باززایی غیرمستقیم پروانش (*Catharanthus roeus* L.) از طریق کشت ریزنمونه‌های برگ و ترکیبات مختلف تنظیم کننده‌های رشد گیاهی

مجید طالبی[۱*]، فروغ اعتصام[۱] و بدرالدین ابراهیم سیدطباطبایی[۱]

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۰/۷/۱۰ ؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۰/۱۰/۱۰)

چکیده

پروانش (*Catharanthus roeus* L.) گیاهی است از خانواده آپوسیناسه و حاوی بیش از ۱۳۰ نوع آلکالوئید ایندولی ترپنوئیدی (TIAs) ازجمله دو آلکالوئید دایمری وین‌بلاستین و وین‌کریستین که دارای خاصیت ضد تومور بوده و برای درمان بسیاری از سرطان‌ها به کار می‌روند. به همین دلیل، تاکنون تحقیقات زیادی در زمینه تولید این داروها از طریق کشت بافت گیاهی صورت گرفته است. در این پژوهش، با هدف تعیین بهترین ترکیب هورمونی در محیط کشت آزمایشگاهی برای باززایی غیرمستقیم گیاه پروانش، ۲۵ ترکیب هورمونی برای تولید کالوس از ریزنمونه برگ و هفت تیمار برای باززایی کالوس‌ها در نظر گرفته شد. نتایج تجزیه واریانس نشان داد که اثر تیمارهای هورمونی مختلف در تولید کالوس از ریزنمونه برگ در سطح ۱٪ معنی‌دار است. تیمارهای ۰/۱ و ۵ میلی‌گرم در لیتر BAP و NAA به ترتیب علاوه بر تولید کالوس فراوان، ریشه زیادی نیز تولید کردند. در بین تیمارها، محیط‌های غذایی حاوی زغال فعال برای تولید کالوس و محیط‌های بدون زغال برای باززایی مناسب تشخیص داده شدند. به طور کلی، نتایج حاصل از این پژوهش نشان داد که باززایی غیر مستقیم ریزنمونه برگ، به‌دلیل دشواری در باززایی کالوس‌ها، احتمال وقوع جهش سوماکلونال و تولید شاخه‌های کمتر، برای ریزازدیادی گیاه پروانش روشی مناسب نمی‌باشد، اما از این روش می‌توان برای تولید برخی متابولیت‌های ثانویه بهره جست.

واژه‌های کلیدی: پروانش، ریزازدیادی، باززایی غیرمستقیم، کالوس، ریزنمونه برگ، تنظیم کننده‌های رشد

مقدمه

پروانش (*Catharanthus roseus* (L.) G.Don) یکی از گیاهان دارویی مهم و از تیره خرزهره (Apocynaceae) می‌باشد (۱ و ۳). از میان ۱۳۰ نوع آلکالوئید ایندولی ترپنوئیدی که در این گیاه شناسایی شده است، آلکالوئیدهای وین‌بلاستین و وین‌کریستین از اهمیت ویژه‌ای برخوردارند؛ زیرا این دو آلکالوئید از طریق اتصال به میکروتوبول‌ها و توقف تقسیم سلولی در طی متافاز میتوز، خاصیت ضد توموری داشته و بیش از ۴۰ سال است که در شیمی‌درمانی بسیاری از سرطان‌ها کاربرد دارند (۷، ۱۳ و ۲۴). مقدار بسیار اندک این دو آلکالوئید در گیاه پروانش به عنوان تنها منبع تهیه، پیچیدگی و چند مرحله‌ای بودن مسیر سنتز این دو آلکالوئید، تولید اختصاصی برخی پیش‌ماده‌های مسیر سنتز آنها در بافت‌های تخصص یافته، اثر بخشی کمتر داروهای نیمه‌سنتزی نسبت به انواع طبیعی و تقاضای زیاد برای این دو دارو از مهمترین دلایلی می‌باشند که توجه محققین را به استفاده از روش‌های زیست

۱. به ترتیب استادیار، دانشجوی سابق کارشناسی ارشد و استاد، گروه بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی اصفهان

*: مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: mtalebi@cc.iut.ac.ir

فناوری و کشت بافت برای افزایش تولید این آلکالوئیدهای حیاتی در گیاه جلب نموده است. یافتن عوامل مؤثر بر افزایش بیوسنتز وین‌بلاستین و وین‌کریستین و یا مونومرهای آنها نظیر کاتارانتین و وین‌دولین همواره از اهداف مهم تحقیقاتی محسوب می‌شود (۵ و ۷). تغذیه گیاه با پیش‌ماده‌های مناسب، استفاده از تیمارهای هورمونی و مهندسی متابولیت‌ها، ابزارهای مناسبی برای رسیدن به این هدف می‌باشند (۱، ۱۶ و ۲۵). هم‌چنین اهمیت دستیابی به کلروپلاست‌های فعال برای سنتز وین‌دولین و آلکالوئیدهای دایمری مشتق از آن اثبات شده است. با توجه به اینکه کلروپلاست فقط در بافت‌های تمایز یافته وجود دارد (۱۹)، این آلکالوئیدها در کشت‌های تمایز نیافته نظیر سوسپانسیون سلولی تولید نمی‌شوند. بنابراین اکثر تحقیقات برای یافتن عوامل افزایش دهنده غلظت وین‌بلاستین و وین‌کریستین، تمرکز بر کشت‌های تمایز یافته و گیاهان باززا شده به روش جنین‌زایی سوماتیکی و کشت‌های چند شاخه‌ای تولید شده از ریزنمونه گره ضروری است (۳).

