استفاده از ریزنمونه‌های گره و ترکیبات مختلف تنظیم‌کننده‌های رشد در باززایی مستقیم پروانش (*Catharanthus roseus* L.)

مجید طالبی*، فروغ اعتصام، بدرالدین ابراهیم سید طباطبایی و غزاله خاکسار[۱]

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۰/۹/۲۷ ؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۱/۱/۲۴)

چکیده

پروانش (*Catharanthus roseus* L.) از خانواده آپوسیناسه حاوی بیش از ۱۳۰ نوع آلکالوئید ایندولی ترپنوئیدی (TIAs) می‌باشد که در بین آنها دو آلکالوئید دایمری وین‌بلاستین و وین‌کریستین دارای خاصیت ضد تومور بوده و در درمان بسیاری از سرطان‌ها به‌کار می‌رود. توجه به تولید اختصاصی و افزایش برخی از این آلکالوئیدها در بافت‌های تمایز یافته‌ای نظیر برگ و ساقه با استفاده از روش‌های باززایی مستقیم ریزنمونه‌های گیاهی از اهمیت زیادی برخوردار است. در این پژوهش، ۳۰ ترکیب هورمونی مختلف در محیط کشت MS برای باززایی مستقیم ریزنمونه گره در نظر گرفته شد. بهترین باززایی مستقیم ریزنمونه گره و تکثیر شاخه با استفاده از هورمون BAP در محیط کشت حاوی ۱ گرم در لیتر ذغال فعال به دست آمد. اگرچه به دلیل وجود ترکیبات فنلی فراوان در پروانش، استفاده از ذغال فعال در محیط کشت برای رشد گیاه الزامی است، اما به دلیل اثر منفی آن در جذب هورمون‌ها و کاهش تکثیر شاخه، بهینه‌سازی مقدار مصرف آن در محیط کشت حائز اهمیت است. نتایج نشان داد که غلظت ۱ گرم در لیتر ذغال فعال مقدار مناسبی برای تهیه محیط کشت‌های تکثیر شاخه می‌باشد. هم‌چنین انتقال شاخه‌های باززا شده به محیط کشت حاوی NAA سبب افزایش رشد طولی شاخه‌ها شد. شاخه‌های تولید شده در محیط کشت فاقد هورمون و حاوی ۲ گرم در لیتر ذغال فعال تولید ریشه نمودند و پس از انتقال به خاک، با شرایط محیطی سازگار شدند.

واژه‌های کلیدی: پروانش، کشت بافت، باززایی، ریزازدیادی، تنظیم کننده‌های رشد گیاهی

مقدمه

پروانش (*Catharanthus roseus* L.) به‌دلیل خواص دارویی شگفت‌انگیز خود، از حدود یک قرن پیش، در طب سنتی کاربرد داشته و پژوهش‌های بسیاری پیرامون آن انجام شده است (۱ و ۳). تاکنون از این گیاه ۱۳۰ نوع آلکالوییید ایندولی استخراج شده که وین‌بلاستین و وین‌کریستین به عنوان دو آلکالوئید دایمری مهم در ساقه و برگ‌ها ساخته و ذخیره می‌شوند. این آلکالوئیدها اثر آنتی نئوپلازی (Anti-neoplasy) (ضد تومور) داشته و در شیمی‌درمانی برخی سرطان‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرند (۷، ۱۴ و ۲۳). وجود مقادیر بسیار ناچیز این آلکالوئیدها در گیاه که تنها منبع تهیه آن نیز می‌باشند، هم‌چنین تقاضای زیاد و قیمت بالای این داروها، تحقیقات زیادی را با هدف دستیابی به راه‌های جدید برای افزایش تولید آنها، روش‌های جدید تولید و راه‌های زیست‌فناوری برای تولید ارزان‌تر این داروها را به دنبال داشته است. استفاده از کشت بافت و سلولی، مهندسی متابولیت‌ها و روش‌های

۱. گروه بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی اصفهان

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

نیمه سنتزی و سنتز کلی این آلکالوئیدها نمونه‌ای از این تلاش‌ها می‌باشند (۱، ۱۶ و ۲۴).

از پروانش عمدتاً به عنوان گیاهی باغچه‌ای برای زینت فضای سبز و حاشیه باغ‌ها و هم‌چنین به عنوان یک گیاه دارویی مهم بهره می‌برند. از آنجا که تکثیر و ریزازدیادی این گیاه در محیط کشت بافت و متعاقب آن انتقال به شرایط گلخانه به منظور استفاده در فضای سبز و استخراج آلکالوئیدهای دارویی این گیاه با خاصیت ضد سرطانی آن از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است، لذا امید است با انجام تحقیقات بنیادی در شرایط آزمایشگاهی و گلخانه‌ای از این گیاه باارزش در کشور استفاده گردد.

