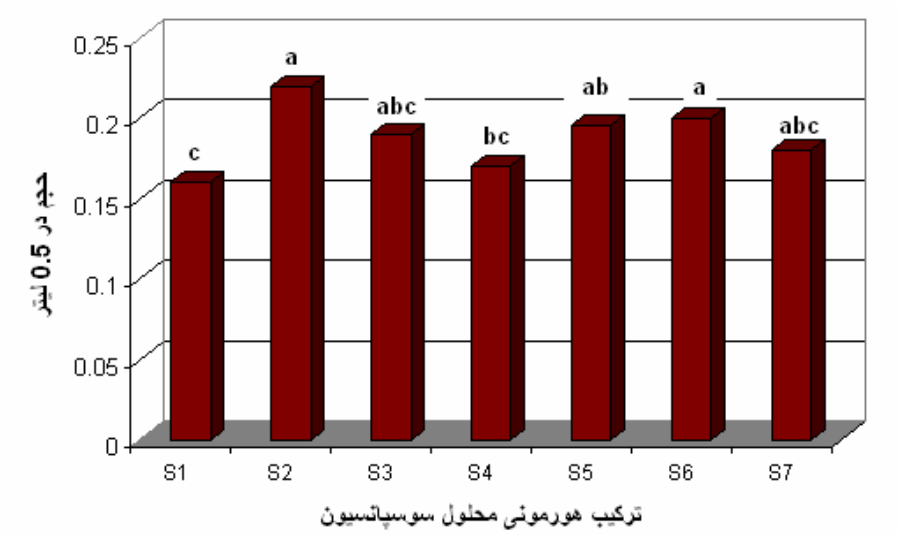
تجزیه واریانس صفت حجم ایستای سلول‌ها (جدول 5) نشان داد که تنظیم کننده‌های به کار رفته در این آزمایش در سطح احتمال ($p \leq 0/05$) با هم اختلاف معنی‌داری داشتند. مقایسه میانگین با روش دانکن (شکل 4) نشان داد که تیمار دوم با ترکیب 0/5 میلی گرم در لیتر BAP + 1 میلی گرم در لیتر 2,4-D بیشترین حجم ایستای سلول را تولید کرد. این ترکیب در آزمایش کالوس‌زایی نیز بالاترین عملکرد را دارا بود. پس از آن تیمار ششم با ترکیب 1 میلی گرم در لیتر BAP + 2 میلی گرم در لیتر 2,4-D بیشترین حجم ایستای سلول را تولید کرد. کمترین حجم ایستای سلول‌ها متعلق به تیمار یک با ترکیب 0/5 میلی گرم در لیتر KN + 1 میلی گرم در لیتر 2,4-D بود.

[1]- Settled Cell Volume



شکل 3- مقایسه تنظیم کنندهای رشد از لحاظ کالوس زایی در آزمایش کالوس زایی دوم.

Figure 3- Comparison of growth regulators for callus weight in the second trail.



شکل 4- مقایسه تنظیم کنندهای رشد از لحاظ صفت حجم ایستای سلول ها در آزمـایش سوسپانـسیون سلولی.

Figure 4- Comparison of growth regulators for settled cell volume in cell suspension trail. (S1=0.5mg/L KN+1mg/L 2-4-D, S2=0.5mg/L BAP+1mg/L 2-4-D, S3=1mg/L 2-4-D, S4= 0.5mg/L BAP+2mg/L 2-4-D, S5= 1mg/L BAP+2mg/L 2-4-D, S6= 1mg/L BAP+1mg/L 2-4-D, S7=Control).