پروانش به طور سنتی توسط بذر تکثیر می‌شود. اما این روش کشت، سبب تفرق ژنتیکی و کاهش تولید یکنواخت آلکالوئیدهای دایمری آن می‌شود (۶). به همین دلیل تلاش‌های زیادی برای تولید انبوه این گیاه از طریق کشت بافت انجام شده است. اولین مشاهدات در زمینه باززایی گونه *C. roseus* در کشت‌های آزمایشگاهی مربوط به تشکیل ریشه از بافت کالوس پروانش بود. پس از آن، تشکیل ساقه از بافت کالوس و باززایی گیاه از کالوس‌های هاپلوئید و دیپلوئید انجام گرفت (۲۵).

کشت بافت حاصل از باززایی مستقیم گیاهچه‌های پروانش در محیط موراشیگ و اسکوگ (Murashige and Skoog, MS) تیمار شده با ۱ میلی‌گرم در لیتر هورمون بنزیل‌آمینوپورین (6-benzylaminopurine) نشان داد که علاوه بر تولید شاخه‌هایی با برگ‌های کوچک، بافت‌های سازمان نیافته‌ای نیز در محیط کشت تولید می‌شوند (۲۵).

طی سال‌های ۱۹۸۹ تا ۱۹۹۴ آزمایش‌های متعددی با هدف افزایش مقدار آلکالوئیدهای این گیاه دارویی انجام گرفت و نتایج نشان داد که هورمون‌های گیاهی علاوه بر تأثیر در رشد، تمایز بافت‌ها و تشکیل و توسعه ساقه، در تنوع آلکالوئیدها و افزایش مقدار آنها در گیاه نیز مؤثرند (۱۲). در کشت‌های آزمایشگاهی پروانش، به کارگیری ترکیب اکسین‌ها، سیتوکینین‌ها و شدت نور نشان داده است که افزودن ۷ میلی‌گرم در لیتر هورمون BAP و ۱ میلی‌گرم در لیتر هورمون نفتالن استیک اسید (α-Naphthaleneacetic Acid) به محیط کشت، به طور مؤثری سبب القای تشکیل شاخه می‌شود، اما هورمون ۲و۴- دی‌کلروفنوکسی‌استیک اسید (2,4-D) (2,4-Dichlorophenoxyacetic Acid) از تمایز شاخه‌ها جلوگیری می‌کند. هم‌چنین هنگامی‌که شدت نور ۵۵۰ تا ۷۰۰ لوکس با میزان ۲ میلی‌گرم در لیتر BAP و غلظت‌های مختلف بین صفر تا ۱ میلی‌گرم در لیتر NAA به‌کار می‌رود در تمایز ساقه‌ها اثر مثبتی دارد (۲۶).

نتایج آزمایش‌های ازدیاد گیاه پروانش از طریق کشت مریستم‌های شاخه و جوانه‌های جانبی گیاهان گلخانه‌ای با استفاده از محیط کشت MS تیمار شده با غلظت‌های کم BAP و 2,4-D نشان داد که پس از ۴ تا ۵ هفته تشکیل چندین شاخه از جوانه‌های جانبی میسر است (۵).

باززایی گیاه پروانش از طریق جنین‌زایی سوماتیکی و با استفاده از بافت کالوس حاصل از کشت بساک در محیط جامد تیمار شده با ۱ میلی‌گرم در لیتر NAA و ۱ میلی‌گرم در لیتر هورمون کینتین به‌دست آمد (۲۵). این گیاهان از نظر تعداد کروموزوم (۲n=۱۶) با گیاهان تولید شده از بذر مشابه بودند.

بر اساس نتایج یک مطالعه که در آن مقدار وین‌کریستین در بافت کالوس (جنین‌زا و غیر جنین‌زا)، مراحل مختلف جنین‌زایی (جنین‌های تکثیر شده، بالغ شده و جوانه‌زده)، جنین‌های سوماتیکی مشتق از گیاهچه‌ها (برگ، ریشه و گیاه کامل) و هم‌چنین برگ‌ها در مزرعه اندازه‌گیری شده بود، مقدار زیادی از این آلکالوئیدها در کالوس‌های برگ و جنین‌های جوانه‌زده به دست آمد. هم‌چنین برگ‌های گیاهان تولید شده در محیط کشت نسبت به برگ‌های گیاهان کشت

شده در مزرعه، مقدار بیشتری وین‌کریستین داشتند (۶). در مطالعه دیگر مقدار وین‌کریستین در بافت کالوس حاصل از ۳۲ تیمار مختلف هورمونی، شامل ترکیبی از یک نوع هورمون اکسین و سیتوکینین بدون باززایی آنها در سال ۲۰۱۰ بررسی گردید. نتایج این آزمایش نشان داد که هورمون‌های سیتوکینین تأثیر مهمی در افزایش حجم کالوس دارند، اما از بین اکسین‌ها، 2,4-D تأثیر بیشتری نسبت به NAA در رشد کالوس دارد. هم‌چنین ترکیب هورمونی NAA و BAP اثر بیشتری در افزایش غلظت وین‌کریستین نسبت به ترکیب کینتین و 2,4-D دارد (۱۶).

با توجه به ارزش زیاد گیاه پروانش از نظر دارویی و زینتی، تاکنون روش باززایی کارآمد و قابل اطمینانی برای این گیاه گزارش نشده است. از سوی دیگر باززایی گیاه، پیش‌نیاز لازم برای تولید گیاهان تراریخت ژنتیکی است که اغلب از طریق روش‌های بیولوژیک یا بمباران ذره‌ای انجام می‌شود. بنابراین، پژوهش حاضر با هدف تعیین بهترین ترکیب هورمونی در محیط کشت جهت تولید کالوس و باززایی گیاه کامل از ریزنمونه برگ و نهایتاً ریزازدیادی گیاه پروانش انجام گردید.

مواد و روش‌ها

تهیه مواد گیاهی و ضد عفونی

گیاه کامل پروانش از باغ گیاه‌شناسی ایران (تهران) تهیه شد. قسمت هوایی گیاه به مدت ۱۰ دقیقه در محلول هیپوکلریت سدیم ۳۰٪ (V/V) با غلظت ۵٪ کلر فعال حاوی ۱۰٪ توئین ۸۰ ضد عفونی و سپس با آب مقطر استریل شست‌وشو داده شد.