با توجه به پایداری بیشتر سیستم‌های کشت سلول و بافت نسبت به تغییرات محیط و محدودیت‌های زیستگاه، می‌توان با تنظیم دقیق شرایط کشت، منجر به تولید آلکالوئیدی شد که در شرایط طبیعی به میزان کم و یا اصلاً در گیاه تولید نمی‌شود (۱۵). اولین مشاهدات در زمینه باززایی *C. roseus* در کشت‌های آزمایشگاهی مربوط به تشکیل ریشه از بافت کالوس پروانش بود و پس از آن باززایی گیاه از کالوس‌های هاپلوئید و دیپلوئید گزارش شد (۲۴). باززایی مستقیم گیاهچه‌های پروانش در محیط موراشیگ و اسکوگ (Murashige and Skoog) (MS) تیمار شده با ۱ میلی‌گرم در لیتر هورمون بنزیل‌آمینوپورین (BAP) نشان داد که علاوه بر تولید چندین شاخه که دارای برگ‌های کوچکی هستند، بافت‌های سازمان نیافته‌ای نیز در محیط کشت تولید می‌شود (۲۴).

هورمون‌های گیاهی علاوه بر تأثیر در رشد، تمایز بافت‌ها و تشکیل و توسعه ساقه در پروانش بسته به شدت نور فرابنفش، در تنوع آلکالوئیدها و افزایش مقدار آنها در گیاه نیز مؤثرند (۱۲). بررسی تأثیر ترکیب اکسین‌ها، سیتوکینین‌ها و شدت نور در تشکیل گیاهان چندشاخه در کشت‌های آزمایشگاهی پروانش نشان داد که افزودن ۷ میلی‌گرم در لیتر هورمون BAP و ۱ میلی‌گرم در لیتر هورمون نفتالن‌استیک اسید (α-Naphthaleneacetic Acid) (NAA) به محیط کشت، به طور مؤثری سبب القای تشکیل شاخه می‌شود، اما هورمون ۲و۴-دی‌کلروفنوکسی‌استیک اسید (2,4-Dichlorophenoxyacetic Acid) (2,4-D) از تمایز شاخه‌ها جلوگیری می‌کند. هم‌چنین در صورتی که شدت نور ۵۵۰ تا ۷۰۰ لوکس با BAP ۲ mg/l و غلظت‌های مختلف بین صفر تا ۱ میلی‌گرم در لیتر NAA به طور هم‌زمان به‌کار روند در تمایز ساقه‌ها اثر مثبتی خواهند داشت (۲۶).

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 جوانه‌های جانبی پس از ۴-۵ هفته تشکیل چندین شاخه می‌دهند (۵). روشی برای باززایی زیاد گیاه پروانش از طریق جنین‌زایی سوماتیکی بافت کالوس حاصل از کشت بساک گیاه در محیط جامد تیمار شده با ۱ میلی‌گرم در لیتر NAA و ۱ میلی‌گرم در لیتر هورمون کینتین (Kinetin) به دست آمد. ولی جنین‌های سوماتیکی پس از انتقال کالوس‌های تشکیل شده به محیط مایع حاوی غلظت‌های فوق تولید می‌شدند (۲۴). علاوه بر این مشخص شده است که برگ‌های گیاهان تولید شده در محیط کشت نسبت به برگ‌های گیاهان کشت شده در مزرعه، مقدار بیشتری وین‌کریستین دارند (۶).

اگرچه استفاده از محرک‌ها و عوامل تنش‌زا در گیاه مانند متابولیت‌های قارچی، یون‌های فلزات سنگین، نور ماورای بنفش، شوک اسمزی و تنش شوری روش مؤثری برای افزایش تولید متابولیت‌های ثانویه در کشت سلولی گیاهان است (۱۱، ۱۷ و ۱۸)، اما برخی متابولیت‌های ثانویه (مانند آلکالوئیدهای وین‌بلاستین و وین‌کریستین) تنها پس از تمایزیابی بافت‌ها تولید می‌شوند و همین امر دلیل اصلی فقدان آنها در کشت‌های کالوس و سوسپانسیون سلولی است (۲، ۱۵، ۱۷، ۲۴ و ۲۷). بنابراین اکثر تحقیقات برای یافتن عامل افزایش دهنده غلظت وین‌بلاستین و وین‌کریستین روی کشت‌های تمایز یافته نظیر گیاهان باززا شده به روش جنین‌زایی سوماتیکی و کشت‌های چند شاخه‌ای تولید شده از ریزنمونه گره متمرکز شده است (۱۹). با وجود ارزش دارویی و زینتی بسیار گیاه پروانش،

تاکنون روش باززایی کارآمد و قابل اطمینانی برای این گیاه گزارش نشده است. باززایی گیاه، پیش‌نیاز لازم برای تولید گیاهان تراریخت ژنتیکی است که در گیاه پروانش اغلب توسط *Agrobacterium* (۱۰) یا بمباران ذره‌ای انجام می‌شود (۹). علاوه بر این، پروانش به طور سنتی توسط بذر تکثیر می‌شود که این روش، سبب تفرق ژنتیکی و کاهش تولید یک‌نواخت آلکالوئیدهای دایمری آن می‌شود (۶). به همین دلیل ضرورت دارد که مطالعات در جهت کشت بافت، خصوصاً بافت‌های تمایز یافته نظیر گره، متمرکز گردد. ریزنمونه گره به دلیل سادگی به عنوان یکی از روش‌های ترجیحی و بهترین ریزنمونه به منظور باززایی مستقیم برای تکثیر تجارتی گیاهان شناخته شده است (۲). بنابراین، در این پژوهش برای تعیین بهترین محیط کشت جهت ریزازدیادی گیاه پروانش، ۳۰ ترکیب هورمونی به همراه غلظت‌های مختلف ذغال فعال، برای باززایی مستقیم ریزنمونه گره استفاده شد.

