اثر غلظت‌های مختلف تنظیم کننده‌های رشد بر القای کالوس در گیاه دارویی پروانش (*Catharanthus roseus* L.)

محبوبه ناصری*[۱]، سعیده فیروزبخش[۲]

۱- استادیار گروه تولیدات گیاهی دانشگاه تربت‌حیدریه

۲- دانش آموخته کارشناسی زیست‌فناوری کشاورزی دانشگاه تربت‌حیدریه

M.naseri@torbath.ac.ir

چکیده

پریوش .*Catharantus roseus* L گیاهی گرمسیری قدیمی و چند ساله است که با داشتن طیف وسیعی از آلکالوئیدها مورد توجه داروسازان می‌باشد. قسمت‌های دارویی گیاه شامل برگ‌ها و ریشه است. فناوری کشت بافت تکثیر بافت یا اندام‌ها از جمله کالوس، سوسپانسیون سلولی و گیاهچه، برای تولید متابولیت‌های ثانویه در مقیاس انبوه را مقدور ساخته است. در همین راستا به منظور بهینه‌سازی تولید کالوس در گیاه دارویی پروانش آزمایشی در آزمایشگاه کشت بافت گیاهی دانشگاه تربت حیدریه در قالب طرح کامل تصادفی به صورت فاکتوریل با سه نوع ریزنمونه لپه، ساقه‌چه و ریشه و ترکیب سطوح تنظیم‌کننده‌های رشد اکسین (2,4-DorNAA IBA or) و سایتوکنین (BAP or Kin or Zeatin) در دو مرحله انجام شد. غلظت تنظیم کننده‌های به کار برده شده در مراحل اول (2,3,4mg/L) 2,4-D or IBA or NAA و در مرحله دوم (2mg/l)2,4-D +BAP or Kin orZeatin (0.2,0.5,1.0mg/L) انتخاب شد. آنالیز داده‌ها با کمک نرم‌افزار SPSS صورت گرفت. طبق آنالیز بهترین نتایج برای القای کالوس‌زایی درمرحله اول (2.4-D) 2mg/l و در مرحله دوم (BAP) 0.2mg/l + (2.4-D) 2mg/l بود.

واژه‌های کلیدی: القای کال‌زایی، کشت درون شیشه، آلکالوئید، سوسپانسیون سلولی

مقدمه

پریوش[۱] یک گیاه دارویی و متعلق به خانواده خرزهره[۲] است. این گیاه مجموعه متنوعی از متابولیت‌های ثانویه را در اندام‌های مختلف خود سنتز می‌کند. برگ‌ها و ساقه‌های گیاه پریوش منابع مهمی از آلکالوئیدهای دیمریک[۳] وین‌بلاستین[۴] و وین‌کریستین[۵] هستند که از داروهای ضدسرطان می‌باشند. در ریشه‌های این گیاه آلکالوئیدهای سرپنتین[۶] و آجمالیسین[۷] که ضد فشار خون هستند، تجمع می‌یابند [۹]. با توجه به افزایش شدید جمعیت در چند سده اخیر به دنبال آن شاهد شیوع چشمگیر بیماری‌های صعب العلاج همچون سرطان هستیم که برای تأمین داروهای مورد نیاز درمان، سالانه هزینه‌های هنگفتی از کشور خارج می‌گردد. وینکریستین و وین بلاستین از جمله داروهای ارزشمندی بوده که در شیمی درمانی مورد استفاده قرار می‌گیرند. وین کریستین در تومور ویلمز و تومور سلول‌های تخمدان مصرف می‌شود و وین بلاستین هم در درمان تومورهای

1- *Catharantus roseus* L.
2- Apocynaceae
3- Demeric
4- Vinblastine
5- Vincristine
6- Serpentine
7- Ajmalicine

تروفوبلاستیک[1] و تومور تخمدان مورد استفاده قرار می‌گیرد. کشت بافت با وجود هزینه و سرمایه زیاد و همچنین نیاز به نیروی متخصص توانسته است راهی عملی در جهت تولید محصولات متابولیتی منحصر به فرد ایجاد نماید که ساختن مصنوعی آنها به دلیل مشکلات تکنیکی، مقدور نیست [۲]. ساختار پیچیده بسیاری از متابولیت‌های ثانویه باعث شده که نتوان آنها را به صورت مصنوعی سنتز نمود و لذا تنها منبع تولید آن‌ها سلول گیاه و سپس تشکیل کالوس از طریق کشت ریزنمونه می‌باشد. استفاده از کشت بافت و سلول گیاهی ابزار قدرتمندی برای تولید متابولیت‌های ثانویه محسوب می‌شود از جهت دیگر روشی مناسب جهت تکثیر آسان برای تولید گیاهان یکسان از نظر ژنتیکی و افزایش مادهموثره می‌باشد [۸].