آزمایش‌های کشت بافت

کشت جوانه (گره) ضد عفونی شده در در دو محیط کشت پایه موراشیگ و اسکوگ (۲۰) یکی بدون زغال فعال و دیگری حاوی ۲ گرم در لیتر زغال فعال انجام شد. در این آزمایش، دمای $26\pm2^{\circ}C$، شرایط نوری ۱۶ ساعت روشنایی، با شدت نور ۲۵۰۰ لوکس و ۸ ساعت تاریکی به‌کار برده شد. واکشت‌سازی هر چهار هفته یک‌بار در محیط جدید صورت گرفت.

ریزنمونه برگ از گیاهانی که دارای رشد مطلوبی بودند جدا و جهت بررسی باززایی غیرمستقیم گیاه، در محیط کشت MS فاقد هورمون و محیط‌های حاوی تنظیم‌کننده‌های رشد (جدول ۱) قرار گرفتند. هورمون‌های مورد استفاده در این تحقیق بنزیل‌آمینوپورین (BAP)، کینتین (Kin)، زآتین (Zea) و نفتالن‌استیک اسید (NAA) بودند که به صورت محلول ذخیره تهیه شدند. در هر تیمار هورمونی سه تکرار و در هر تکرار چهار ریزنمونه کشت شد. میزان کالوس‌دهی هر ریزنمونه پس از چهار هفته مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

باززایی کالوس‌های حاصل از ریزنمونه برگ در هفت ترکیب هورمونی مختلف به شرح جدول ۲ آزمایش شدند. شاخه‌های حاصل از باززایی غیر مستقیم گیاه پروانش (به طول ۴ تا ۶ سانتی‌متر) در شرایط استریل جدا و برای ریشه‌زایی در محیط کشت MS حاوی ۲ گرم در لیتر زغال فعال (**AC**) و بدون هورمون قرار داده شدند.

تجزیه و تحلیل آماری

پس از انجام ارزیابی‌های لازم، نتایج در برنامه Excel ذخیره گردید و داده‌های به‌دست آمده در پایه طرح کامل تصادفی در نرم‌افزار SAS با هدف انتخاب بهترین تیمار از نظر ترکیب هورمونی و غلظت زغال فعال برای باززایی غیر مستقیم گیاه پروانش از طریق آزمون مقایسه LSD تجزیه و تحلیل آماری شد.

نتایج و بحث

کشت جوانه (گره) در محیط کشت

به دلیل عدم یکنواختی ژنتیکی بذرهای پروانش که در نتیجه دگرگشنی ایجاد می‌شوند (۱۸) و قوه نامیه پایین بذرها، ترجیحاً از کشت جوانه یک گیاه والد استفاده شود تا یکنواختی ریزنمونه‌ها افزایش یابد. جوانه گیاهان ضدعفونی شده در محیط کشت MS حاوی زغال فعال پس از حدود دو

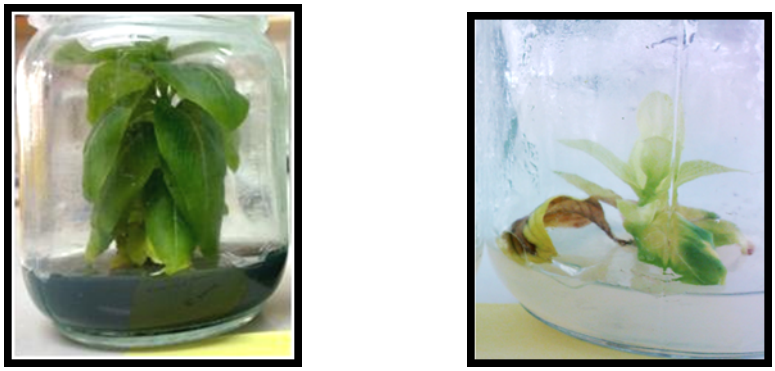
جدول ۱. مقایسه میانگین کالوس‌دهی در تیمارهای مختلف هورمونی

تیمار	نوع تیمار	کالوس‌دهی (٪)
۱	BAP (۰/۱ mg/l) + NAA (۰/۱ mg/l) + AC (۲ g)	۱/۶ dc
۲	BAP (۰/۱ mg/l) + NAA (۵ mg/l) + AC (۲ g)	۳/۶ ab
۳	BAP (۰/۵ mg/l) + NAA (۰/۵ mg/l) + AC (۲ g)	۰/۵ e
۴	BAP (۰/۵ mg/l) + NAA (۱ mg/l) + AC (۲ g)	۰/۶ de
۵	BAP (۰/۵ mg/l) + NAA (۲ mg/l) + AC (۲ g)	۳/۶ ab
۶	BAP (۰/۵ mg/l) + NAA (۵ mg/l) + AC (۲ g)	۳/۶ ab
۷	BAP (۱ mg/l) + NAA (۰/۱ mg/l) + AC (۲ g)	۳/۰ ab
۸	BAP (۱ mg/l) + NAA (۱ mg/l) + AC (۲ g)	۳/۶ ab
۹	BAP (۱ mg/l) + NAA (۲ mg/l) + AC (۲ g)	۳/۶ ab
۱۰	BAP (۱ mg/l) + NAA (۵ mg/l) + AC (۲ g)	۴/۰ a
۱۱	BAP (۰/۵ mg/l) + 2,4-D (۵ mg/l) + AC (۲ g)	۴/۰ a
۱۲	BAP (۱ mg/l) + 2,4-D (۵ mg/l) + AC (۲ g)	۳/۶ ab
۱۳	BAP (۲ mg/l) + 2,4-D (۵ mg/l) + AC (۲ g)	۳/۶ ab
۱۴	BAP (۴ mg/l) + 2,4-D (۵ mg/l) + AC (۲ g)	۰/۸ de
۱۵	BAP (۰/۵ mg/l) + 2,4-D (۲/۵ mg/l) + AC (۲ g)	۳/۶ ab
۱۶	BAP (۱ mg/l) + 2,4-D (۲/۵ mg/l) + AC (۲ g)	۳/۶ ab
۱۷	BAP (۲ mg/l) + 2,4-D (۲/۵ mg/l) + AC (۲ g)	۴/۰ a
۱۸	BAP (۰/۵ mg/l) + IAA (۰/۵ mg/l) + AC (۲ g)	۰/۸ de
۱۹	BAP (۰/۵ mg/l) + IAA (۱ mg/l) + AC (۲ g)	۳/۳ ab
۲۰	BAP (۰/۵ mg/l) + IAA (۲ mg/l) + AC (۲ g)	۳/۰ ab
۲۱	BAP (۰/۵ mg/l) + IAA (۵ mg/l) + AC (۲ g)	۲/۶ bc
۲۲	BAP (۱ mg/l) + IAA (۰/۵ mg/l) + AC (۲ g)	۲/۶ bc
۲۳	BAP (۱ mg/l) + IAA (۱ mg/l) + AC (۲ g)	۲/۶ bc
۲۴	BAP (۱ mg/l) + IAA (۲ mg/l) + AC (۲ g)	۴/۰ a
۲۵	BAP (۱ mg/l) + IAA (۵ mg/l) + AC (۲ g)	۳/۶ ab

