فصلنامه

زیست شناسی تکوینی

سال هشتم، شماره ۲، بهار ۱۳۹۵

بررسی مقدار زی توده و محتوای آلکالوئید تام در کشت بافت *H. arachnoideus* Pojark تحت اثر متقابل تغییرات غلظت NAA و منبع کربنی

مهدیس ابراهیم زاده معبود[۱]*، مهری مهرابی[۲]

[۱] گروه میکروبیولوژی، واحد کرج، دانشگاه آزاد اسلامی، کرج، ایران.

[۲] مجتمع علوم پایه کشاورزی، دانشگاه پیام نور تهران

E-mail: m_ebr1974@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۱۰/۲۳ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۴/۱۲/۱۲

چکیده

اثرات درمانی سرده بنگ (Hyoscyamus) به خاطر وجود تروپان آلکالوئیدهای مختلف موجود در آن می‌باشد. کشت بافت که در طی آن می‌توان با تغییر در محیط‌کشت به حجم بهینه‌ای از بافت‌های مناسب از نظر تولید متابولیت‌های ثانوی دست یافت، در مورد این نوع گیاهان دارویی کمیاب اهمیت خاصی دارد. در مطالعه حاضر، گونه *H. arachnoideus* Pojark مورد بررسی قرار گرفت. دو نوع جداکشت (برگ و ریشه) که از دانه رست‌های این گونه به دست آمدند، بر روی محیط‌کشت موراشیگ و اسکوگ حاوی ۳٪ سوکروز و ۷/۵ گرم آگار کشت داده شدند. اثرات دو نوع منبع کربنی (سوکروز و مانیتول) را روی محیط‌کشت MS حاوی ۳٪ سوکروز و ۷/۵ گرم آگار، در جداکشت‌های برگ و ریشه گونه *H. arachnoideus* با چهار غلظت از اکسین NAA (۰، ۰/۵، ۱، ۲ میلی‌گرم بر لیتر)، در مقابل محیط کشت MS حاوی ۳٪ سوکروز و ۷/۵ گرم آگار، به عنوان گروه شاهد، بررسی کردیم تا اثر این عوامل را بر مقدار زی توده کالوسی و محتوای آلکالوئید تام تعیین نماییم. یافته‌های ما، از نقش دو گانه سوکروز، هم به عنوان منبع تغذیه گیاه و هم به عنوان تنظیم کننده فشار اسمزی، حمایت کرد؛ و نیز اثر مثبت سوکروز را بر مقدار زی توده کالوسی و محتوای آلکالوئید تام، مورد تایید قرار داد.

کلیدواژه‌ها: آلکالوئید تام، بنگ، تنظیم کنند رشد، کالوس‌زایی، منبع کربن

مقدمه

تقاضای شدید و در حال افزایش در بازار کنونی برای تولیدات جدید و طبیعی، توجه را بر مواد گیاهی کشت داده شده در شرایط در شیشه، به عنوان کارخانه‌های بالقوه برای تولید متابولیت‌ها ثانویه متمرکز کرده است و راه را برای پژوهش‌های جدید در کشف و ظهور ترکیبات ثانویه هموار نموده است [۷].

Archive of SID

www.SID.ir

مزایای عمده سیستم کشت سلولی عبارتند از: ۱- ترکیبات مفید می‌توانند تحت شرایط کنترل شده غیر وابسته به تغییرات اقلیمی یا شرایط خاکی تولید شوند. ۲- سلول‌های کشت داده شده عاری از میکروب‌ها و حشرات خواهند بود. ۳- سلول هر گیاهی، گرمسیری یا سردسیری می‌تواند به راحتی به منظور به دست آوردن متابولیت‌های ویژه، تکثیر شوند. ٤- کنترل خودکار رشد سلولی و تنظیم منطقی فرآیندهای سوخت و ساز، هزینه‌های نیروی کار را کاهش داده و باعث افزایش تولید می‌گردد. ۵- مواد زیستی از کشت‌های کالوسی قابل استخراج هستند [۱۸].

به‌منظور دستیابی به عملکرد بالای مناسب برای بهره‌وری تجاری، تلاش‌ها بر جداسازی فعالیت‌های بیوسنتزی سلول‌های کشت شده متمرکز گردیده است که نیل به این هدف به وسیله بهینه‌سازی شرایط کشت، انتخاب نژادهای دارای تولید بالاتر و به‌کار گیری پیش‌سازها، روش‌های انتقال و نیز تکنیک‌های غیر متحرک سازی، امکان پذیر شده است [۱۸].

تولید آلکالوئیدهای مهم از طریق ابزار بیوتکنولوژیکی مختلف، یک جایگزین جالب برای کشت گیاهان در شرایط طبیعی است، زیرا می‌تواند ذخیره سالیانه یکدست که به تغییرات فصلی گیاهان رشد کرده در شرایط مزرعه غیروابسته است را ضمانت کند اما از طرف دیگر تولید متابولیت‌های ثانویه مختلف در شرایط کشت سلولی در شیشه، با محدودیت‌هایی مواجه است و کاربرد تازنده‌ها[1]، راهکار موثری است که برای افزایش تولید آلکالوئیدهای مهم در کشت بافت و سلول به کار می‌رود [۲].

به‌علت هزینه بالای تولیدات صنعتی، آلکالوئیدهای تروپانی از گیاهان تیره سیب‌زمینی استخراج می‌شوند و هنوز هم جستجو برای یافتن منابع جدید ادامه دارد.

گیاهان سرده بنگ[2]، از جمله این گیاهان دارویی‌اند که با توجه به دارا بودن مقادیر قابل توجهی از تروپان آلکالوئیدها، از سالیان دور در درمان بسیاری از بیماری‌ها به کار گرفته شده‌اند. این تروپان آلکالوئیدها شامل هیوسیامین، اسکوپولامین وآتروپین می‌باشند که در تهیه ده‌ها ماده دارویی مورد استفاده قرار می‌گیرند. با توجه به اهمیت فوق العاده‌ای که گیاهان دارویی این سرده دارند، شناسایی عواملی که باعث افزایش ماده موثر دارویی آنها، که همان آلکالوئیدهای تروپانی است، می‌گردد، می‌تواند گام بلندی در پیشرفت صنعت داروسازی و درمان بسیاری از بیماری‌ها به شمار آید. تحقیقات انجام گرفته نشان داده است که نوع و مقدار آلکالوئیدها در گونه‌های مختلف این سرده با هم اختلاف داشته و حتی در یک گونه که در مناطق جغرافیایی مختلف روئیده‌اند نیز این اختلاف وجود دارد.