با توجه به اینکه ترکیبات مذکور قیمت بالایی دارند و میزان آلکالوئیدهای گیاه پریوش کم می‌باشد محققین از روش کشت بافت برای افزایش تولید آلکالوئیدهای گیاه پریوش استفاده می‌کنند. در همین راستا در این تحقیق یک مرحله از مراحل لازم برای تولید انبوه این مواد موثره با کمک فناوری کشت بافت بررسی شد.

مواد و روش‌ها

ابتدا به منظور تهیه گیاهان استریل و عاری از بیماری بذرهای پروانش به روش قایقی و به صورت هیدروپونیک با استفاده از آب معدنی در تاریخ ۱۳۹۷/۸/۱۲ کشت شدند، بذور مربوط از شرکت پاکان بذر اصفهان تهیه گردید. ۱۷ روز پس ازکشت بذور در شرایط درون شیشه، گیاهچه‌هایی حاوی ساقه‌چه[2] ، لپه[3] و ریشه‌چه[4] رشد کردند که از هریک از بخش‌های حاصل، ریز نمونه مناسب جهت کشت در محیط MS, حاوی غلظت مشخص از تنظیم کننده‌های رشد تهیه شد. به منظور بررسی غلظت‌های متفاوت تنظیم کننده‌های رشد در القای کالوس‌زایی در گیاه دارویی پروانش دو مرحله آزمایش طراحی گردید که در اولین مرحله بررسی برای سه نوع از تنظیم کننده‌های رشد اکسین ؛2,4-D or IBA or NAA در غلظت‌های متفاوت صورت گرفت (2,3,4mg/L) سپس در مرحله دوم به منظور بررسی القای کال‌زایی از تلفیق تنظیم کننده‌های رشد اکسین[5] و سایتوکنین[6] استفاده شد. اکسین مورد استفاده بهترین غلظت حاصل از آزمایش اول بود که در کمترین زمان کال‌زایی را القا کرده و پس از گذشت مدت مقرر بیشترین وزن کالوس تازه را تولید کرده بود و سایتوکنین مورد استفاده هم در سه غلظت کم متوسط وبالا از سه نوع سایتوکنین (2,4-D (2mg/l) + BAP or Kin or Zeatin (0.2, 0.5 , 1.0 mg/L)) استفاده گردید.
برای هر تیمار ۶۰ میلی‌گرم بر لیتر محیط کشت تهیه که برای هر تکرار معادل ۲۰ میلی‌گرم بر لیتر تخمین زده شد. آزمایش در قالب طرح کاملا تصادفی با مجموع هجده تیمار، برای هر مرحله ۹ تیمار و سه تکرار برای هر تیمار در دانشگاه تربت‌حیدریه اجرا و در انتها کشت بافت در تاریخ ۱۳۹۷/۱۲/۲۵ صورت گرفت در هر ویال بیست و هفت ریزنمونه، از هر یک از ریز نمونه‌های ساقه‌چه، لپه و ریشه‌چه بودند، انجام شد.
غلظت‌های مورد استفاده از دو تنظیم کننده رشد اکسین و سایتوکنین در دو مرحله به شرح زیر بود :

مرحله اول:

a- MS + 2,4-D or IBA or NAA (2, 3, 4 mg/L):

---

[1]- Trophoblastic
[2]- Plumule
[3]- Cotyledon
[4]- Root
[5]- Auxin
[6]- Cytokine

T1: 2mg/l (2.4-D), T2: 3mg/l (2.4-D), T3: 4mg/l (2.4-D), T4: 2mg/l (IBA), T5: 3mg/l (IBA), T6: 4mg/l (IBA), T7: 2mg/l(NAA), T8: 3mg/l (NAA), T9: 4mg/l (NAA)

مرحله دوم:

b- MS + 2,4-D(2 mg/l) + BAP or Kin or Zeatin (0.2, 0.5 , 1.0 mg/L):