مواد و روش‌ها

تهیه مواد گیاهی، ضدعفونی ریزنمونه‌ها و تهیه محیط کشت

این آزمایش طی سال‌های ۱۳۸۸ و ۱۳۸۹ در آزمایشگاه بیوتکنولوژی دانشکده کشاورزی دانشگاه صنعتی اصفهان انجام گرفت. گیاه کامل پروانش (*Catharanthus roseus* (L.) G. Don) از باغ گیاه‌شناسی ایران در تهران تهیه شد. برای ضدعفونی گیاه از محلول هیپوکلریت سدیم ۳۰٪ (V/V) با غلظت ۵٪ کلر فعال استفاده گردید و به‌منظور افزایش اثربخشی ماده ضدعفونی کننده بر اندام گیاهی، توین۸۰ با غلظت ۱۰٪ به آن اضافه گردید. سپس ساقه و برگ گیاه به مدت ۱۰ دقیقه در محلول فوق تکان داده شد و در نهایت شست و شوی گیاه در شرایط استریل و زیر هود پنج بار با آب مقطر استریل انجام گرفت.

پس از تهیه نمک‌ها و ویتامین‌های محیط کشت MS، مقدار ۳۰ میلی‌گرم در لیتر ساکارز و مقادیر مورد نظر ذغال فعال (AC) یا PVP (جدول ۱) به آن اضافه گردید و پ- هاش محلول بین ۵/۸ – ۵/۶ تنظیم شد. برای جامد نمودن محیط کشت، شش گرم در لیتر آگار قبل از اتوکلاو به آن افزوده شد.

آزمایش‌های کشت بافت

ریزنمونه‌های گره از گیاهانی که دارای رشد مطلوب بودند جدا و جهت بررسی باززایی مستقیم در محیط کشت MS فاقد هورمون و محیط‌های حاوی تنظیم‌کننده‌های رشد و غلظت‌های مختلف ذغال فعال و PVP (جدول ۱) کشت شدند. از شیشه‌های درپوش‌دار برای کشت گیاهان در سه تکرار استفاده شد. سپس شیشه‌های کشت شده در دمای $26\pm2^{\circ}C$، شرایط نوری ۱۶ ساعت روشنایی، با شدت نور ۲۵۰۰ لوکس و ۸ ساعت تاریکی قرار گرفتند. پس از هشت هفته، تعداد شاخه‌های تولید شده در هر تیمار (به طول ۴ تا ۶ سانتی‌متر) شمارش شد. این شاخه‌ها در شرایط استریل جداسازی شده و برای ریشه‌زایی در محیط کشت MS حاوی ۲ گرم در لیتر ذغال فعال و بدون هورمون قرار داده شدند.

پس از رشد مناسب و ریشه‌دهی گیاهچه‌های پروانش در محیط کشت انتخابی، گیاهچه‌ها به گلدان‌های کوچک حاوی نسبت مساوی شن، خاک‌برگ، پیت‌ماس و خاک منتقل شده و با شرایط محیطی سازگار شدند.

تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها

مقایسه میانگین و تجزیه واریانس داده‌ها با استفاده از طرح پایه کاملاً تصادفی در نرم‌افزار SAS با هدف انتخاب بهترین تیمار از نظر ترکیب هورمونی و غلظت ذغال فعال برای باززایی مستقیم گیاه پروانش انجام شد.

نتایج و بحث

باززایی مستقیم ریزنمونه گره

در این پژوهش، اثر محیط‌های کشت مختلف که از نظر نوع هورمون سیتوکینین (BAP، Kin و Zea)، غلظت هورمون سیتوکینین،