بنابراین، در این تحقیق سعی بر آن است که اثر عوامل مختلفی همچون اثر تغییرات غلظت عناصر در محیط کشت، تغییر نوع و مقدار هورمون‌های گیاهی بر رشد و تمایز بافت در گونه‌های مختلف مورد بررسی قرار گرفته و از نظر کمی و کیفی تغییرات آلکالوئیدهای آن شناسایی شوند، تا با به کارگیری عوامل موثر در بالا بردن این آلکالوئیدهای تروپانی، توجیه اقتصادی استخراج این مواد از گیاهان این سرده را به میزان قابل توجهی افزایش داد.

[1] Elicitors

[2] *Hyoscyamus*

Archive of SID

www.SID.ir

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی

در این مطالعه، بذرهای گونه *H. arachnoideus* Pojark (35833.TUH)، از سرده بنگبه عنوان ماده ی اولیه برای کشت در شیشه[1]، استفاده گردید. بذرهای *H. arachnoideus* از منطقه شهر تبریز مشتمل بر پارک ائل گلی، جاده وادی رحمت، ابتدای جاده باسمانج، جمع آوری شدند.

روش‌ها

محیط‌های کشت در شیشه

برای کالوس‌زایی و به دست آوردن ترکیبات مختلف مثل آلکالوئیدها در این مطالعه، از محیط‌کشت MS [۱٤]. استفاده شد.

برخی از بذرها به دلایل مختلف فیزیولوژیکی قادر به رویش نیستند و به اصطلاح دچار خفتگی می‌باشند. از آن جائیکه بذرهای مورد استفاده در این مطالعه دو ساله بودند، برای از بین رفتن خفتگی، بذرها به مدت ۱۲ ساعت در ژیبرلیک اسید (۳۵ میلی‌گرم بر لیتر) قرار داده شدند. بذرهای *H. arachnoideus* به علت داشتن پوسته سخت قادر به جوانه‌زنی نیستند. به منظور برطرف کردن این مانع، بذرهای این گونه به مدت ۳۰-۱۵ ثانیه در سولفوریک اسید غلیظ قرار گرفته و سپس چندین بار آبکشی شدند.

بذرهای سترون شده با استفاده از پنس سترون در محیط‌های کشت MS توزیع شده در پتری دیش‌های سترون، قرار داده شدند. پتری دیش‌های حاوی بذرها، در اتاق کشت تحت شرایط دمایی ۱±۲۵ درجه سانتی‌گراد و دوره نوری ۸ ساعت تاریکی و ۱٦ ساعت روشنایی با شدت نوری ۳۲/۵ میکرو مول بر متر مربع درثانیه، قرار گرفتند. بذرها پس از مدت زمان تقریبی ۱۰ روز جوانه زدند. از دانه رست‌های ٤ هفته‌ای به منظور تهیه جداکشت‌های ریشه و برگ برای انجام آزمایش‌های بعدی، استفاده گردید.

بررسی اثر جداکشت‌های مختلف، تیمارهای متفاوت از عناصر غذایی و نیز غلظت‌های مختلف از هورمون نفتالن استیک اسید (NAA)، بر میزان زی توده ی کالوسی، و محتوای آلکالوئید تام انجام گردید. بنابراین قطعه‌های جداکشتی مختلف در محیط‌های مختلف به شرح جدول ۱ قرار داده شدند و اثرات مورد نظر، در سطوح مختلف از غلظت هورمونی (جدول ۲)، بررسی گردید.

جدول ۱ تیمارهای مختلف به کار گرفته شده به منظور بررسی تاثیر کلسیم، نیترات و منبع کربنی بر تولید زی توده و آلکالوئید تام به دست آمده از کالوس ها

نام تیمار	محیط کشت
شاهد	MS*
T_1	MS* + 10 gr Monitol
T_2	MS* + 10gr Sucrose

* در تمامی موارد، به محیط کشت MS، ۳۰ گرم سوکروز و ۷/۵ گرم آگار، اضافه شد.

جدول ۲ سطوح مختلف هورمونی به کار گرفته شده به منظور بررسی مقدار زی توده و آلکالوئید تام به دست آمده از کالوس‌ها

ردیف	غلظت نفتالن استیک اسید(NAA) mgl^{-1}
۱	۰
۲	۰/۵
۳	۱
٤	۲

داده‌ها به وسیله آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملا تصادفی با سه تکرار مورد بررسی قرار گرفتند. در مورد مقایسه بین دو گروه (دو نوع جداکشت)،

[1] *In vitro*

Archive of SID

www.SID.ir

تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از آزمون t- استیودنت در سطح $p\leq 0.05$ انجام شد.در مورد مقایسه بیش از دو گروه (مقایسه بین تیمارها)، داده‌ها، با استفاده از روش تجزیه واریانس یکطرفه، ANOVA، و به دنبال آن آزمون تعقیبی توکی در سطح $p\leq 0.05$ به منظور مقایسه میانگین‌ها، و با استفاده از نرم‌افزار آماری SPSS، مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند.

استخراج آلکالوئید به منظوراستخراج آلکالوئید، کالوس‌های به دست آمده از محیط‌های حاوی تیمارهای مختلف، ۸ هفته پس از کشت جداکشت‌ها، برداشت شدند. روش به کار گرفته شده برای استخراج آلکالوئید به شرح زیر می‌باشد [۱۳]:

۱- ابتدا ۰/۵ گرم از کالوس توزین و با استفاده از هاون به صورت پودر در آمد.

۲- پودر حاصل در آمونیاک ۲۵٪ خیسانده شد.

۳- بر روی مخلوط بالا اتانول ریخته شد به طوریکه روی آن را کاملا پوشاند. سپس با هم زن شیشه‌ای مخلوط گردید.