تعداد سلول ها

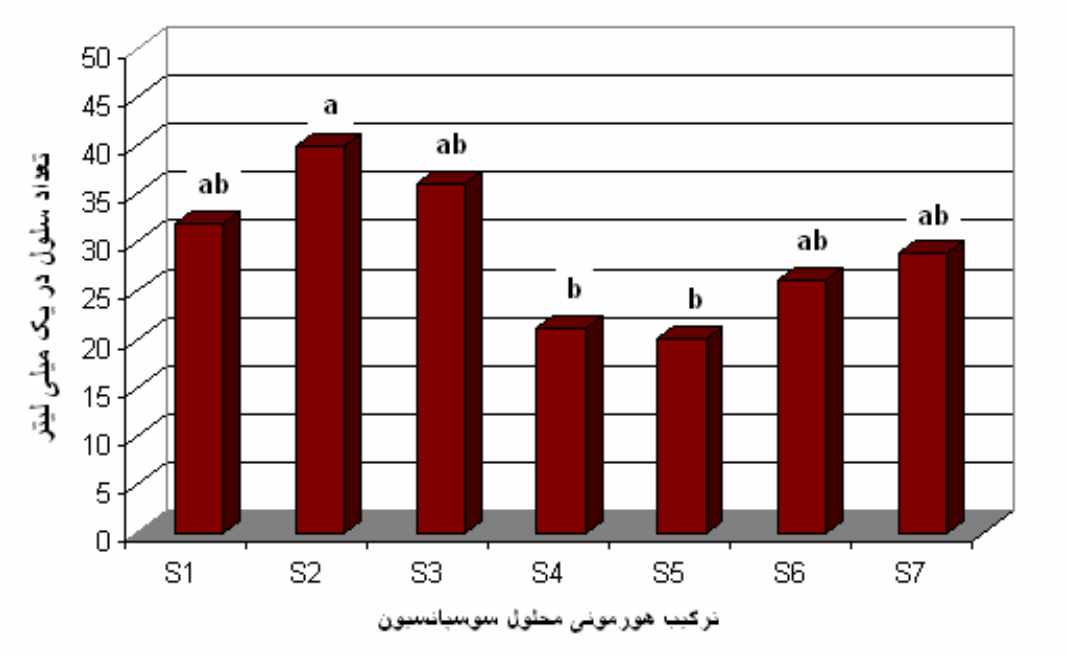
تجزیه واریانس صفت تعداد سلول (جدول 5)، برای تیمارهای سوسپانسیونی نشان داد که بین تیمارهای مختلف در سطح احتمال ($P\leq 0/01$) اختلاف معنی‌دار وجود دارد. مقایسه میانگین با روش دانکن (شکل 5) نشان داد که تیمار دوم با ترکیب 0/5 میلی گرم در لیتر BAP + یک میلی گرم در لیتر 2,4-D بیشترین تعداد سلول در بازه‌های زمانی مساوی در مقایسه با دیگر ترکیبات را تولید کرد. تیمار سوم و بعد از آن تیمار یک به ترتیب در جایگاه بعدی قرار گرفتند. کمترین تعداد سلول در سوسپانسیون حاوی تیمار پنجم با ترکیب یک میلی گرم در لیتر BAP + 2 میلی گرم در لیتر 2,4-D شمارش شد. در بررسی اشکال سلولی (شکل 6) تیمارهای سوم و هفتم سلول‌هایی با ابعاد کوچکتر نسبت به سایر تیمارها تولید کردند.

جدول 5- تجزیه واریانس صفات حجم ایستای و فشرده سلول‌ها، تعداد و وزن خشک سلول‌ها در آزمایش سوسپانسیون سلولی.

Table 4- Variance analysis of settled and packed cell volume, cell number and dried cell weight in cell suspension trail.