نوع ماده جذب کننده ترکیبات فنلی (ذغال فعال یا PVP) و

جدول ۱. مقایسه میانگین تعداد شاخه‌ها در تیمارهای هورمونی مختلف

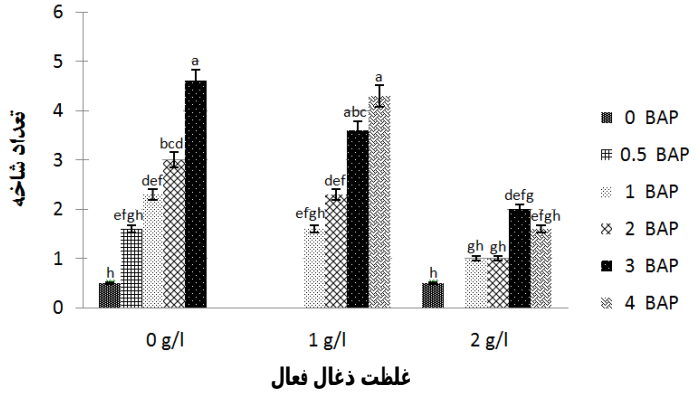
شماره تیمار	نوع تیمار	تعداد شاخه تولید شده
۱	–	۰/۵ h
۲	BAP (۰/۵ mg/l)	۱/۶ e-h
۳	BAP (۱ mg/l)	۲/۳ def
۴	BAP (۲ mg/l)	۳/۰ bcd
۵	BAP (۳ mg/l)	۴/۶ a
۶	AC (۲ g)	۰/۵ h
۷	BAP (۱ mg/l) + AC (۲ g)	۱/۰ gh
۸	BAP (۲ mg/l) + AC (۲ g)	۱/۰ gh
۹	BAP (۳ mg/l) + AC (۲ g)	۲/۰ d-g
۱۰	BAP (۴ mg/l) + AC (۲ g)	۱/۶ e-h
۱۱	BAP (۱ mg/l) + AC (۱ g)	۱/۶ e-h
۱۲	BAP (۲ mg/l) + AC (۱ g)	۲/۳ def
۱۳	BAP (۳ mg/l) + AC (۱ g)	۳/۶ abc
۱۴	BAP (۴ mg/l) + AC (۱ g)	۴/۳ a
۱۵	BAP (۱ mg/l) + PVP (٪۰/۳)	۱/۰ gh
۱۶	BAP (۲ mg/l) + PVP (٪۰/۳)	۱/۰ gh
۱۷	BAP (۳ mg/l) + PVP (٪۰/۳)	۴/۰ ab
۱۸	BAP (۴ mg/l) + PVP (٪۰/۳)	۳/۶ abc
۱۹	Zea (۱ mg/l) + AC (۱ g)	۰/۵ h
۲۰	Zea (۲ mg/l) + AC (۱ g)	۰/۵ h
۲۱	Zea (۳ mg/l) + AC (۱ g)	۰/۸ gh
۲۲	Zea (۴ mg/l) + AC (۱ g)	۱/۶ e-h
۲۳	Kin (۱ mg/l) + AC (۱ g)	۰/۵ h
۲۴	Kin (۲ mg/l) + AC (۱ g)	۰/۶ h
۲۵	Kin (۳ mg/l) + AC (۱ g)	۰/۵ h
۲۶	Kin (۴ mg/l) + AC (۱ g)	۰/۸ gh
۲۷	BAP (۳ mg/l) + NAA (۰/۵ mg/l) + AC (۱ g)	۱/۳ fgh
۲۸	BAP (۴ mg/l) + NAA (۰/۵ mg/l) + AC (۱ g)	۳/۰ bcd
۲۹	BAP (۵/۶ mg/l) + NAA (۰/۵ mg/l) + AC (۱ g)	۳/۰ bcd
۳۰	BAP (۷ mg/l) + NAA (۰/۵ mg/l) + AC (۱ g)	۲/۶ cde

اعداد با حروف غیرمشابه در هر ستون دارای اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۵٪ هستند.

جدول۲. نتایج تجزیه واریانس تعداد شاخه تولید شده در ریزنمونه

منابع تغییر	درجه آزادی	میانگین مربعات	F
تیمار	۲۹	۴/۹۷	۱۶/۱۵ **
خطا	۶۰	۰/۳۰	–

** معنی‌دار در سطح احتمال ۱٪



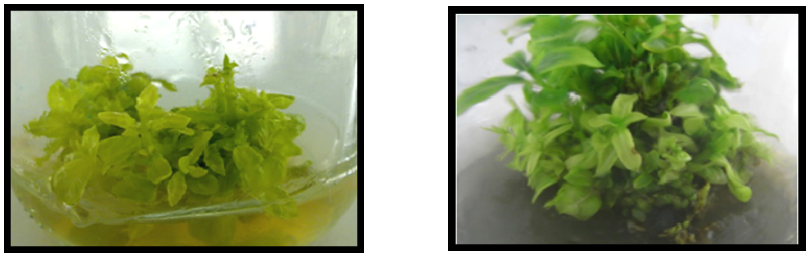
شکل ۱. اثر غلظت‌های مختلف ذغال فعال و هورمون BAP (میلی‌گرم در لیتر) در تکثیر شاخه‌ها

غلظت ذغال فعال به‌کار رفته در آنها متفاوت بودند، در تکثیر ریزنمونه گره آزمایش شد. نتایج حاصل از تجزیه و تحلیل داده‌ها (تعداد شاخه تولید شده) نشان داد که بین برخی تیمارها اختلاف معنی‌داری در سطح ۱٪ وجود دارد (جداول ۱ و ۲).