حروف غیرمشابه در هر ستون اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۵٪ را نشان می‌دهند.

جدول ۲. تیمارهای هورمونی برای باززایی کالوس‌های حاصل از ریزنمونه برگ

تیمار	نوع تیمار
۱	Kin (۰/۱ mg/l) + NAA (۰/۱ mg/l) + AC (۲ g)
۲	Kin (۱ mg/l) + NAA (۰/۱ mg/l) + AC (۲ g)
۳	Kin (۰/۱ mg/l) + NAA (۱ mg/l) + AC (۲ g)
۴	Kin (۰/۵ mg/l) + NAA (۱/۵ mg/l) + AC (۲ g)
۵	Kin (۰/۱ mg/l) + NAA (۰/۱ mg/l)
۶	Kin (۱ mg/l) + NAA (۰/۱ mg/l)
۷	Kin (۰/۱ mg/l) + NAA (۱ mg/l)



شکل ۱. سمت راست: گیاهان کشت شده در محیط کشت بدون زغال فعال و سمت چپ: محیط کشت حاوی زغال فعال

ماه رشد کرده و ۵ تا ۷ گره تولید کردند که از کشت این گره‌ها برای تکثیر بیشتر گیاه استفاده شد (شکل ۱). جوانه‌های کشت شده در محیط کشت بدون زغال فعال پس از مدت دو ماه، زرد شده و از بین رفتند و در برخی موارد نیز که رشد جوانه جانبی دیده شد، زردی حاشیه برگ‌های حاصل در آنها به خوبی مشخص بود (شکل ۱). تشکیل ریشه نیز در این گیاهان به‌ندرت انجام گرفت و ریشه‌های حاصل نسبت به ریشه‌های تولید شده در محیط حاوی زغال فعال کوتاه‌تر بودند. زمان رشد گیاهان در شرایط آزمایشگاهی مشابه آن در شرایط گلخانه بود (۱). هم‌چنین تشکیل ریشه نیز در این گیاهان به خوبی انجام گرفت.

به طور کلی، مهمترین دلایل افزودن زغال فعال به محیط کشت، جذب ترکیبات بازدارنده رشد مانند فنل‌ها و هم‌چنین تاریک ساختن محیط کشت برای ایجاد شرایطی مشابه خاک برای رشد ریشه است (۴). پروانش، منبع غنی از ترکیبات فنلی است و در اثر تنش‌های زنده و غیر زنده مقدار آنها افزایش می‌یابد (۲۱). در حین جداسازی ریزنمونه و پس از صدمه دیدن بافت، این ترکیبات با فعالیت پلی‌فنل‌اکسیدازها که در پلاست‌های سلول‌ها وجود دارند، اکسید شده و موجب قهوه‌ای یا سیاه شدن بافت مزبور می‌گردند. محصولات این اکسیداسیون فعالیت آنزیمی را متوقف نموده و سبب تیره شدن بافت‌ها، عدم تثبیت ریزنمونه در محیط کشت و در نهایت مرگ ریزنمونه می‌شوند. تیره رنگ شدن محیط کشت‌های بدون زغال (مایل به قهوه‌ای) در تکثیر پروانش تأییدی بر تولید ترکیبات فنلی فراوان در محیط کشت است که می‌تواند برای رشد ریزنمونه مضر باشد. بنابراین استفاده از زغال فعال در محیط کشت ضروری به‌نظر می‌رسد (۲۲). بر این اساس، در تمام موارد، برای کشت ریزنمونه از محیط حاوی ۲ گرم در لیتر زغال فعال استفاده شد.

باززایی غیر مستقیم ریزنمونه برگ

از ۲۵ تیمار مختلف هورمونی که برای تولید کالوس از ریزنمونه‌های برگ استفاده شد (جدول ۱) تمامی تیمارها بجز تیمار ۵/ ۰ میلی‌گرم در لیتر BAP و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA (تیمار ۳) کالوس تولید کردند. تیمار ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر BAP و ۵ میلی‌گرم در لیتر NAA (تیمار ۲) علاوه بر تولید کالوس فراوان، ریشه زیادی نیز تولید کرد. در این تیمار، مقدار اکسین به کار رفته ۵۰ برابر سیتوکینین بود و این اختلاف زیاد غلظت می‌تواند دلیل القای تشکیل ریشه در کالوس‌ها باشد. نتایج تجزیه واریانس نیز نشان داد که اثر تیمارهای هورمونی مختلف در تولید کالوس از ریزنمونه برگ در سطح ۱٪ معنی‌دار است (جدول ۳).