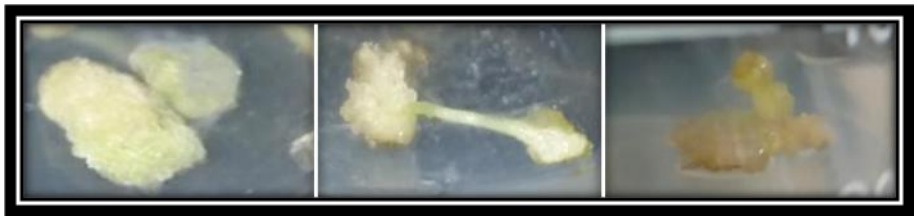
T10: 2 mg/l (2.4-D) + 0.2mg/l (BAP), T11: 3 mg/l (2.4-D) + 0.5mg/l (BAP), T12: 4 mg/l (2.4-D) + 1.0mg/l (BAP), T13: 2 mg/l (2.4-D) + 0.2mg/l (Kin), T14: 3 mg/l (2.4-D) + 0.5mg/l (Kin), T15: 4 mg/l (2.4-D) + 1.0mg/l (Kin), T16: 2 mg/l (2.4-D) + 0.2mg/l (zeatin), T17: 3 mg/l (2.4-D) + 0.5mg/l (zeatin), T18: 4 mg/l (2.4-D) + 1.0mg/l (zeatin)

برای تنظیم pH در بازه ۵/۶ تا ۵/۸ از محلول رقیق NaOH به عنوان باز و HCl به عنوان اسید استفاده شد. میزان ساکارز سی گرم بر لیتر و آگار هم هشت گرم بر لیتر مورد استفاده قرار گرفت. ریز نمونه‌های کشت شده در ژرمیناتور دانشگاه تربت-حیدریه در دمای ۲۶ درجه سانتی‌گراد با دور ۱۶ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی قرار گرفتند. جهت بررسی تاثیر تنظیم کننده‌های رشد بر القای کالوس‌زایی و کیفیت کالوس‌های حاصل صفت‌های مورد بررسی زمان آغاز تشکیل کالوس و وزن تازه کالوس در نظر گرفته شدند که آنالیز داده‌ها با کمک نرم افزار IBM Statistics SPSS version 23 صورت گرفت.

نتایج و بحث

در اولین مرحله از آزمایش تیمار 2,4-D با غلظت دو میلی‌گرم بر لیتر درمدت زمان کمتری نسبت به سایر تیمارهای IBA و NAA تشکیل کالوس را برای ریز نمونه‌های لپه، ساقه‌چه و ریشه‌چه موجب شد. همچنین میانگین وزن تر کالوس برای تیمار اکسین برای هر سه ریز نمونه لپه، ساقه‌چه و ریشه‌چه نسبت به سایر تیمارها قابل توجه بود. در آزمایش دوم که هدف بررسی کال‌زایی با تلفیق تنظیم کننده‌های اکسین و سایتوکنین بود تنظیم کننده بهینه در مرحله اول همراه با BAP با غلظت ۰/۲ میلی‌گرم بر لیتر، نتایج مناسب‌تری نسبت به سایر تنظیم کننده‌های کینتین[1] و زئاتین[2] در غلظت‌های متفاوت‌شان نشان داد.

T1: 2mg/l (2.4-D)



T10: 2 mg/l (2.4-D) + 0.2mg/l (BAP)

شکل ۱- کالوس‌های T1 و T10 ثبت شده برای ریزنمونه‌های از راست به چپ ساقه چه، لپه و ریشه‌چه