٤- مخلوط حاصل به مدت ۱۵-۱۲ ساعت به حالت ساکن قرار گرفت.

۵- عصاره ی بالای پودر برداشته و از صافی عبور داده شد، روی پودر باقی‌مانده در ته ظرف اتانول ریخته و پس از مدتی مجددا صاف گردید. این عمل چند بار تکرار شد تا پودر کاملا به حالت بی رنگ درآمد. عصاره‌ی صاف شده‌ی حاصل، در معرض جریان هوا قرار گرفت و حلال آن پرانده شد.

٦- روی آنچه بر جداره ظرف باقی ماند، ۵ میلی‌لیتر هیدروکلریک اسید یک نرمال ریخته شد و ته مانده‌ی ظرف در اسید کاملا حل گردید.

۷- داخل یک دکانتور ۵ میلی‌لیتر اتر نفت ریخته و محلول اسیدی بالا به آن افزوده شد. در این مرحله دکانتور به شدت به طرف بالا و پایین تکان داده شد و محلول اسیدی که در فاز زیرین قرار گرفته جمع‌آوری و فاز بالایی حاوی اترنفت دور ریخته شد. این مرحله سه بار تکرار گردید.

۸- pH محلول اسیدی جمع‌آوری شده با آمونیاک ۲۵٪ به ۱۱ رسانده شد. از آنجاییکه این واکنش به شدت گرما زاست، این کار در یخ انجام گردید.

۹- محلول حاصل در داخل یک دکانتور ریخته و بر روی آن کلروفرم اضافه شد. کلروفرم که حاوی آلکالوئید است در فاز پایینی قرار گرفت و جمع‌آوری گردید. این مرحله سه مرتبه تکرار گردید.

۱۰- محلول کلروفرمی جمع‌آوری شده، در معرض جریان هوا قرار گرفت تا حلال آن پرانده شود.

۱۱- ماده باقی مانده در جداره ظرف، در یک میلی لیتر متانول حل شد و برای سنجش آلکالوئید مورد استفاده قرار گرفت.

سنجش آلکالوئید تام: محلول متانولی حاوی آلکالوئید در حجم های یک میلی لیتری تهیه شد و برای سنجش آلکالوئید مورد استفاده قرار گرفت. سنجش آلکالوئید تام با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر[1] UV، مورد بررسی قرار گرفت [۸].

به این منظور منحنی استاندارد توسط ماده استاندارد آتروپین سولفات در طول موج ۲۱۰ نانومتر رسم گردید و چگالی نوری(OD) هر یک از نمونه ها در همین طول موج خوانده شد. سپس با استفاده از فرمول خط منحنی استاندارد، مقدار آلکالوئید تام در

[1] UV-1601, UV-Visible Spectrophotometer, Shimadzu

Archive of SID

www.SID.ir

هر نمونه بر حسب میلی گرم در گرم وزن تر بافت محاسبه گردید.

معادله خط منحنی استاندارد:

$Y= 0.2233 X – 0.1167, R^2 = 0.9442$

در این معادله، Y نشان دهنده چگالی نوری (OD) و X، نشان دهنده غلظت آلکالوئید تام خوانده شده توسط دستگاه اسپکتروفتومتر است. و R^2 بیانگر دقت استاندارد است که هرچه به ۱ نزدیک‌تر باشد، دقت استاندارد تهیه شده بالاتر است.

یافته‌های به دست آمده از تاثیر تیمارهای منبع کربنی در محیط‌کشت MS، بر مقدار زی توده کالوسی و محتوای آلکالوئید تام در جداکشت‌های برگ و ریشه، در سطوح مختلف از غلظت‌های هورمونی داده‌های به دست آمده از مقادیر زی توده و آلکالوئید تام کالوسی در تیمارهای منبع کربنی، دارای توزیع نرمال بودند. نتایج به دست آمده از به کارگیری تیمارهای مختلف منبع کربنی در محیط کشت MS حاکی از وجود تفاوت‌هایی در مقدار زی توده تولید شده و محتوای آلکالوئید تام به دست آمده از کالوس‌های حاصل از جداکشت‌های برگ و ریشه بود. در این مطالعه، دو نوع منبع کربنی به محیط‌کشت MS پایه به طور جداگانه اضافه شد که شامل مقادیر افزایش یافته ساکارز و نیز مقادیری از هیدروکربن مانیتول بود (جدول ۱). این تیمارهای غذایی در چهار سطح مختلف هورمونی به کار گرفته شد (جدول ۲) که به طور جداگانه مورد بررسی قرار گرفت.

الف. اثر منبع کربنی بر مقدار زی توده و آلکالوئید تام به دست آمده از کالوس در جداکشت‌های برگ و ریشه در محیط‌کشت فاقد هورمون ($NAA: 0mgl^{-1}$)

اثر منبع کربنی در جداکشت برگ: نتایج به دست آمده از تجزیه واریانس و مقایسه میانگین‌ها نشان داد که جداکشت برگی درگروه تیماری T_2 که حاوی هیدروکربن مانیتول بود نسبت به گروه T_1 که حاوی مقادیر افزایش یافته ساکارز بود، مقدار کالوس بیشتری تولید کرد، و زی توده کالوسی به دست آمده از این جداکشت در گروه شاهد، حد واسط این دو گروه بود. از طرف دیگر، تمامی گروه ها از نظر تولید آلکالوئید تام یکسان عمل کردند و از لحاظ آماری اختلاف معناداری بین این سه گروه دیده نشد (نمودار الف–۱).

اثر منبع کربنی در جداکشت ریشه: با توجه به نتایج به دست آمده از تجزیه واریانس و مقایسه میانگین‌ها، تفاوت آماری قابل ملاحظه‌ای بین دو گروه T_1 و T_2، از نظر مقدار زی توده کالوسی تولید شده، مشاهده نگردید. در حالی که گروه شاهد نسبت به دو گروه دیگر، مقدار زی توده کالوسی کمتری تولید نمود. کالوس‌های حاصل از جداکشت‌های ریشه، در گروه شاهد نسبت به محیط‌های دارای مقادیر افزایش یافته ساکارز(T_1) و محیط کشت حاوی مانیتول (T_2)، مقدار آلکالوئید تام بیشتری تولید نمود. به علاوه، محیط‌کشت حاوی مانیتول نسبت به محیط کشت حاوی مقادیر افزایش یافته ساکارز، از نظر تولید آلکالوئید تام برتری داشت (نمودار الف–۲).