رنگ، ساختار و قدرت باززایی کالوس‌ها تحت تأثیر ژنوتیپ و شرایط کشت (محیط کشت و شرایط نگه‌داری کشت‌ها) است (۴). کالوس‌های حاصل از تیمارهای حاوی

جدول۳. نتایج تجزیه واریانس صفت کالوس‌دهی در ۲۵ ترکیب مختلف هورمونی در گیاه پروانش

منابع تغییر	درجه آزادی	میانگین مربعات	F
تیمار	۲۴	۳/۹۶	۱۵/۸۷ **
خطا	۵۰	۰/۲۵	–

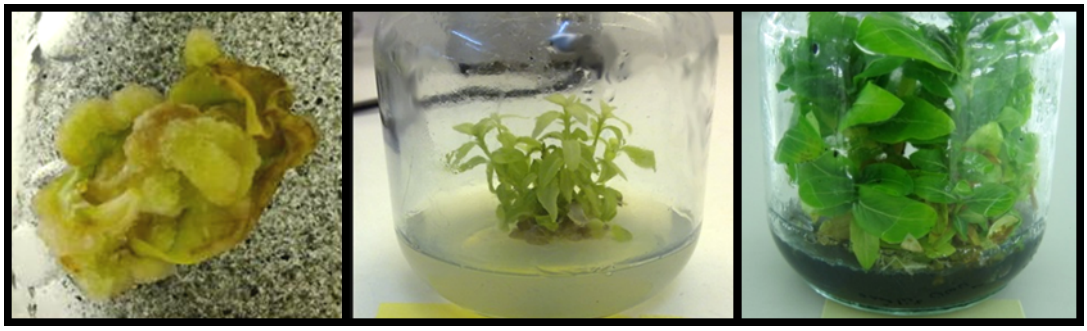
** معنی‌دار در سطح ۱٪

2,4-D و IAA (ایندول استیک اسید) رنگی مایل به زرد و کالوس حاصل از تیمارهای حاوی NAA رنگی مایل به سبز داشتند. در مطالعات پیشین نیز رنگ کالوس‌های جنین‌زا سفید مایل به زرد گزارش شده است (۱۵).

از میان تیمارهایی که برای تولید کالوس استفاده شد، فقط کالوس‌های تیمار ۱ میلی‌گرم در لیتر BAP و ۲/۵ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D (تیمار ۱۶ جدول ۱) و هم‌چنین ۱ میلی‌گرم در لیتر BAP و ۵ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D (تیمار ۱۲ جدول ۱) پس از انتقال به محیط‌های کشت باززایی، تولید شاخساره نمودند. در سایر کالوس‌های حاصل از ترکیب هورمون NAA و BAP و یا IAA و BAP باززایی صورت نگرفت.

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 این پژوهش نیز غلظت ۱ میلی‌گرم در لیتر (معادل ۴/۴۴ میکرومولار) هورمون BAP برای تولید کالوس همراه با 2,4-D مناسب دیده شد. محیط‌های عاری از هورمون سیتوکنین، کالوس‌های غیرجنین‌زا و آبکی تولید نمودند که قدرت باززایی نداشتند. در مطالعات جونایید و همکاران (۱۵) نیز کالوس‌های جنین‌زای هیپوکوتیل فقط از تیمار 2,4-D حاصل شد. هم‌چنین اسلام و همکاران (۶) توانستند بافت کالوس را از ریزنمونه‌های مختلفی شامل برگ، گره، ریشه و هیپوکوتیل بذرهای جوانه‌زده در شرایط آزمایشگاهی تشکیل دهند. اما کالوس‌های جنین‌زا فقط از ریزنمونه هیپوکوتیل تولید شدند. در سال ۱۹۹۴ نیز جنین‌زایی سوماتیکی واریته *C. roseus* cv. Little delicata از کالوس‌های حاصل از کشت بساک صورت گرفت (۱۷). آزمایش‌های لی و همکاران (۱۸) نشان داد که باززایی دمبرگ‌های پروانش وابسته به ژنوتیپ گیاه است. چوی و همکاران (۱۰) نیز علاوه بر ترکیب هورمون‌های رشد، ژنوتیپ گیاه را عاملی مهم در باززایی هیپوکوتیل‌های پروانش معرفی نمودند. نتایج کشت بافت در واریته *C. roseus* cv. Little bright eye نشان داد که نوع ریزنمونه، غلظت و نوع تنظیم کننده‌های رشد، عامل مهمی برای باززایی گیاه است به نحوی که بیشترین باززایی پروانش از جنین‌زایی سوماتیکی جنین‌های بالغ بذر به‌دست آمد (۱۰). هم‌چنین، جنین‌های بالغ به طریق اندام‌زایی نیز باززا می‌شوند، اما ریزنمونه‌های گره، مریستم نوک ساقه و هیپوکوتیل باززایی مناسبی در هیچ‌یک از حالت‌های اندام‌زایی و یا جنین‌زایی سوماتیکی نشان ندادند (۱۱). به طور کلی، در تمام روش‌های ارائه شده پیشین، میزان باززایی اندک گزارش شده است و این روش‌ها به دلیل عدم دسترسی به درصد بالای باززایی برای استفاده گسترده در تراریختی گیاهان با *Agrobacterium* بهینه نشده‌اند (۱۱).