[1]- Kinetin
[2]- Zeatin

نقش اکسین‌ها دررشد و نمو گیاهان متنوع است، ازجمله این که در غلظت‌های پایین موجب تشکیل جوانه می‌شوند. تعدادی از اکسین‌ها به خصوص 2,4-D تشکیل جنین‌های سوماتیکی را القا کرده و تقسیم سلولی را باعث می‌شوند. اکسین در تشکیل کالوس نیز نقش دارند و از رشد جوانه های جانبی و ریشه جلوگیری می‌کنند. سیتوکنین نیز همانند اکسین‌ها به دو گروه طبیعی همانند 2ip(6-γ-γ-Dimethylallylaminopurine) و مصنوعی همانند TDZ تقسیم می‌شوند. سیتوکنین‌ها درغلظت‌های بالا تشکیل جوانه را موجب شده و از تشکیل ریشه جلوگیری می‌کنند. این دسته از تنظیم کننده‌های رشد، موجب تقسیم سلولی شده و رشد و تشکیل کالوس را سبب می‌شوند [۳]. اکسین‌ها به خصوص 2,4-D تشکیل جنین‌های سوماتیکی را القا کرده و تقسیم سلولی را باعث میشوند، این تنظیم کننده‌های رشد در تشکیل کالوس نیز نقش داشته و از رشد جوانه‌های جانبی و ریشه جلوگیری می‌کنند. سیتوکینین‌ها نیز در غلظت‌های بالا تشکیل جوانه را موجب شده و از تشکیل ریشه جلوگیری می‌کنند [۳]. انتخاب یک ریز نمونه در مرحله رشد مطلوب نقش اساسی در موفقیت‌آمیز بودن کشت بافت در شرایط درون شیشه بازی می‌کند. پیچیدگی مورفولوژیکی یک ریزنمونه به همراه انتخاب تنظیم کننده‌های رشد گیاهی مناسب، تاثیر چشم‌گیری بر باززایی نوساقه‌ها و القای کالوس دارد (۵) هرچند که سن ریزنمونه‌ها و نحوه قرار گرفتن آنها روی محیط کشت نیز حائز اهمیت است [۷]. اساس کالوس یک بافت توموری گیاهی کم و بیش سازمان نیافته است که از زخم‌های بافت‌ها و اندام‌های تمایز یافته به وجود می‌اید. بنابراین کالوس تودهای بیشکل از سلول های پارانشیمی سازمان نیافته و با دیواره نازک است که در حقیقت پاسخی حفاظتی به جراحت می‌باشد. بافت ریز نمونه، یک بافت تمایز یافته است که به عنوان ماده آغازین برای تولید کالوس مورد استفاده قرار می‌گیرد. در طی تشکیل کالوس‌ها در شرایط درون شیشه‌ای، تمایز و اختصاصی شدن سلولهای مادری متوقف شده و سلولهای ریز نمونه تمایززدایی می‌شوند. فرایند تمایززدایی نیز با تغییر فعالیت متابولیکی سلول همراه است [۱]. بافت کالوس بسته به گونه گیاهی می‌تواند سفت و سخت (به علت وجود لیگنین) و یا ترد و شکننده باشد.

تنوع در فراوانی تولید کالوس در پاسخ به سطوح مختلف هورمونی، می‌تواند به دلیل تمایز در بیان ژن‌های کنترل کننده تولید کالوس باشد. همچنین ممکن است که در بعضی از سطوح هورمونی مورد استفاده، برخی از ژن‌های مسئول در سنتز کالوس، به طور کامل بیان نشوند [۶]. از جمله عواملی که در تولید کالوس موثراند، ژنوتیپ، تنظیم کننده‌های رشد، محیط کشت، نوع هیدرات کربن، نوع جداکشت، سن جداکشت و شرایط محیطی می‌باشد. نتایج نشان داده است که وابستگی خاص القای کالوس و باززایی گیاه به ژنوتیپ اجتناب ناپذیر و کلی است و القای کالوس و باززایی گیاه با ژنوتیپ گیاه تغییر می‌کند [۴]. به علاوه، گزارش شده است که غلظت‌های خیلی زیاد 2,4-D ممکن است برای بیان ژنهای درگیر در تقسیم سلولی و تمایززدایی بافت مهار کننده باشد [۶]. چندین گزارش وجود دارد مبنی بر اینکه عموماً استفاده از هورمون 2,4-D سبب توقف اندام‌زایی و تمایزیابی بافت‌ها شده و کال‌زایی را تسریع می‌کند [۱۰]. در این تحقیق مدت زمان کالوس زایی کمتر از بیست روز بود علت می‌تواند به این خاطر باشد که از نوع بافت و غلظت تنظیم کننده رشد نسبت به آزمایش متفاوت بود [۱۰].از جهتی ریز نمونه‌های کشت شده در آزمایش حاضر حدود ۱۷ روز سن داشتند که همین امر هم در القای کالوس‌زایی بی تاثیر نبود. از بین اکسین‌ها 2,4-D قدرت زیادی برای تولید کالوس دارد مهم‌ترین سیتوکنین در تولید کالوس نیز BAP می‌باشد که اغلب غلظت‌های ۰/۵ تا ۵ میکرومولار آن برای تولید کالوس استفاده می‌شود [۲].در تحقیق حاضر هم از تیمار هورمونی تلفیقی اکسین (2,4-D) و سایتوکنین (BAP) بهترین نتیجه‌گیری برای بهینه‌سازی تولید کالوس مشاهده شد.