اثر جداکشت‌های برگ و ریشه در گروه‌های شاهد و تیمار منبع کربنی

با توجه به اطلاعات به دست آمده از تجزیه و تحلیل داده‌ها با آزمون t – استیودنت، تفاوت معناداری بین دو جداکشت ریشه و برگ گونه *H. arachnoideus* در دو گروه شاهد و T_7، ازنظر مقدار زی توده کالوسی تولید شده وجود نداشت، در حالی که مقدار زی توده حاصل کالوس مربوط به

Archive of SID

www.SID.ir

گروه T_6، در جداکشت ریشه بیشتر از جداکشت برگ بود (نمودار الف-۳).

مقدار آلکالوئید تام تولید شده توسط کالوس‌های به دست آمده از جداکشت های برگ و ریشه در تمامی گروه‌ها تفاوت معناداری نشان داد. بدین صورت که، در دو گروه شاهد و T_2، مقدار آلکالوئید تام حاصل از کالوس‌های به‌دست‌آمده از جداکشت‌های ریشه بیشتر از جداکشت‌های برگی بود و در گروه T_1، کالوس‌های به دست آمده از جداکشت برگی نسبت به کالوس‌های حاصل از جداکشت ریشه مقدار آلکالوئید تام بیشتری تولید کردند (نمودار الف-٤).

ب. بررسی اثر منبع کربنی بر مقدار زی توده و آلکالوئید تام به دست آمده از کالوس در جداکشت‌های برگ و ریشه در سطح هورمونی NAA: 0.5mgl^{-1}

در این سطح از غلظت هورمونی نیز همانند سطح فاقد هورمون، گروه شاهد و تیمارهای منبع کربنی به کار برده شد (جدول ۱).

اثر منبع کربنی در جداکشت برگ: با توجه به اطلاعات حاصل از تجزیه واریانس و مقایسه میانگین‌ها، در جداکشت برگی، هیچ تفاوتی بین سه گروه شاهد، T_1 و T_2، از نظر تولید زی توده کالوسی وجود نداشت. از نظر تولید آلکالوئید تام، دو گروه T6 و T7 به طور مشابه عمل کردند و مقدار آلکالوئید تام به دست آمده از این دو گروه بیشتر از گروه شاهد بود (نمودار ب-۱).

اثر منبع کربنی در جداکشت ریشه: جداکشت ریشه، در هر سه گروه شاهد، T_1 و T_2، مقدار زی توده کالوسی یکسانی تولید کرد. از نظر تولید آلکالوئید تام، گروه T_2، نسبت به دو گروه شاهد و T_6 بهتر عمل کرد و گروه شاهد نسبت به دو گروه دیگر مقدار آلکالوئید تام کمتری تولید نمود (نمودار ب-۲).

اثر جداکشت‌های برگ و ریشه در گروه‌های شاهد و تیمار منبع کربنی

با توجه به اطلاعات به دست آمده از تجزیه و تحلیل داده‌ها با آزمون t- استیودنت، هر دو جداکشت برگ و ریشه، در سه گروه شاهد، T_1 و T_2 به طور یکسان عمل کردند؛ یعنی، تولید زی توده تحت تاثیر نوع جداکشت قرار نگرفت (نمودار ب-۳).

در گروه T_2، کالوس به دست آمده از جداکشت ریشه نسبت به کالوس حاصل از جداکشت برگ، آلکالوئید تام بیشتری تولید نمود و در سایر موارد اختلاف معنادار آماری مشاهده نشد (نمودار ب-٤).

پ. بررسی اثر منبع کربنی بر مقدار زی توده و آلکالوئید تام به دست آمده از کالوس در جداکشت‌های برگ و ریشه در سطح هورمونی NAA: 1mgl^{-1}

در این سطح هورمونی نیز مانند سطوح هورمونی قبل، گروه شاهد و دو گروه از تیمارهای منبع کربنی به کار برده شدند (جدول ۱).

اثر منبع کربنی در جداکشت برگ: اطلاعات به دست آمده از تجزیه واریانس داده‌ها و مقایسه میانگین‌ها نشان داد که گروه T_1 که حاوی مقادیر افزایش یافته ساکارز بود نسبت به دو گروه دیگر مقدار زی توده کالوسی بیشتری تولید نمود و دو گروه شاهد و T_2، از این نظر مشابه یکدیگر عمل کردند. تولید آلکالوئید تام در گروه شاهد بیشتر از دو گروه T_1 وT_2 بود و این دو گروه مقدار آلکالوئید تام یکسانی تولید نمودند (نمودار پ-۱).

اثر منبع کربنی در جداکشت ریشه: با توجه به نتایج حاصل از تجزیه واریانس و مقایسه میانگین‌ها،

Archive of SID

www.SID.ir

تولید زی توده کالوسی در این جداکشت تحت تاثیر تیمارمنابع کربنی قرار نگرفت. آلکالوئید تام تولید شده در گروه T_2، بیشترین مقدار و در گروه شاهد، کمترین مقدار را نشان داد (شکل پ-۲).

اثر جداکشت‌های برگ و ریشه در گروه‌های شاهد و تیمارهای منبع کربنی

با توجه به اطلاعات حاصل از تجزیه و تحلیل داده‌ها با آزمون t- استیودنت، مقدار زی توده کالوسی در هر دو نوع جداکشت برگ و ریشه در گروه شاهد یکسان بود و تفاوت معناداری را در بین دو نوع جداکشت نشان نداد. اما در دو گروه دیگر، مقدار کالوس تولید شده تحت تاثیر نوع جداکشت قرار گرفت؛ به این ترتیب که تولید کالوس در هر دو گروه، در جداکشت برگ بیشتر از جداکشت ریشه بود (نمودار پ-۳).