اگرچه محیط‌های حاوی زغال فعال و بدون زغال فعال هر دو برای باززایی آزمایش شدند، اما برخلاف کشت جوانه و کالوس، فقط محیط‌های بدون زغال باززایی نشان دادند که می‌تواند به دلیل جذب هورمون‌ها توسط زغال فعال و کاهش تأثیر آن بر باززایی باشد (۸). پس از مدتی گیاهان باززا شده زرد رنگ شدند. لذا برای ادامه رشد به محیط حاوی زغال منتقل شدند (شکل ۲). دلیل این امر را می‌توان تولید مواد فنولی و افزایش غلظت آن در محیط کشت دانست که بر رشد گیاه تأثیر منفی دارد. علاوه بر این، اتیلن هورمون طبیعی است که در گیاهان از اسیدآمینه متیونین تولید می‌شود. مشخص شده است که تولید اتیلن در محیط‌های کشت ریزنمونه‌ها افزایش یافته و وجود هورمون‌های سیتوکینین و اکسین در



شکل ۲. به ترتیب از چپ به راست: کالوس، گیاهان باززا شده در محیط بدون زغال فعال و گیاهان باززا شده در محیط حاوی زغال فعال

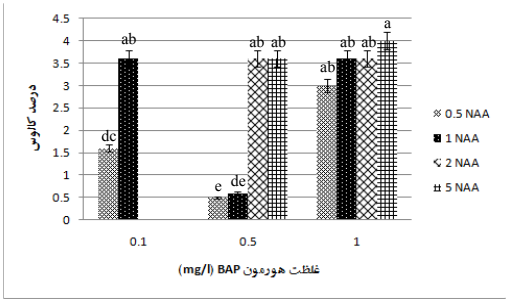
محیط تولید این تنظیم کننده رشد را افزایش داده است (۸). از آنجا که درب ظرف‌های کشت شده به طور کامل بسته بود، اتیلن کم کم در اطراف ریزنمونه تجمع می‌یابد (۴ و ۲۱). لذا زغال فعال علاوه بر جذب ترکیبات فنلی و هورمون‌ها، گاز اتیلن را نیز جذب می‌کند (۲۲). این مورد دلیلی دیگر برای استفاده از زغال فعال در محیط کشت جوانه و کالوس پروانش محسوب می‌شود. اما نقش اتیلن در کشت بافت و سلول گیاهی هنوز به خوبی مشخص نیست. وجود اتیلن برای جنین‌زایی کشت بساک *Hordeum vulgaris* ارزشمند است (۹). از سوی دیگر، اتیلن نقش بازدارنده‌ای در باززایی ساقه از کالوس‌های *Helianthus annuus* (۲۳) و *Nicotiana tabacum* (۱۴) دارد. استفاده از بازدارنده‌های اتیلن مانند $AgNO_3$ و $CoCl_2$ سبب باززایی ساقه‌ها از کالوس‌های *Nicotiana plumbaginifolia* و *Triticum aestivum* می‌شود و جنین‌زایی سوماتیکی در *Daucus carota* را افزایش می‌دهد (۸). تا کنون گزارشی در خصوص نقش اتیلن در باززایی کالوس‌های پروانش ارائه نشده است. از آنجا که در پژوهش حاضر، کالوس‌های جنین‌زا فقط در محیط کشت فاقد زغال فعال باززا شدند، این احتمال وجود دارد که هورمون اتیلن برای باززایی کالوس‌ها لازم باشد. همان‌طور که اشاره شد دلیل دیگر اثر منفی زغال فعال در شروع فرایند باززایی به جذب هورمون‌های موجود در محیط کشت توسط زغال فعال مرتبط می‌شود.

در این پژوهش، ساقه‌ها از بافت کالوس باززا شدند و باززایی از نوع اندام‌زایی غیر مستقیم می‌باشد و ساختارهای جنینی تشکیل نشد. با توجه به تحقیقات پیشین، دلیل این موضوع می‌تواند نوع ریزنمونه، ژنوتیپ و یا ترکیب هورمون‌های به‌کار رفته در محیط کشت باشد (۲).

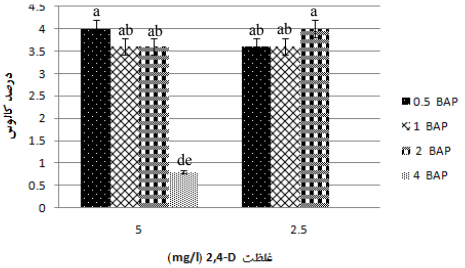
در تیمارهای حاوی NAA (تیمارهای ۱ تا ۱۰ در جدول ۱) با افزایش غلظت این هورمون (غلظت BAP ثابت)، مقدار تولید کالوس افزایش یافته است. هم‌چنین افزایش غلظت سیتوکنین (غلظت NAA ثابت) نیز در اکثر حالت‌ها اثر افزایشی بر درصد کالوس‌دهی داشته است (شکل ۳).

در تیمارهای حاوی غلظت‌های ۵ میلی‌گرم در لیتر هورمون 2,4-D (تیمارهای ۱۱–۱۴ جدول ۱)، برخلاف NAA، با افزایش غلظت BAP مقدار کالوس کاهش یافته است. ممکن است دلیل این امر توانایی بالای هورمون 2,4-D در تولید کالوس باشد که سبب می‌شود نقش هورمون BAP در تولید کالوس کم شده و در اثر افزایش فشار هورمونی غیر ضروری بر ریزنمونه، تولید کالوس کاهش یابد. زیرا در غلظت کمتر هورمون 2,4-D (تیمارهای ۱۵–۱۷ جدول ۱)، BAP بار دیگر اثر مثبتی در تشکیل کالوس داشته است (شکل ۴).