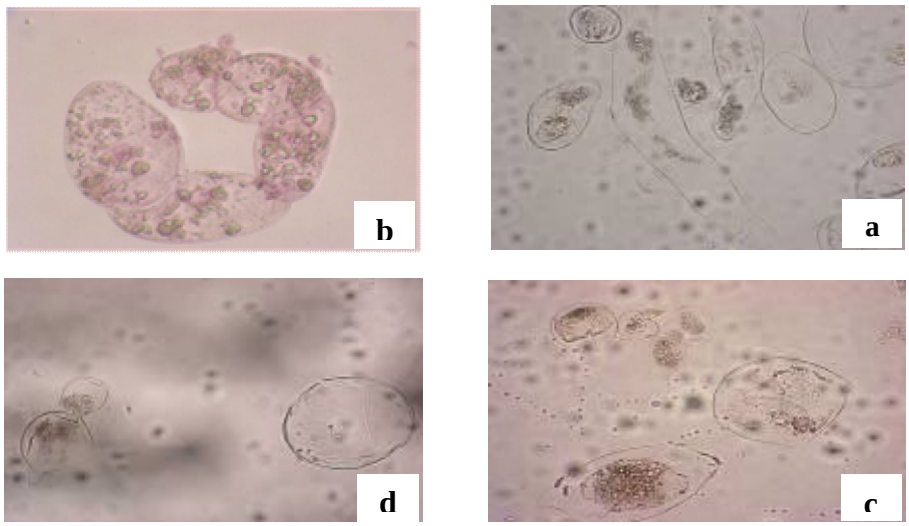
منبع تغییرات (S.O.V)	درجه آزادی (df)	میانگین مربعات (MS)			
		حجم ایستای سلول‌ها Settled cell volume	تعداد سلول ها Cell number	حجم فشرده سلول‌ها Packed cell volume	وزن خشک سلول ها Dried cell weight
تیمار (Treatment)	6	13.49*	168.1**	3.96 ns	0.031**
خطا (Error)	14	3.369	38.47	2	0.002
کل (Total)	20				

ns، * و **: به ترتیب غیر معنی دار، معنی دار در سطح احتمال 5 و 1درصد.



شکل 5- مقایسه تنظیم کنندهای رشد از لحاظ تعداد سلول در آزمایش سوسپانسیون سلولی.

Figure 5- Comparison of growth regulators for cell number in cell suspension trail. (S1=0.5mg/L KN+1mg/L 2-4-D, S2=0.5mg/L BAP+1mg/L 2-4-D, S3=1mg/L 2-4-D, S4= 0.5mg/L BAP+2mg/L 2-4-D, S5= 1mg/L BAP+2mg/L 2-4-D, S6= 1mg/L BAP+1mg/L 2-4-D, S7=Control).



شکل 6- تنوع شکل و اندازه سلول ها در سوسپانسیون سلولی a) سلول هـای سـیلندری و کـروی b) تشکیل توده سلولی c) تنوع در اندازه سلول های d) تقسیم سلولی. تصاویر سلول ها را بـا بزرگنمـایی 100× میکروسکوپ Nikon Y S 100 نشان می دهد.

Figure 6- Variation of cell size and figure in cell suspension a) Globular and cylindrical cells b) cell bulk construction c) Variation of cell size d) cell division.

حجم فشرده سلول ها[1] (PCV)

تجزیه واریانس صفت حجم فشرده سلول‌ها (جدول 5)، برای تیمار تنظیم کننده‌ها اختلاف معنی‌داری نشان نداد. به نظر می رسد حجم سلول‌های تولید شده در تیمارهای مختلف تنظیم کننده‌ها در حالت فشرده تفاوتی با یکدیگر ندارند و این شکل و چگالی سلول‌ها است که باعث تفاوت در حجم ایستای آن‌ها شده بود.