تولید آلکالوئید تام نیز تحت تاثیر نوع جداکشت قرار گرفت. در گروه شاهد و T_1، کالوس‌های به وجود آمده از جداکشت برگ نسبت به کالوس‌های حاصل از جداکشت ریشه، آلکالوئید تام بیشتری تولید کردند؛ در حالی که در گروه T_2، این مقدار در جداکشت ریشه بیشتر از جداکشت برگ بود (نمودار پ-٤).

ت. بررسی اثر منبع کربنی بر مقدار زی توده و آلکالوئید تام به دست آمده از کالوس در جداکشت‌های برگ و ریشه در سطح هورمونی $NAA: 2mgl^{-1}$

در این سطح هورمونی نیز مانند سطوح هورمونی قبل، گروه شاهد و دو گروه از منابع کربنی به کار برده شد (جدول ۱).

اثر منبع کربنی در جداکشت برگ: با توجه به نتایج به دست آمده از تجزیه واریانس و مقایسه میانگین‌ها، تولید زی توده کالوسی در جداکشت برگی این گونه در سطح هورمونی $NAA: 2mgl^{-1}$، تحت تاثیر نوع منبع کربنی قرار نگرفت و جداکشت برگی در هر سه گروه به طور مشابه عمل کرد. اما، تولید آلکالوئید تام در کالوس‌های به‌دست آمده از جداکشت برگی، در گروه T_2 بیشتر از سایر گروه‌ها بود و گروه T_1 کمترین مقدار آلکالوئید تام را نشان داد (نمودار ت-۱).

اثر منبع کربنی در جداکشت ریشه: در جداکشت ریشه این گونه، هر سه گروه از نظر مقدار زی توده کالوسی تولید شده به طور یکسانی عمل کردند. به علاوه، گروه T_1 نسبت به دو گروه دیگر، آلکالوئید تام بیشتری تولید کرد و دو گروه دیگر، از این نظر، به طور مشابه عمل کردند (نمودار ت-۲).

اثر جداکشت‌های برگ و ریشه در گروه‌های شاهد و تیمارهای منبع کربنی

با توجه به اطلاعات مربوط به تجزیه و تحلیل داده‌ها با آزمون t- استیودنت، مقدار زی توده کالوسی در هر دو نوع جداکشت برگ و ریشه در گونه *H. arachnoideus*، مقادیر یکسانی داشت(نمودار ت-۳).

در حالی که تولید آلکالوئید تام به شدت تحت تاثیر نوع جداکشت قرار گرفت، به این ترتیب که در دو گروه شاهد و T_2، کالوس‌های تولید شده در جداکشت برگ نسبت به کالوس‌های حاصل از جداکشت ریشه، دارای عملکرد بیشتری بودند، اما در گروه T_1، عملکرد جداکشت ریشه از جداکشت برگ بهتر بود (نمودار ت-٤).

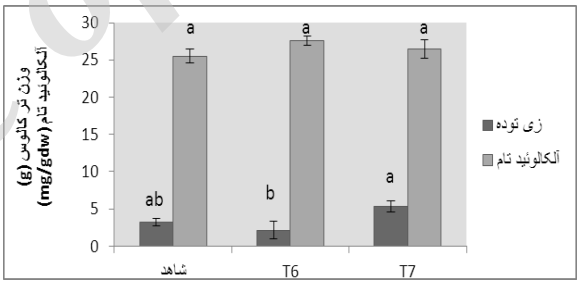
Archive of SID

www.SID.ir

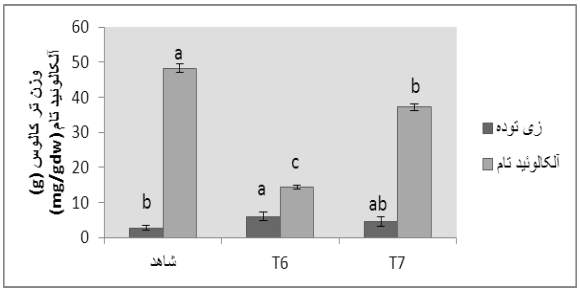
* در تمامی نمودارها، ستون‌ها بیانگر میانگین سه تکرار ± انحراف معیار می‌باشند.

– در نمودارهایی که مربوط به هر کدام از جداکشت‌ها به‌طور جداگانه است (مقایسه بین تیمارها)، مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون توکی و در سطح آماری $p\leq0.05$ انجام شده است. حروف الفبایی یکسان بر روی ستون‌های مشابه، نشان دهنده عدم تفاوت معنادار بین میانگین ها می باشد.

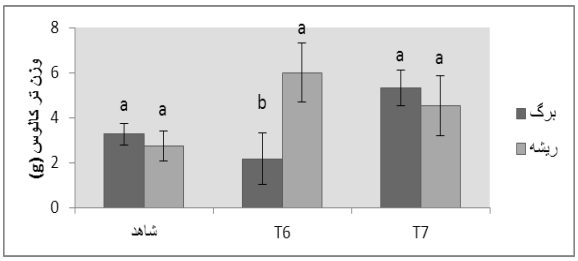
– در نمودارهایی که مقایسه بین دو نوع جداکشت است، تجزیه و تحلیل داده ها، با استفاده از آزمون t – استیودنت و در سطح آماری $p\leq0.05$ انجام شده است. حروف الفبایی یکسان بر روی ستون های غیرمشابه، نشان دهنده عدم تفاوت معنادار بین میانگین ها است.