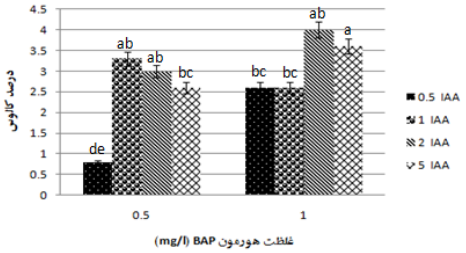
در تیمارهای حاوی IAA (تیمارهای ۱۸–۲۵ جدول ۱)، یافتن ارتباط بین غلظت هورمون‌ها بسیار مشکل است. دلیل این موضوع می‌تواند ناپایداری هورمون IAA و جذب زیاد آن توسط زغال فعال باشد (۲۲) که اختلاف زیادی در مقدار هورمون مورد استفاده در



شکل ۳. نمودار اثر افزایش غلظت هورمون NAA (mg/l) بر تولید کالوس ریزنمونه برگ پروانش



شکل ۴. نمودار اثر افزایش غلظت BAP (mg/l) بر تولید کالوس ریزنمونه برگ پروانش در غلظت‌های مختلف 2,4-D



شکل ۵. نمودار اثر افزایش غلظت IAA (mg/l) بر تولید کالوس ریزنمونه برگ پروانش

محیط و آنچه در اختیار گیاه قرار می‌گیرد، ایجاد می‌کند. بنابراین، به نظر می‌رسد در تیمارهای فوق، اثر مثبت هورمون BAP در ایجاد کالوس قابل توجه است (شکل ۵).

به طور کلی نتایج مطالعات پیشین نشان داده است که تولید کالوس از ریزنمونه‌های پروانش از کارآیی بالایی برخوردار است، اما تشکیل جنین و تبدیل آن به گیاه کامل پیچیده و تحت تأثیر عوامل خارجی مختلفی می‌باشد (۱۵). در این تحقیق، از میان تیمارهای انتخاب شده برای باززایی، تنها در ترکیب ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر Kin و ۱ میلی‌گرم در لیتر NAA (تیمار ۷ جدول ۲) مقدار باززایی قابل قبولی حاصل شد.

ریشه‌دهی ساقه‌ها

شاخه‌های حاصل از باززایی غیر مستقیم گیاه پروانش در محیط کشت فاقد هورمون و حاوی ۲ گرم در لیتر زغال فعال تولید ریشه نمودند. اغلب ساقه‌هایی که رشد مناسبی دارند برای القای ریشه‌دهی به محیط حاوی اکسین منتقل می‌شوند که از بین انواع هورمون‌های اکسین، NAA در القای ریشه‌دهی موفق‌تر بوده است. اما در بسیاری از گیاهان، به‌دلیل تولید اکسین در ساقه‌های جوان، نیازی به افزودن این هورمون به محیط کشت نیست و استفاده از این هورمون در محیط کشت ریشه‌دهی، سبب القای تولید بافت کالوس می‌شود. در مورد گیاه پروانش، از آنجا که از زغال فعال در محیط کشت استفاده می‌شود، تاریک شدن محیط اطراف قسمت انتهایی ساقه سبب می‌شود که هورمون اکسین ساقه‌های جوان و کوفاکتورهای آنها به دلیل حساسیت به نور در بخش تاریک انتهای ساقه تجمع یابند و سبب تولید ریشه بدون استفاده از هورمون اکسین خارجی در محیط کشت شوند (۲۲). هم‌چنین افزودن هورمون اکسین اضافی در محیط کشت ریشه‌دهی، منجر به تشکیل بافت کالوس و توقف تولید ریشه می‌شود.

از آنجا که این شاخه‌ها پس از انتقال به محیط فاقد هورمون همچنان توانایی خود را برای تولید شاخه جانبی، اگرچه کمتر از قبل، حفظ نموده اند، به نظر می‌رسد مقداری از هورمون سایتوکینین محیط تکثیر شاخه در بافت‌های گیاه، به ویژه آوندهای چوبی باقی مانده است و افزودن هورمون اکسین در محیط کشت ریشه‌دهی در ترکیب با هورمون سایتوکینین داخلی آنها منجر به تشکیل بافت کالوس و توقف ریشه‌دهی می‌شود (۲). عدم تشکیل ریشه در محیط‌های حاوی PVP نیز می‌تواند تأییدی بر نقش زغال فعال در تاریک شدن پای ساقه و تولید ریشه باشد.



شکل۶. انتقال گیاهچه‌های ریشه‌دار به خاک

انتقال گیاهچه‌های ریشه‌دار به خاک

پس از رشد مناسب و ریشه‌دهی گیاهچه‌های پروانش در محیط کشت انتخابی، این گیاهچه‌ها بـه گلـدان‌هـای کوچـک حـاوی نسبت مساوی شن، خاک‌برگ، پیت‌ماس و خاک منتقـل شـده و با شرایط محیطی سازگار شدند (شکل ۶).

نتیجه‌گیری

به طور کلی، باززایی مشکل کالوس‌های ریزنمونه برگ، احتمال ایجاد جهش و تعداد کم شاخه‌های تولید شده در ایـن روش از جمله دلایلی هستند که باعث می‌شود نتوان اسـتفاده از بـاززایی غیرمستقیم پروانش به عنوان روشی برای ریزازدیادی و بررسـی اثر هورمون‌ها در مقدار آلکالوئیـدهای دارویـی وینبلاسـتین و وین‌کریستین را توصیه کرد. اما از آنجا که کالوس به عنوان منبع اولیه کشت سوسپانسیونی برای تولید برخـی آلکالوئیـدها ماننـد کاتـارانتین اسـتفاده مـی‌شـود، بنـابراین انـدازه‌گیـری درصـد کالوس‌دهی در تیمارهای مختلف هورمونی از اهمیـت ویـژه‌ای برخوردار است.

منابع مورد استفاده

۱. امید بیگی، ر. ۱۳۸۶. رهیافت‌های تولید و فرآوری گیاهان دارویی. جلد دوم، انتشارات آستان قدس رضوی.

۲. سید طباطبایی، ب. ا. و م. امیدی. ۱۳۸۸. کشت بافت و سلول گیاهی. انتشارات دانشگاه تهران.