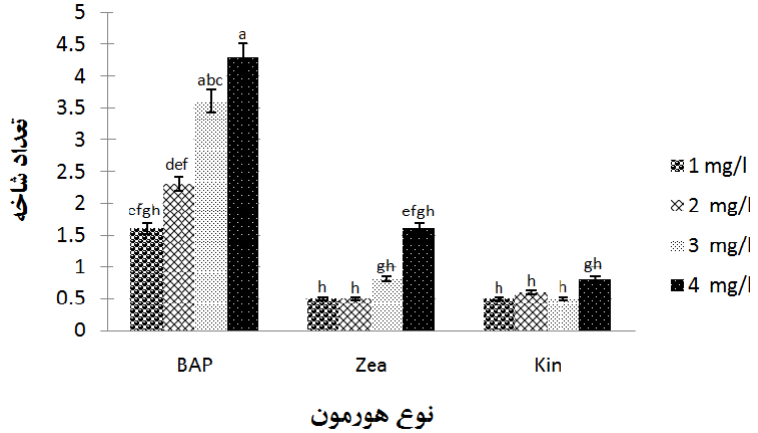
پروانش، منبع غنی از ترکیبات فنلی است و در اثر تنش‌های زنده و غیر زنده مقدار آنها افزایش می‌یابد. در حین جداسازی ریزنمونه و پس از صدمه دیدن بافت، این ترکیبات با فعالیت پلی‌فنل‌اکسیدازها که در پلاستیدهای سلول‌ها وجود دارند، اکسید شده و موجب قهوه‌ای یا سیاه شدن بافت مزبور می‌گردند. محصولات این اکسیداسیون فعالیت آنزیمی را متوقف نموده و سبب تیره شدن بافت‌ها، عدم تثبیت ریزنمونه در محیط کشت و در نهایت مرگ ریزنمونه می‌شود (۲۰). یکی از روش‌های غلبه بر این مشکل استفاده از ذغال فعال در محیط کشت می‌باشد که علاوه بر جذب ترکیبات بازدارنده رشد، مانند فنل‌ها، منجر به تاریک ساختن محیط کشت برای ایجاد شرایطی مشابه خاک برای رشد ریشه می‌شود (۴). تیره رنگ شدن محیط کشت‌های بدون ذغال (مایل به قهوه‌ای) در تکثیر پروانش تأییدی بر تولید ترکیبات فنلی فراوان در محیط کشت است که برای گیاه سمی می‌باشند. بنابراین استفاده از ذغال فعال در محیط کشت ضروری به‌نظر می‌رسد. اما از آنجا که ذغال فعال علاوه بر جذب ترکیبات ناخواسته نظیر فنل‌ها و اتیلن، هورمون‌ها را نیز جذب می‌کند، لذا دو غلظت مختلف آن (۱ و ۲ گرم در لیتر) در تکثیر شاخه‌ها بررسی شد (شکل ۱).

محیط‌های کشت فاقد هورمون BAP به عنوان شاهد استفاده شد. در هیچ‌یک از این محیط‌ها تکثیر جوانه‌های جانبی صورت نگرفت (تعداد شاخه در این محیط‌های کشت برای تجزیه داده‌ها ۰/۵ در نظر گرفته شد). بیشترین تولید شاخساره در محیط‌های فاقد ذغال فعال و حاوی ۱ گرم در لیتر ذغال فعال به دست آمد. اگرچه تعداد شاخه در محیط کشت بدون ذغال نیز افزایش یافت، ولی گیاهان حاصل زرد

بوده و برای حفظ آنها نیاز است که به محیط کشت حاوی ذغال منتقل شوند (شکل ۲). به‌نظر می‌رسد که محیط کشت حاوی ۱ گرم در لیتر ذغال فعال بهترین انتخاب باشد. در این محیط، نظیر محیط‌های فاقد ذغال، فعال، با افزایش غلظت



شکل ۲. تکثیر شاخه در محیط کشت حاوی BAP. سمت راست: محیط حاوی ۱ گرم در لیتر ذغال فعال (BAP ۳ mg/l) و سمت چپ: محیط بدون ذغال فعال (BAP ۲ mg/l)



شکل ۳. اثر نوع هورمون سیتوکینین در تکثیر شاخه‌ها در محیط حاوی ۱g/l ذغال فعال

BAP، تعداد شاخه‌ها افزایش یافته است. در محیط کشت فاقد ذغال فعال، تعداد شاخه در غلظت ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر هورمون BAP با تعداد شاخه در غلظت ۱ میلی‌گرم در لیتر هورمون BAP در محیط حاوی ۱ گرم در لیتر ذغال فعال، برابری می‌کند. این نتیجه می‌تواند اثر منفی ذغال فعال در جذب هورمون BAP را تأیید کند. به نظر می‌رسد در غلظت ۲ گرم در لیتر ذغال فعال، جذب هورمون‌ها بسیار شدید بوده و همین عامل سبب ناهماهنگی تکثیر شاخه‌ها با افزایش غلظت BAP شده است. روش تکثیر ساقه‌های جانبی در بیشتر گیاهان از اندام‌زایی و جنین‌زایی آسان‌تر بوده و ثبات ژنتیکی نتاج نیز نسبت به گیاه والد حفظ می‌شود. در این روش، برای غلبه بر غالبیت انتهایی و افزایش تولید ساقه در زاویه دمبرگ‌ها، مقدار زیادی هورمون سیتوکینین استفاده می‌شود. اما نوع و غلظت مورد استفاده آن در محیط کشت به ژنوتیپ و محتوای هورمونی درون ریزنمونه بستگی دارد (۴). سیتوکینین‌ها نقش مهمی در جنبه‌های مختلف رشد، متابولیسم و توسعه گیاه دارند. از جمله مهمترین آنها می‌توان غلبه بر چیرگی انتهایی و رشد جوانه‌های جانبی، جنین‌زایی، به‌تأخیر انداختن پیری برگ‌ها و تحریک تقسیم سلولی را نام برد (۴، ۸ و ۱۰).

تعیین بهترین نوع هورمون سیتوکینین در تولید شاخه‌ها

نتایج نشان داد که با افزایش غلظت هورمون‌های سیتوکینین، تعداد شاخه نیز افزایش می‌یابد. این افزایش در تیمار BAP مشخص‌تر می‌باشد (شکل ۳). به طور کلی تعداد شاخه تولید

شده در تیمارهای BAP بیش از تولید در دو نوع هورمون دیگر می‌باشد.