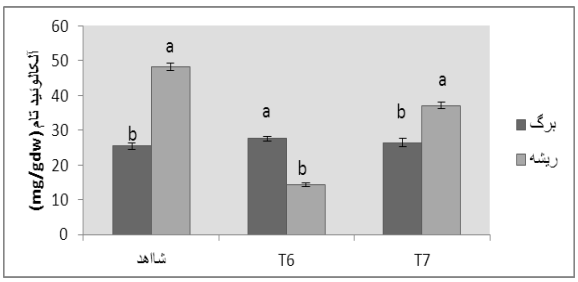
نمودار الف–۱: مقدار زی توده و آلکالوئید تام به دست آمده از جداکشت برگ گونه *H .arachnoideus* در گروه‌های شاهد و تیمارهای منبع کربنی فاقد هورمون ($NAA: 0mgl^{-1}$)



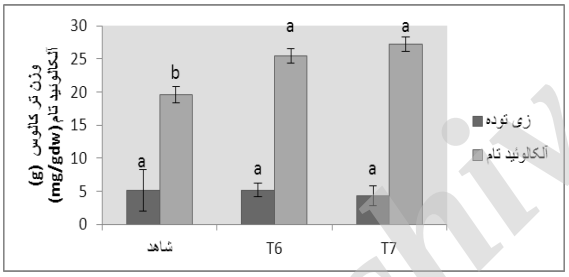
نمودار الف–۲: مقدار زی توده و آلکالوئید تام به دست آمده از جداکشت ریشه گونه *H .arachnoideus* در گروه‌های شاهد و تیمارهای منبع کربنی فاقد هورمون ($NAA: 0mgl^{-1}$)



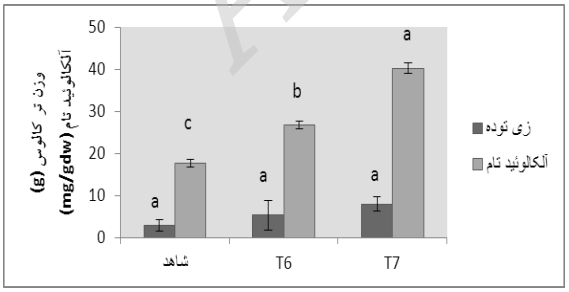
نمودار الف–۳ : تاثیر جداکشت‌های برگ و ریشه بر مقدار زی توده به دست آمده از کالوس در گونه *H. arachnoideus* در گروه‌های شاهد و تیمارهای منبع کربنی فاقد هورمون ($NAA: 0mgl^{-1}$)



نمودار الف–٤ تاثیر جداکشت‌های برگ و ریشه بر مقدار آلکالوئید تام به‌دست آمده از کالوس در گونه *H. arachnoideus* در گروه‌های شاهد و تیمارهای منبع کربنی فاقد هورمون ($NAA: 0mgl^{-1}$)



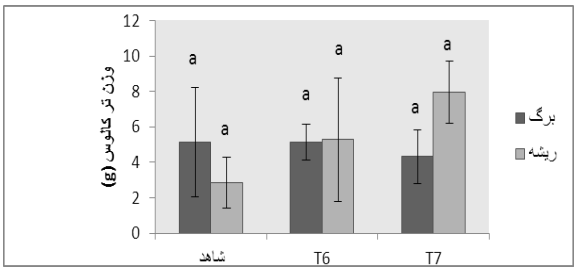
نمودار ب–۱: مقدار زی توده و آلکالوئید تام به دست آمده از جداکشت برگ گونه *H. arachnoideus* در گروه‌های شاهد و تیمارهای منبع کربنی در سطح هورمونی $NAA: 0.5mgl^{-1}$



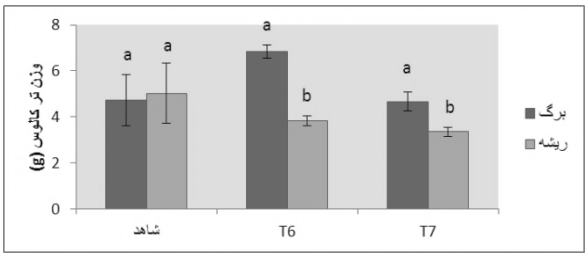
نمودار ب–۲: مقدار زی توده و آلکالوئید تام به دست آمده از جداکشت ریشه گونه *H .arachnoideus* در گروه های شاهد و تیمارهای منبع کربنی در سطح هورمونی $NAA: 0.5mgl^{-1}$

Archive of SID

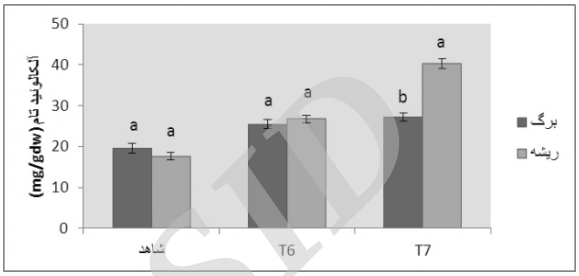
www.SID.ir



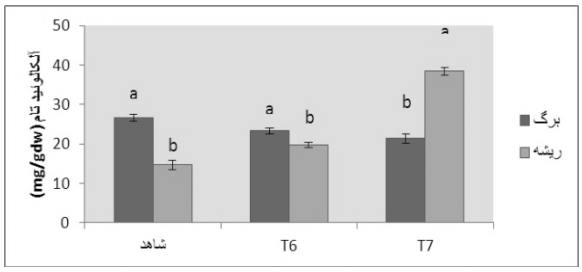
نمودار ب-۳ : تاثیر جداکشت‌های برگ و ریشه بر مقدار زی توده به دست آمده از کالوس در گونه ***H. arachnoideus*** در گروه‌های شاهد و تیمارهای منبع کربنی در سطح هورمونی **NAA: 0.5mgl^{-1}**



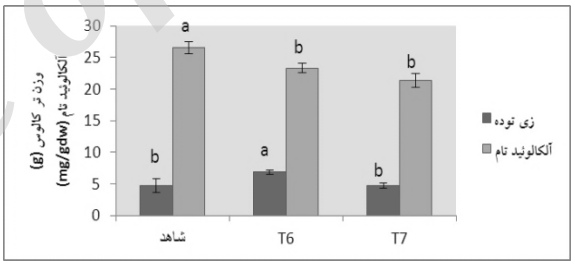
نمودار پ-۳ : تاثیر جداکشت‌های برگ و ریشه بر مقدار زی توده به دست آمده از کالوس در گونه ***H .arachnoideus*** در گروه‌های شاهد و تیمارهای منبع کربنی در سطح هورمونی **NAA: 1mgl^{-1}**