۳. صبری، ن. ۱۳۷۳. مطالعات سیتوژنتیکی و الکتروفـورزی سـرده وینکـا، کـشت بافـت و سـلول در جهـت ایجـاد کموتایـپ‌هـای آلکالوئیدی. پایان‌نامه کارشناسی ارشد، گروه ژنتیک، دانشکده علوم پایه، دانشگاه تربیت مدرس.

۴. فارسی، م. و ج. ذوالعلی. ۱۳۸۲. اصول بیوتکنولوژی گیاهی (ترجمه). انتشارات دانشگاه فردوسی مشهد.

5. Alen, K., S. Mohan-Jain and A. Huhtikangas. 1995. Micropropagation of *Catharanthus roseus* for Vinblastine and Vincristine production. European Research Conferences on Plant Cell Biology and Biotechnological Applications, Dourdan, PP. 14-19.
6. Aslam, J., A. Muji, S.A. Nasim and M.P. Sharma. 2009. Screening of Vincristine yield in *ex vitro* and *in vitro* somatic embryos derived plantlets of *Catharanthus roseus* (L.) G. Don. Sci. Hortic. 119: 325-329.
7. Aslam, J., S.H. Khan, Z.H. Siddiqui, Z. Fatima, M. Maqsood, M.A. Bhat, S.A. Nasim, A. Ilah, I.Z. Ahmad, S.A. Khan, A. Mujib and M.P. Sharma. 2010. *Catharanthus roseus* (L.) G. Don. an important drug: Its applications and production. Intl. J. Compreh. Pharm. 4(12): 1-16.
8. Chi, G.L., E.C. Pua and C.J. Goh. 1991. Role of ethylene on *de novo* shoot regeneration from cotyledonary explants of *Brassica campestris ssp.* pekinensis (lour) olsson *in vitro*. Plant Physiol. 96: 178-183.
9. Cho, U.H. and K.J. Kasha. 1989. Ethylene production and embryogenesis from anther cultures of barley (*Hordeum vulgaris*). Plant Cell Rep. 8: 415-417.
10. Choi, P.S., S.Y. Lee and H.J. Chung. 2003. Assessment of competence for adventitious shoot formation in hypocotyl explant cultures of 22 cultivars of *Catharanthus roseus*. J. Plant Biol. 46(2): 90-94.
11. Dhandapani, M., D.H. Kim and S.B. Hong. 2008. Efficient plant regeneration via somatic embryogenesis and organogenesis from the explants of *Catharanthus roseus*. *In Vitro* Cell. Dev. Biol. Plant 44: 18-25.
12. Hirata, K., K. Miyamoto and Y. Miura. 1994. *Catharanthus roseus L. (*Periwinkle): Production of vindoline and catharanthine in multiple shoot cultures. PP. 46-55. *In*: Bajaj, Y.P.S. (Ed.), Biotechnology in Agriculture and Forestry, Vol. IV: Medicinal and aromatic plants, Springer- Verlag, Berlin.
13. Hisiger, S. and M. Jolicoeur. 2007. Analysis of *Catharanthus roseus* alkaloids by HPLC. Phytochem. Rev. 6: 207-234.

14. Huxter, T.J., T.A. Thorpe and D.M. Reid. 1981. Shoot initiation in light- and dark-grown tobacco callus: The role of ethylene. Physiol. Plantarum 53: 319-326.
15. Junaid, A., A. Mujib, M.A. Bhat, M.P. Sharma and J. Samaj. 2007. Somatic embryogenesis and plant regeneration in *Catharanthus roseus.* Biol. Plantarum 51(4): 641-646.
16. Kalidass, C., V.R. Mohan and A. Daniel. 2010. Effect of auxin and cytokinin on Vincristine production by callus cultures of *Catharanthus roseus* L. (Apocynaceae). Trop. Subtrop. Agroecosys.12: 283-288.
17. Kim, S.W., K.H. Jung, N.H. Song, S.S. Kwak and J.R. Liu. 1994. High frequency plant regeneration from anther-derived cell suspension cultures via somatic embryogenesis in *Catharanthus roseus*. Plant Cell Rep. 13: 319-322.
18. Lee, S.Y., P.S. Choi and H.J. Chung. 2003. Comparison of adventitious shoot formation in petiole explants cultures of 20 cultivars of *Catharanthus rosesus*. J. Plant Biotechnol. 5(1): 59-61.
19. Memelink, J. and P. Gantet. 2007. Transcription factors involved in terpenoid indole alkaloid biosynthesis in *Catharanthus roseus*. Phytochem. Rev. 6: 353-362.
20. Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plantarum 15: 473-497.
21. Mustafa, N.R. and R. Verpoorte. 2007. Phenolic compounds in *Catharanthus roseus*. Phytochem. Rev. 6: 243-258.
22. Pan, M.J. and J. van Staden. 1998. The use of charcoal in *in vitro* culture– A review. Plant Growth Regul. 26**:** 155-163.
23. Paterson-Robinson, K.E. and D.O. Adams. 1987. The role of ethylene in the regeneration of *Helianthus annuus* (sunflower) plants from callus. Physiol. Plantarum 71: 151-156.
24. Pedersen, L.G., M.S. Ostenfeld, M.H. Hansen, J. Nylandsted and M. Jaattela. 2007. Vincristine induces dramatic lysosomal changes and sensitizes cancer cells to lysosome-destabilizing siramesine. Cancer Res. 67(5): 2217-2225.
25. Pietrosiuk, A., M. Furmanowa and B. Lata. 2007. *Catharanthus roseus*: Micropropagation and *in vitro* techniques. Phytochem. Rev. 6: 459-473.
26. Yuan, Y.J. and Z.D. Hu. 1994. Effect of residual medium on *Catharanthus roseus* callus and suspension cell culture. Plant Physiol. Commun. 29: 185-187.