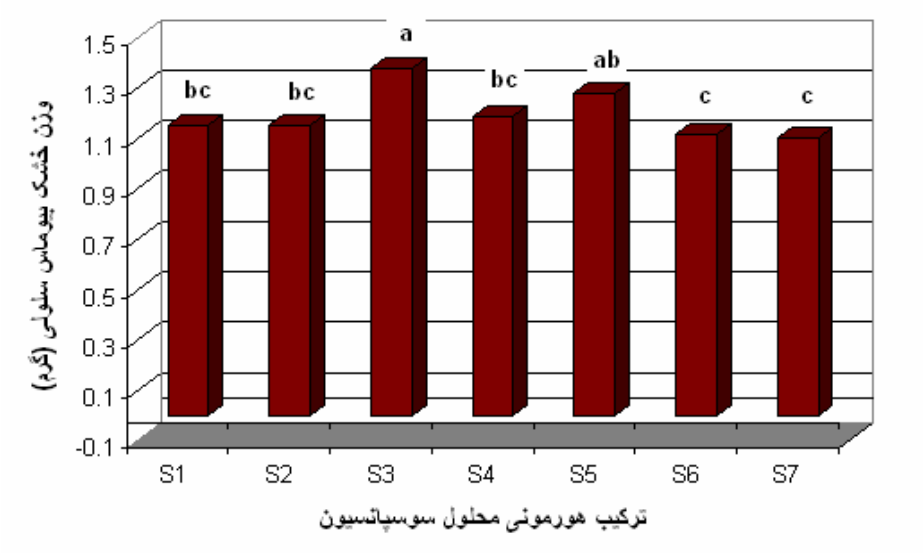
وزن خشک سلول‌ها

تجزیه واریانس وزن خشک سلول‌ها (جدول 5) نشان داد که بین تنظیم کننده‌های مختلف در سطح احتمال ($P\leq 0/01$) اختلاف معنی‌داری وجود دارد. مقایسه میانگین (شکل 7) با روش دانکن در سطح یک درصد نشان داد که تیمار سوم با ترکیب یک میلی گرم در لیتر 2,4-D و با تولید 1/38 گرم بیوماس بهترین تیمار شناخته شد. پس از آن تیمار پنجم (دو میلی گرم در لیتر 2,4-D + یک میلی گرم در لیتر BAP) بیشترین بیوماس را تولید کرد. این درحالی است که تیمار هفتم (شاهد) کمترین تولید بیوماس را نشان داد.

بحث

مقایسه میانگین ریزنمونه‌ها در آزمایش کالوس‌زایی اول نشان داد که بافت برگ بیشترین کالوس‌زایی و ریشه و ساقه در رتبه‌های بعدی قرار گرفتند. همچنین در آزمایش کالوس‌زایی دوم ریزنمونه برگ برون شیشه با بالاترین میانگین وزن کالوس در رتبه اول، ریزنمونه برگ درون شیشه در مرتبه دوم و ریزنمونه های ریشه، گره، ساقه و بذر در رتبه‌های بعدی قرار گرفتند. در تائید نتایج این آزمایش، Taha *et al.* (2008) در مقایسه بافت های مختلف در محیط کالوس‌زایی به این نتیجه رسیدند که برگ، ساقه و ریشه به ترتیب بیشترین میزان تولید کالوس را به خود اختصاص دادند. یافته‌های آن‌ها برای بافت برگ مطابق یافته‌های این تحقیق و برای بافت ریشه متضاد این تحقیق می‌باشد. Waileng and Laikeng (2004) نیز نتایجی مشابه یافته‌های این تحقیق در مقایسه بین بافت‌های ساقه و ریشه جهت کالوس‌زایی به دست آوردند. Mungole *et al.* (2009) نیز بافت برگ را بهترین بافت برای القا کالوس معرفی کردند. همچنین Pietrosiuk *et al.* (2007) بیشترین کالوس‌زایی را از بافت ریشه گزارش کرد که با یافته‌های آزمایش‌های کالوس-زایی اول این تحقیق تا حدودی تطابق دارد. در این آزمایش بیشترین میزان کالوس‌زایی با ترکیب یک میلی گرم در لیتر BAP + 2 میلی گرم در لیتر 2,4-D یا ترکیب 1/5 میلی گرم در لیتر BAP + 2 میلی گرم در لیتر 2,4-D برای ریزنمونه برگ مشاهده شد. در مشابهت با نتایج این آزمایش، یافته‌های Chen *et al.* (2005) نیز نشان داد که در ترکیب‌های 0/5 تا 2 میلی گرم در لیتر BAP + 0/5 تا یک میلی گرم در لیتر 2,4-D بهترین نتایج کالوس‌زایی قابل مشاهده است.

[1] -Packed cell volume



شکل 7- مقایسه میانگین تنظیم کننده‌های رشد از لحاظ وزن خشک در آزمایش سوسپانسیون سلولی.

Figure 7- Mean comparison of growth regulators for dried cell weight in cell suspension trail. (S1=0.5mg/L KN+1mg/L 2-4-D, S2=0.5mg/L BAP+1mg/L 2-4-D, S3=1mg/L 2-4-D, S4= 0.5mg/L BAP+2mg/L 2-4-D, S5= 1mg/L BAP+2mg/L 2-4-D, S6= 1mg/L BAP+1mg/L 2-4-D, S7=Control).