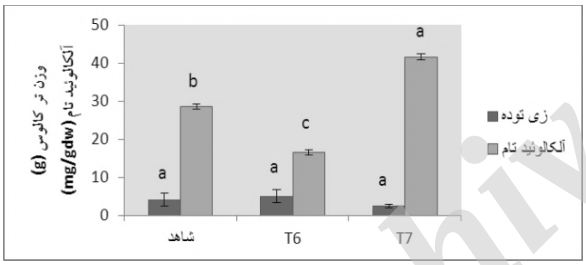
نمودار ب-٤: تاثیر جداکشت‌های برگ و ریشه بر مقدار آلکالوئید تام بدست آمده از کالوس در گونه ***H. arachnoideus*** در گروه‌های شاهد و تیمارهای منبع کربنی در سطح هورمونی **NAA: 0.5mgl^{-1}**



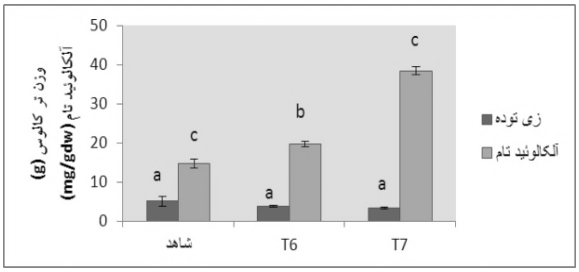
نمودار پ-٤: تاثیر جداکشت‌های برگ و ریشه بر مقدار آلکالوئید تام بدست آمده از کالوس در گونه ***H. arachnoideus*** در گروه های شاهد و تیمارهای منبع کربنی در سطح هورمونی **NAA: 1mgl^{-1}**



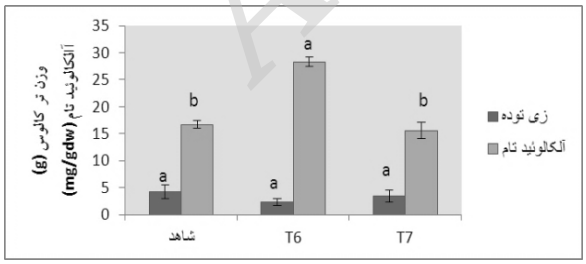
نمودار پ-۱: مقدار زی توده و آلکالوئید تام به دست آمده از جداکشت برگ گونه ***H. arachnoideus*** در گروه‌های شاهد و تیمارهای منبع کربنی در سطح هورمونی **NAA: 1mgl^{-1}**



نمودار ت-۱: مقدار زی توده و آلکالوئید تام به دست آمده از جداکشت برگ گونه ***H. arachnoideus*** در گروه های شاهد و تیمارهای منبع کربنی در سطح هورمونی **NAA: 2mgl^{-1}**



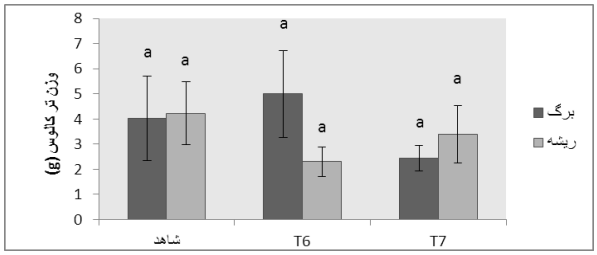
نمودار پ-۲: مقدار زی توده و آلکالوئید تام به دست آمده از جداکشت ریشه گونه ***H. arachnoideus*** در گروه های شاهد و تیمارهای منبع کربنی در سطح هورمونی **NAA: 1mgl^{-1}**



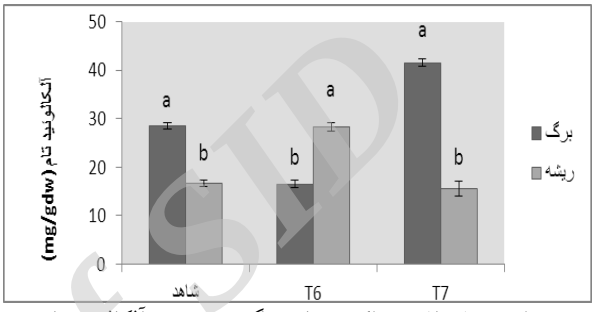
نمودار ت-۲ : مقدار زی توده و آلکالوئید تام به دست آمده از جداکشت ریشه گونه ***H. arachnoideus*** در گروه های شاهد و تیمارهای منبع کربنی در سطح هورمونی **NAA: 2mgl^{-1}**

Archive of SID

www.SID.ir



نمودار ت-۳ : تاثیر جداکشت‌های برگ و ریشه بر مقدار زی توده به دست آمده از کالوس در گونه *H.arachnoideus* در گروه‌های شاهد و تیمارهای منبع کربنی در سطح هورمونی NAA: 2mgl^{-1}



نمودار ت-٤: تاثیر جداکشت‌های برگ و ریشه بر آلکالوئید تام به دست آمده از کالوس در گونه *H.arachnoideus* در گروه‌های شاهد و تیمارهای منبع کربنی در سطح هورمونی NAA: 2mgl^{-1}

بحث:

بهینه‌سازی ترکیبات محیط‌کشت MS و بررسی تاثیر غلظت و نوع ترکیبات موجود در این محیط‌کشت، شامل بررسی منابع کربنی مورد استفاده در محیط‌کشت نیز می‌باشد. منبع کربنی بر هزینه مواد خام استفاده شده در کشت بافت گیاهی در مقیاس وسیع چیره می‌گردد و بنابراین از اهمیت بالایی در تجزیه و تحلیل فرایند های اقتصادی بر خوردار است [۹]. از مطالعات قبلی در زمینه کشت بافت مشخص می‌شود که غلظت ساکارز اولیه می‌تواند بر گستره‌ای از پارامترهای کشت نظیر سرعت رشد و عملکرد متابولیت‌های ثانویه و نیز نسبت وزن تر یاخته‌ای به وزن خشک یاخته‌ای تاثیر بگذارد. بنابراین تاثیر سوکروز به عنوان زیر لایه بیوشیمیایی و منبع تغذیه‌ای باید از نقش فیزیکی آن به عنوان یک حلال فعال اسمزی در محیط کشت، قابل تمایز باشد [۹]. بنابراین در مطالعه حاضر، محیط کشت حاوی مانیتول برای شناسایی نقش سوکروز در محیط کشت، مورد استفاده قرار گرفت.