بر اساس برخی گزارش‌ها نیز BAP به‌عنوان مؤثرترین سیتوکینین مورد استفاده در شاخه‌زایی بسیاری از گیاهان معرفی شده و کینتین از نظر اهمیت در درجه دوم قرار دارد (۲ و ۴). اما در مورد گیاه پروانش به نظر می‌رسد پس از BAP، هورمون زآتین نقش بیشتری در تکثیر شاخه‌ها داشته باشد، زیرا شروع القای شاخه‌زایی در تیمارهای زآتین در غلظت‌های کمتر از کینتین اما بیشتر از BAP انجام شده است. با توجه به این نتایج و قیمت بالای هورمون زآتین و ناپایداری آن در شرایط دمای زیاد (اتوکلاو)، استفاده از این هورمون برای تولید چندشاخه‌ای در پروانش توصیه نمی‌شود. نکته جالب توجه در تیمار با هورمون زآتین رنگ سبز تیره برگ‌های گیاه و طول ساقه کوتاه آنها بود. این مشاهدات، نقش هورمون زآتین در تمایز کلروپلاست‌ها را تأیید می‌کند. در تحقیقات دیگر نیز گیاهان *Hymenocallis littoralis* کشت شده در محیط حاوی هورمون زآتین بیشترین میزان کلروفیل را دارا بودند (۲۵).

در تیمارهای حاوی هورمون کینتین در غلظت ۴ میلی‌گرم در لیتر نیز تعداد شاخه کمتری نسبت به تیمارهای حاوی غلظت‌های کم BAP (۱ میلی‌گرم در لیتر) تولید شد. مطالعات سید طباطبایی و امیدی (۲) نشان داده است که غلظتی از BAP که برای شاخه‌زایی به کار می‌رود اغلب بین ۱ تا ۱۰ میکرومولار است. در حالی که غلظت مناسب برای شاخه‌زایی در کینتین بین ۲۰ تا ۵۰ میکرومولار است. این تفاوت دامنه غلظت‌ها قدرت بیشتر BAP برای شاخه‌زایی را نشان می‌دهد. از آنجا که در این پژوهش هورمون BAP با غلظت‌های کم، تعداد زیادی شاخه از ریزنمونه گره تشکیل داد، بنابراین استفاده از غلظت‌های زیاد هورمون کینتین منطقی به نظر نمی‌رسد. هم‌چنین هورمون BAP نسبتاً ارزان‌تر و مقاوم به شرایط اتوکلاو است. لذا با توجه به نتایج به دست آمده، استفاده از آن برای شاخه‌زایی پیشنهاد می‌گردد. نکته جالب توجه در استفاده از هورمون کینتین، رشد طولی زیاد ریزنمونه‌ها بود.

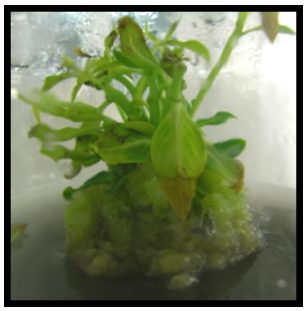
استفاده از غلظت‌های مختلف هورمون‌های سیتوکینین برای القای صفت چند شاخه‌ای در گیاه پروانش در محیط کشت مایع نیز نشان داد که طول شاخه‌ها در تیمارهای کینتین بیش از BAP و تعداد شاخه‌ها کمتر است (۲۲). دلیل این رویداد می‌تواند توانایی هورمون سیتوکینین در جوان نگه‌داشتن بافت‌ها باشد. هم‌چنین یکی از آثار نامطلوب استفاده از ذغال فعال در محیط کشت، جذب هورمون‌ها می‌باشد (۴). اما اطلاعاتی در زمینه میزان جذب هورمون کینتین در دسترس نیست. بنابراین ممکن است این هورمون بیش از هورمون BAP توسط ذغال فعال جذب شده و مقدار اندکی که در اختیار گیاه قرار می‌گیرد، برای تکثیر جوانه‌های جانبی کافی نباشد. اما همچنان اثر افزایش تقسیم سلولی، به ویژه در بخش‌های فعالی مانند مریستم نوک ساقه، را داشته باشد.

تعیین بهترین ترکیب هورمونی برای رشد طولی شاخه‌ها

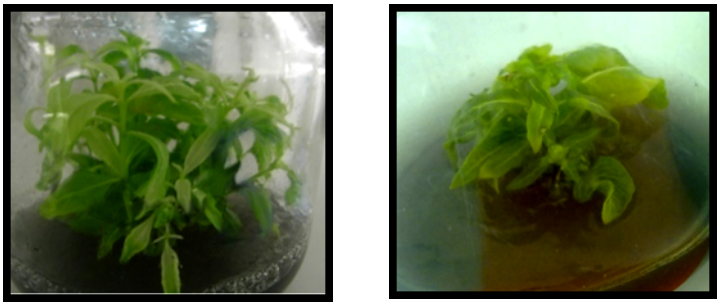
هورمون BAP به عنوان بهترین نوع هورمون سیتوکینین در تکثیر شاخه‌ها و غلظت ۱ گرم در لیتر ذغال فعال برای کشت ریزنمونه‌ها مناسب تشخیص داده شد. اما از آنجا که طول شاخه‌های تکثیر شده در محیط‌های کشت حاوی غلظت‌های زیاد BAP در اغلب موارد کوتاه بود، از هورمون اکسین برای بهبود رشد طولی شاخه‌ها استفاده شد.