در آزمایش دوم از نظر میزان کالوس‌دهی MS2 (0/5 میلی گرم در لیتر BAP + 1 میلی گرم در لیتر 2,4-D) و MS6 (0/5 میلی گرم در لیتر KN+ 1 میلی گرم در لیتر 2,4-D) بیشترین کالوس را تولید کردند و ترکیب MS9 (1 میلی گرم در لیتر 2,4-D) با میانگین 0/41 در مرتبه دوم قرار گرفت. Taha *et al.* (2008) نیز از ترکیب 1 میلی گرم در لیتر KN + 1 میلی گرم در لیتر 2,4-D بیشترین کالوس را به دست آوردند و در آزمایش آن ها نیز ترکیب حاوی یک میلی گرم در لیتر 2,4-D در مرتبه دوم قرار گرفت. Shirin *et al.* (2007) نیز بیشترین کالوس‌زایی را در بافت‌های برگ و میان گره سیب زمینی از ترکیب 1 میلی گرم در لیتر KN + 1 میلی گرم در لیتر 2,4-D به دست آوردند. با توجه به مقایسه میانگین‌ها می‌توان نتیجه‌گیری کرد که بین اکسین-های به کار رفته در این آزمایش، ترکیبات حاوی 2,4-D بالاترین سطوح تولید کالوس را به خود اختصاص داده‌اند و ترکیبات حاوی NAA از لحاظ صفت کالوس‌زایی در جایگاه بعدی قرار دارند. در تائید این نتیجه Gurel *et al.* (2001) نیز طی آزمایشی به این نکته اشاره کردند که در ارتباط با القا کالوس 2,4-D بسیار موثرتر از NAA در تمامی ریزنمونه‌های مورد آزمایش عمل کرده است. در این آزمایش مشاهده شد که مقادیر کم سیتوکینین‌ها در محیط حاوی اکسین تاثیر مطلوبی بر کالوس‌زایی دارد، همان طور که در بسیاری گونه‌های دیگر استفاده از مقادیر اندک سیتوکینین توصیه شده است (Kwon *et al.*, 1993; Ozgen *et al.*, 1998; Zhao *et al.*, 2001). لزوم وجود تنظیم کننده‌های اکسینی مانند

2,4-D برای شروع کالوس‌زایی در سایر گونه‌های علفی نیز مشاهده شده است (Hussain *et al.*, 2010; Taha *et al.*, 2008). در مورد BAP و KN به سختی می‌توان ثابت کرد که یکی بر دیگری در القا کالوس برتری دارد. در هر حال غلظت‌های پایین سیتوکینین‌ها (0/5 میلی گرم در لیتر) در کالوس‌زایی موثرتر بودند. از نظر صفت حجم ایستای سلول‌ها در مقایسه تیمارهای سوسپانسیونی مشخص شد که تیمار دوم با ترکیب 0/5 میلی گرم در لیتر BAP + 1 میلی گرم در لیتر 2,4-D بیشترین حجم ایستای سلول را تولید کرد که این ترکیب در آزمایش کالوس‌زایی نیز بالاترین عملکرد را دارا بود. اما باید توجه داشت که این شاخص صرفا جهت تخمین میزان رشد در کشت ها اندازه‌گیری شد، زیرا میزان دقیق رشد با توجه به حجم سلول‌ها و با در نظر گرفتن این که سلول‌ها از لحاظ اندازه، شکل و چگالی می‌توانند بسیار متغیر باشند، با این روش امکانپذیر نمی‌باشد.