نتیجه‌گیری

در اولین مرحله از آزمایش تیمار 2,4-D با غلظت دو میلی‌گرم بر لیتر درمدت زمان کمتری نسبت به سایر تیمارهای IBA و NAA تشکیل کالوس را موجب شد. همچنین میانگین وزن تر کالوس برای تیمار مذکور نسبت به سایر تیمارها بهتر بود. در

آزمایش دوم هم 2,4-D با غلظت دو میلی‌گرم بر لیتر همراه با BAP با غلظت ۰/۲میلی‌گرم بر لیتر بـه صـورت کلـی، نتـایج مناسب‌تری نسبت به سایر تنظیم کننده‌های کینتین و زئاتین در غلظت‌های متفاوت‌شان نشان داد، به همـین منظـور غلظـت مذکور غلظت مناسبی جهت القای کال‌زایی برای گیاه دارویی پروانش در آزمایشات کشت بافتی معرفی می‌شود.

مراجع

1- Assareh, M.H, Sardabi, H., 2007. Eucalyptus, volume 1 Description, Illustration and Propagation by Advanced Techniques, Research Institute of Forests and Rangelands, Tehran, Iran.
2- Bajaj, Y.P.S., Furmanowa, M. and Olszowska, O. 1988. Biotechnology of micropropagation of medicinal and aromatic plants. In: Bajaj Y P S (Ed.). Springer-Verlag, New York, 68 p.
3- DeKlerk. G.J., 2006. Plant hormone in tissue culture. Plant Cell and Tissue Culture Phytopathology Biochemical, P 17-25.
4- Han Y, Jin X, Wu F, Zhang G .2011. Genotypic differences in callus induction and plant regeneration from mature embryos of barley (Hordeum vulgare L.). Journal of Zhejiang University Science 12: 399-407.
5- Khawar KM, Sarýhan E, Sevimay C, Cocu S, et al. 2005. Adventitious shoot regeneration and micropropagation of Plantago lanceolata L. Periodicum Biologorum 107: 113- 116.
6- Mahmood I, Razzaq A, Khan ZUD, Hafez IA, Kaleem S (2012). Evaluation of tissue culture responses of promising Wheat (Triticum aestivum L.) cultivars and development of efficient regeneration system. Pakistan Journal of Botany 44: 277-284.
7- Neibaur I, Gallo M, Altpeter F .2008. The effect of auxin type and cytokinin concentration on callus induction and plant regeneration frequency from immature inflorescence segments of seashore paspalum (Paspalum vaginatum Swartz). 5TIn Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant5T 44: 480-486.
8- Ravishankar, G. A. and Venkataraman, L. V. 1998. Rapid multiplication of plants from cultured axillary buds of Mentha piperita. Philippine Journal of Science 117(2): 121- 129

9- Srivastava NK, Srivastava AK. Influence of Some Heavy Metals on Growth, Alkaloid Contentand Composition in Catharanthus roseus LIndian J Pharm Sci. 2010; 72(6): 775–8.
10- 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.

Effect of Different Concentrations of Growth Regulators on Callus Induction in *Catharantus roseus* L.

Mahboobeh Naseri and Saeideh Firouzbakhsh
Assistant Professor, Department of Plant Production, Torbat Heydariyeh University
BSc in Biotechnology, Torbat Heydariyeh University
M.naseri@torbath.ac.ir

Periwash (*Catharantus roseus* L.) is a tropical and perennial herb that is of interest to pharmacists with a wide range of alkaloids. Medicinal parts of the plant include leaves and roots. Tissue culture technology, proliferation of tissue or organ such as callus, suspension and damping, for the production of secondary metabolites produced on a mass scale is possible. In this regard, in order to optimize callus production in the experimental mussel plant in plant tissue culture laboratory of Torbat-e-Heydariyeh University in a completely randomized design with three types of cotyledon, shoot and root explants and combination of auxin growth regulators 2- 4-D or NAA IBA and cytokinin (BAP or Kin or Zeatin) were performed in two stages. Data analysis was performed using SPSS software. The best results for induction of callus formation were 2mg / l (2.4-D) in the first step and 2mg / l (2.4-D) + 0.2mg / l (BAP) in the second step.

Key word: Alkaloids, Cell suspension, Induction of cal genesis, in vitro culture, alkaloids, cell suspension