باززایی و ایجاد ساقه‌چه به طور معمول به تیمار هم‌زمان اکسین و سیتوکینین نیاز دارد. در روش تکثیر سریع جوانه‌های جانبی، افزودن اکسین روند تکثیر ساقه‌ها را تسریع نمی‌بخشد. اما اگر به مقدار کم استفاده شود، اثر بازدارنده مقادیر زیاد سیتوکینین بر رشد طولی ساقه‌های جانبی را خنثی نموده و روند رشد ساقه‌ها را به حالت عادی بازمی‌گرداند (۲ و ۴). بدین منظور و برای جلوگیری از تولید کالوس از انواع ضعیف‌تر اکسین‌ها مانند IAA و NAA نسبت به اکسین‌های قوی (2,4-D) استفاده می‌شود (۲). از آنجا که هورمون IAA نسبت به NAA با شدت بیشتری توسط ذغال فعال جذب می‌شود (۴)،

در این پژوهش از هورمون NAA استفاده شد. با در نظر گرفتن جذب مقداری از این هورمون توسط ذغال فعال (۴)، غلظت ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر برای این پژوهش انتخاب گردید. استفاده از هورمون NAA برای افزایش رشد طولی شاخه‌ها به



شکل ۴. تشکیل بافت کالوس در زیر ریزنمونه در محیط کشت با کاربرد همزمان BAP و NAA



شکل ۵. سمت راست: گیاهان با رشد طولی کم و سمت چپ: افزایش رشد طولی گیاهان در محیط کشت حاوی NAA

دو صورت انجام گرفت. در روش اول، کشت ریزنمونه در محیط‌های کشت حاوی ترکیب هورمون NAA و BAP و در روش دوم شاخه‌های با رشد طولی کم به محیط کشت حاوی هورمون NAA انتقال یافت. نتایج نشان داد که در تیمارهایی که هورمون‌های NAA و BAP همزمان با یکدیگر در محیط کشت استفاده شدند، بافت کالوس زیادی در قسمت پایین شاخه‌ها ایجاد شد که به نظر می‌رسد از بخش‌های سازمان نیافته ریزنمونه تولید شده باشد. اگرچه این بافت مانع از تشکیل شاخه‌ها و رشد آنها نشد، ولی در این تیمارها تعداد شاخه‌ها کمتر و فرم آنها غیر طبیعی و علفی بود (شکل ۴). دلیل این فرم علفی می‌تواند حضور هورمون اکسین در محیط باشد که سبب افزایش رشد طولی شاخه‌ها می‌شود. هم‌چنین تولید کالوس، تشکیل ریشه را نیز متوقف می‌کند. در مطالعه تأثیر هورمون‌های گیاهی و نور بر میزان آلکالوئیدهای کاتارانتین و وین‌دولین در کشت تولید چندشاخه‌ای پروانش نیز تیمارهایی که هورمون‌های اکسین و سیتوکینین به طور هم‌زمان حضور داشتند، به‌دلیل تولید بافت کالوس، تعداد شاخه کمتری تولید نمودند (۱۳).

در روش دوم، گیاهانی که در محیط حاوی BAP تکثیر شده بودند اما رشد طولی مناسبی نداشتند، به محیط کشت حاوی ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر هورمون NAA انتقال یافتند. در این روش، اگرچه در برخی موارد مقدار کمی کالوس در قسمت پایین شاخه‌ها تشکیل شد، اما شاخه‌ها دارای رشد طولی مناسبی بوده و برای انتقال به محیط کشت ریشه‌دهی آماده شدند (شکل ۵).

ریشه‌دهی ساقه‌ها

شاخه‌های حاصل از باززایی مستقیم گیاه پروانش در محیط کشت فاقد هورمون و حاوی ۲ گرم در لیتر ذغال فعال تولید ریشه نمودند. اغلب ساقه‌هایی که رشد مناسبی داشته‌اند برای القای ریشه‌دهی به محیط حاوی اکسین منتقل می‌شوند که در بین انواع هورمون‌های اکسین، NAA در القای ریشه‌دهی

موفق‌تر بوده است. اما در بسیاری از گیاهان، به دلیل 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. از آنجا که در کشت بافت پروانش از ذغال فعال استفاده می‌شود، تاریک شدن محیط اطراف قسمت انتهایی ساقه سبب می‌شود که هورمون اکسین ساقه‌های جوان و پیش ماده‌های تولید آن 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. هم‌چنین افزودن هورمون اکسین اضافی در محیط کشت ریشه‌دهی، منجر به تشکیل بافت کالوس و توقف تولید ریشه می‌شود (۲۱).