در بررسی اشکال سلول‌ها در تیمارهای سوسپانسیونی مشاهده شد که تیمارهای سوم و هفتم سلول‌هایی با ابعاد کوچکتر نسبت به سایر تیمارها تولید کردند. با توجه به این که تیمار هفتم به عنوان تیمار شاهد (فاقد تنظیم کننده‌ها) بود، کوچکتر بودن ابعاد سلول‌ها را می توان به عدم وجود تنظیم کننده‌ها در محیط تیمار شاهد نسبت داد. تیمار سوم نیز حاوی یک میلی گرم در لیتر 2,4-D و بدون تنظیم کننده سیتوکینینی بود. از آنجا که اکسین‌ها اثر مستقیمی بر رشد سلولی دارند (Piri and Nazarian, 2001)، مشاهده تیمار سوم با سلول‌های کوچکتر با یافته‌های مربوط به اثر اکسین‌ها بر رشد سلولی تناقض دارد. در جمع بندی از این آزمایش مشخص شد که از بین اکسین‌ها 2,4-D و از سیتوکینین-ها BAP و پس از آن KN برای کالوس‌زایی مناسب‌ترین گزینه‌ها بودند. تیمار یک میلی گرم در لیتر 2,4-D به تنهایی و یا به همراه 0/5 میلی گرم در لیتر BAP و یا 0/5 میلی گرم در لیتر KN بهترین نتایج کالوس‌زایی را در پی داشتند. در محیط سوسپانسیون سلولی برای حداکثر وزن خشک حضور 2,4-D در محیط کشت ضروری است. همچنین تنظیم کننده BAP در محیط مایع نیز از KN عملکرد بهتری داشت. بیشترین وزن خشک سلولی را یک میلی گرم در لیتر 2,4-D و دو میلی گرم در لیتر 2,4-D به همراه یک میلی گرم در لیتر BAP دارا بودند.

منابع

Chen LJ, Zhu XY, Gu L, Wu J (2005). Efficient callus induction and plant regeneration from anther of Chinese narcissus Narcissus tazetta L. var. chinensis Roem. Plant Cell Reports 24: 401-407.

Dutta A, Singh S, Kumar S, Sen J (2007). Transcript profiling of terpenoid indole alkaloid pathway genes and regulators reveals strong expression of repressors in Catharanthus roseus cell cultures. Plant Cell Reports 26: 907-915.

Gurel S, Gurel E, Kaya Z (2001). Callus development and indirect shoot regeneration from seedling of sugar beet (Beta vulgaris L.) cultured in vitro. Turkish Journal of Botany 25: 25-33.

Hussain Z, Haroon M, Bano R, Rashid H, Chaudhry Z (2010). Protocol optimization for efficient callus induction and regeneration in three Pakistani rice cultivars. Pakistan Journal of Botany 42: 879-887.

Kwon TH, Abe T, Sasahara T (1993). Efficient callus induction and plant regeneration in Sesamum species. Plant Tissue Culture Letters 10: 260-266.

Lee E, Mobin M, Hahn EJ, Paek KY (2006). Effects of sucrose, [noculum density, auxins, and aeration volume on cell growth of Gymnema sylvestre. Journal of Plant Biology 49: 427-431.

Mujib A, Bandhyopadhyay S, Ghosh PD (2000). Tissue culture derived plantlet variation in Caladium an important ornamental. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 10: 149-155.

Mungole A, Awati R, Dey S, Chaturvedi A, Zanwar P (2009). In-vitro callus induction and shoot regeneration in Ipomoea obscura (L.): potent Indian medicinal plant. Indian Journal of Science and Technology 2: 24-26.

Ozgen M, Türet M, Altinok S, Sancak C (1998). Efficient callus induction and plant regeneration from mature embryo culture of winter wheat (*Triticum aestivum* L.) genotypes. Plant Cell Reports 18: 331-335.

Phillips GC, Hubstenberger JF, Hansen EE (1995). Plant regeneration by organogenesis from callus and cell suspension cultures. In: Gamborg OL, Phillips GC (eds), Plant Cell, Tissue and Organ Culture, pp. 67-78. Heidelberg: Springer and Verla.

Pietrosiuk A, Furmanowa M, Lata B (2007). *Catharanthus roseus*: micropropagation and in vitro techniques. Phytochem Reviews 6: 459-473.

Piri Kh, Nazarian F (2001). Plant Tissue Culture. Bu Ali Sina Press.

Sato F, Hashimoto T, Hachiya A (2001). Metabolic engineering of plant alkaloid biosynthesis. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 98: 367-372.

Senoussi MM, Nora B, Joe C (2009). Impact of hypoxia on the growth and alkaloid accumulation in *Catharanthus roseus* cell suspension. Acta Physiologiae Plantarum 31: 359–362.