برخی از گیاهان چندشاخه تولید شده در محیط کشت حاوی BAP مستقیماً تولید ریشه نمودند. این مورد بیشتر در محیط‌های حاوی ۲ گرم در لیتر ذغال فعال در هر چهار غلظت هورمون BAP و محیط حاوی ۱ گرم در لیتر ذغال فعال در غلظت‌های کم هورمون BAP دیده شد. این امر ممکن است به‌دلیل جذب هورمون BAP توسط ذغال فعال باشد، زیرا سیتوکینین‌ها به طور معمول از تشکیل ریشه جلوگیری می‌کنند. ولی اگر به مقدار مناسب و نسبت صحیح با اکسین‌ها به‌کار روند اثر نامطلوبی روی تشکیل ریشه ندارند (۴).

گیاهچه‌های ریشه‌دار شده در محیط کشت انتخابی، پس از سازگار شدن در شرایط محیطی، رشد مناسبی نمودند که نشان دهنده کارآیی روش استفاده از ریزنمونه گره در باززایی مستقیم گیاه پروانش است.

نتیجه‌گیری

به طور کلی، نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که استفاده از هورمون سیتوکینینی BAP در محیط کشت حاوی ۱ g/l ذغال فعال بهترین باززایی مستقیم جوانه جانبی و تکثیر شاخه را دارد و انتقال شاخه‌های باززا شده به محیط کشت حاوی NAA، رشد طولی شاخه‌ها را تسریع می‌کند. از آنجا که تولید داروهای وین‌بلاستین و وین کریستین در بافت‌های تمایز یافته گیاه پروانش تولید می‌گردد، بنابراین استخراج این آلکالوئیدها در روش باززایی مستقیم از اهمیت ویژه‌ای 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 الکتروفورزی سرده وینکا، کشت بافت و سلول در جهت ایجاد کموتایپ‌های 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. Europ. Res. Conf. on Plant Cell Biol. and Biotechnol. Appl., 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. Hort. 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. Int. J. Compreh. Pharm. 4(12): 1-16.
8. Decendit, A., D. Liu, L. Ouelhazi, P. Doireau, J. M. Merillon and M. Rideau. 1992. Cytokinin-enhanced accumulation of indole alkaloids in *Catharanthus roseus* cell cultures-the factors affecting the cytokinin response. Plant Cell Rep. 11: 400-403.
9. 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. Develop. Biol.-Plant 44: 18-25.

10. Garnier, F., P. Label, D. Hallard, J. C. Chenieux, M. Rideau and S. Hamdi. 1996. Transgenic periwinkle tissues overproducing cytokinins do not accumulate enhanced levels of indole alkaloids. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 45(3): 223-230.
11. Hashimoto, T. and Y. Yamada. 1994. Alkaloid biogenesis: Molecular aspects. Annu. Rev. Plant Physiol. 45: 257-285.
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. Hirata, K., M. Horiuchi, T. Ando, K. Miyamoto and Y. Miura. 1990. Vindoline and catharanthine production in multiple shoot cultures of *Catharanthus roseus*. J. Ferment. Bioeng. 70(3): 193-195.
14. Hisiger, S. and M. Jolicoeur. 2007. Analysis of *Catharanthus roseus* alkaloids by HPLC. Phytochem. Rev. 6: 207-234.
15. Hughes, E. H. and J. V. Shanks. 2002. Metabolic engineering of plants for alkaloid production. Metabol. Eng. 4: 41-48.
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. Liu, D. H., H. B. Jin, Y. H. Chen, L. J. Cui, W. W. Ren, Y. F. Gong and K. X. Tang. 2007. Terpenoid indole alkaloids biosynthesis and metabolic engineering in *Catharanthus roseus*. J. Integr. Plant Biol. 49(7): 961-974.
18. Meijer, A. H., R. Verpoorte and J. H. C. Hoge. 1993. Regulation of enzymes and genes involved in terpenoid indole alkaloid biosynthesis in *Catharanthus roseus*. J. Plant Res. 3: 145-146.
19. Memelink, J. and P. Gantet. 2007. Transcription factors involved in terpenoid indole alkaloid biosynthesis in *Catharanthus roseus*. Phytochem. Rev. 6: 353-362.
20. Mustafa, N. R. and R. Verpoorte. 2007. Phenolic compounds in *Catharanthus roseus*. Phytochem. Rev. 6: 243-258.
21. Pan, M. J. and J. van Staden. 1998. The use of charcoal in *In vitro* culture– A review. Plant Growth Regul. 26**:** 155-163.
22. Pati, P. K., J. Kaur and P. Singh. 2010. A liquid culture system for shoot proliferation and analysis of pharmaceutically active constituents of *Catharanthus roseus* (L.) G. Don. Plant Cell Tiss. Organ Cult.10: 1-9.
23. 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. Canc. Res. 67(5): 2217-2225.
24. Pietrosiuk, A., M. Furmanowa and B. Lata. 2007. *Catharanthus roseus*: micropropagation and *in vitro* techniques. Phytochem. Rev. 6: 459-473.
25. Yew, C. K., B. Balakrishnan, J. Sundasekaran and S. Subramaniam. 2010. The effect of cytokinins on in vitro shoot length and multiplication of *Hymenocallis littoralis*. J. Med. Plants Res. 4(24): 2641-2646.
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.
27. Zhao, J. and R. Verpoorte. 2007. Manipulating indole alkaloid production by *Catharanthus roseus* cell cultures in bioreactors: From biochemical processing to metabolic engineering. Phytochem. Rev. 6: 435-457.