Shirin F, Hossain M, Kabir MF, Roy M, Sarker SR (2007). Callus induction and plant regeneration from intermodal and leaf explants of four potato (*Solanum tuberosum* L.) cultivars. World Journal of Agricultural Sciences 3: 1-6.

Taha HS, El-Bahr MK, Seif-El-Nasr MM (2008). *In vitro* studies on egyptian *Catharanthus roseus* (L.) G. Don.: 1- calli Production, direct shootlets Regeneration and alkaloids determination. Journal of Applied Sciences Research 4: 1017-1022.

Valluri JV (2009). Bioreactor production of secondary metabolites from cell cultures of Periwinkle and Sandalwood. Methods in Molecular Biology 547: 325-335.

Verpoorte R, van der Heijden R, Van Gulik W (1991). Plant biotechnology for the production of alkaloids: Present status and prospects. In: Brossi A, (ed). The Alkaloids. Vol 40. New York: Academic Press.

WaiLeng L, LaiKeng C (2003). Establishment of Orthosiphon stamineus cell suspension culture for cell growth. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 78: 101-106.

Waileng LW, LaiKeng C (2004). Plant regeneration from stem nodal segments of Orthosiphon stamineus banth., a medicinal plant with diuretic activity. *In vitro* Cellular and Developmental Biology - Plant 40: 115-118.

Xu M, Dong J (2005). Nitric oxide stimulates indole alkaloid production in *Catharanthus roseus* cell suspension cultures through a protein kinase-dependent signal pathway. Enzyme and Microbial Technology 37: 49-53.

Yokoyama M, Inomata S (1998). *Catharanthus roseus* (periwinkle): in vitro culture and high level production of Arbutine by biotransformation. Biotechnology in Agriculture and Forestry 41: 67-80.

Zhao J, Zhu WH, Hu Q, Guo YQ (2001). Compact callus cluster suspension culture of *Catharanthus roseus* with enhanced indol alkaloid biosynthesis. In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant 37: 68-72.

Zhao J, Zhu WH, Hu Q (2001). Effects of light and plant growth regulators on the biosynthesis of vindoline and other indole alkaloids in *Catharanthus roseus* callus cultures. Plant Growth Regulation 33: 43-49.

Optimization of Callus Induction and Cell Suspension in *Catharanthus roseus*

Ahmadi J. [*1], Mohammadi R. [2], Garousi Gh.[3], Hosseini R. [3]

[1] Associate Professor of Imam Khomeini International University, Qazvin, Iran.
[2] M.Sc. Student of Imam Khomeini International University, Qazvin, Iran.
[3] Assistant Professor, Imam Khomeini International University , Qazvin, Iran.

Abstract

Periwinkle (*Catharanthus roseus*) has been considered as an important medicinal plant because it contains many alkaloids such as vincristine and vinblastine. *In vitro* culture of periwinkle provides new tissue sources such as callus, cell suspension and seedlings to produce secondary metabolites. As for the mass production of callus and cell suspension in order to optimize the extraction of secondary metabolites have been few studies, the present study describes two callus production optimization procedures and one cell suspension experiment. The first trail was a factorial experiment with three explants (roots, shoots and leaves) on Murashige and Skoog (MS) medium supplemented with different concentrations of BAP and 2,4-D. The second trial was a factorial experiment with six explants (roots, shoots, *in-vitro* grown leaves, *ex-vitro* grown leaves, seeds and nodes) and ten different hormonal combinations. The cell suspension experiment was conducted with six hormonal and one control (without hormone) treatments based on completely randomized design. Comparison of means showed that the maximum callus production was obtained from leaf explants, the root and shoot explants were in the second orders. In overall, 0.5 mg /l BAP + 1 mg/l 2,4-D and 0.5 mg /l KN + 1 mg/l 2,4-D concentrations proved to be optimal for the production of maximum callus. The best combination for suspension culture was 1 mg/l 2,4-D and/or 2 mg/l 2,4-D+1 mg /l BAP according to the dried cell weight.

Key words: *periwinkle, callus. Suspension culture, In vitro.*

[*] Corresponding Author: Ahmadi J. Tel: 09123128278 Email: njahmadi910@yahoo.com