به این منظور، بدون اینکه غلظت اولیه سوکروز در محیط‌کشت پایه MS (۳٪) تغییر کند به عنوان گروه شاهد در نظر گرفته شد. در یک گروه تیماری ۱٪ مانیتول به محیط کشت پایه اضافه شد و در گروه دیگر غلظت سوکروز در محیط‌کشت پایه به میزان ۱٪ افزایش یافت.

مانیتول، یک محصول اصلی حاصل از فرآیند فتوسنتزی در گیاهان سبز و جلبک‌ها می‌باشد و از طریق تنظیم اسمزی باعث بالا رفتن مقاومت گیاه به تنش کم آبی می‌گردد [۱۷]. این ماده اغلب یک منبع غیر فعال کربنی درکشت بافت گیاهی است و به عنوان یک افزودنی خنثی برای تنظیم اسمزی محیط کشت به کار می رود [۹].

نتایج به دست آمده از پژوهش حاضر، حاکی از عدم تفاوت در مقدار زی توده کالوسی تولید شده بین دو گروه حاوی مانیتول و گروه حاوی مقادیر افزایش یافته سوکروز در اغلب موارد و در تمامی جداکشت‌ها بود. این نتایج منطبق با یافته Brown و همکاران (۱۹۷۹) می‌باشد که در مطالعه‌ای نشان دادند که در محیط‌های حاوی سوکروز جایگزین شده با مانیتول، تولید شاخساره در گیاه تنباکو کاهش پیدا نکرد. با توجه به این یافته‌ها می‌توان چنین استنباط کرد که قسمتی از نقش ساکارز در محیط‌های غذایی کشت گیاه، به دلیل خاصیت اسمزی آن باشد.

طبق یافته‌های Swankar و همکاران (۱۹۸٦)، اثر سوکروز بر میزان القاء کالوس ممکن است به علت مشارکت آن در پتانسیل اسمزی محیط‌کشت باشد.

Archive of SID

www.SID.ir

Last و Brettle (۱۹۹۰) گزارش کردند که، سوکروز در محیط کشت، هم به عنوان تنظیم کننده فشار اسمزی و هم به عنوان منبع کربنی عمل می‌کند که هر دو عملکرد برای تشکیل کالوس مهم هستند.

از طرف دیگر، مانیتول به کار گرفته شده در جداکشت‌های برگی، اغلب تغییری را در محتوای آلکالوئید تام موجود در کالوس‌ها، نسبت به تیمارهای حاوی مقادیر افزایش یافته سوکروز، به وجود نیاورد و یا باعث کاهش آن شد. اما در جداکشت‌های ریشه‌ای، در اغلب موارد، مانیتول نسبت به سوکروز، محتوای آلکالوئید تام را در کالوس‌ها افزایش داد. به علاوه در برخی موارد افزودن مانیتول به محیط‌کشت باعث افزایش زی توده کالوسی در هر دو نوع جداکشت گردید. از آنجائیکه در هیچ کدام از گروه‌های تیماری کمبودی از لحاظ منبع تغذیه‌ای کربنی وجود نداشت، می‌توان علت افزایش محتوای آلکالوئید تام و مقدار زی توده کالوسی را در این موارد، به حضور مانیتول مربوط دانست. بدین معنا که مانیتول تاثیر مثبتی بر تولید کالوس و آلکالوئید تام داشت. افزایش مانیتول ممکن است فشار اسمزی بالایی به سیتوپلاسم یاخته وارد کند و بنابراین باعث القاء تنش و کالوس‌زایی و نیز افزایش محتوای آلکالوئید گردد. البته ممکن است این اثر، تنها به نقش مانیتول در تنظیم اسمزی مربوط نباشد.

طبق یافته‌های Abebe و همکاران ۲۰۰۳، معرفی ژن مانیتول دهیدروژناز (mtlD) به درون گیاه گندم باعث بهبود عملکرد گیاه شد. به علاوه، تفاوت آماری معناداری در تنظیم اسمزی، بین گیاه تراژن و گیاه شاهد، چه در سطح کالوسی و چه در گیاه کامل، وجود نداشت. این امر بیانگر تاثیر سودمند مانیتول در مکانیسم‌های حفاظتی نسبت به تنظیم اسمزی می‌باشد. احتمالا این مکانیسم‌های حفاظتی در برداشت رادیکال‌های هیدروکسیل (OH^-) و/یا تثبیت ماکرو مولکول ها دخیل می‌باشند.

در پژوهش حاضر، تاثیر غلظت‌های افزایش یافته سوکروز نسبت به محیط‌کشت پایه MS نیز مورد مطالعه قرار گرفت و مشخص شد که افزایش غلظت سوکروز از ۳٪ به ٤٪ در اغلب موارد، آلکالوئید تام را افزایش داد. در مورد زی توده کالوسی، این تیمار، در اکثر موارد تاثیری در مقدار آن نداشت و در برخی موارد آن را افزایش داد.

سوکروز در محیط‌کشت باعث افزایش فتوسنتز می‌گردد. Maldonado و Loyola (۱۹۹۵) گزارش کردند که فتوسنتز باعث ساخت تروپیک اسید و مانع آسیب آلکالوئید می‌شود.

به علاوه، Rothe و همکاران (۲۰۰۱)، نشان دادند که با افزایش سوکروز در کشت ریشه گیاه *Atropa belladonna* (تیره سیب‌زمینی)، میزان آلکالوئید افزایش می‌یابد. همچنین تاثیرات سودمند سوکروز در کالوس‌زایی در بسیاری از گیاهان نیز گزارش شده است [۵ و ٦].

از بین چهار سطح از غلظت‌های هورمونی به‌کار برده شده در این پژوهش، غلظت هورمونی ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر، یکنواختی بیشتری را نسبت به سایر غلظت‌ها نشان داد. بدین معنی که، در این سطح از غلظت هورمونی، در کلیه جداکشت های برگ و ریشه از هر دو گونه، افزایش محتوای آلکالوئید تام حاصل از کالوس، درگروه حاوی مانیتول وگروه حاوی مقادیر افزایش یافته سوکروز مشاهده شد. در حالی که در سایر سطوح از غلظت هورمون، برخی از جداکشت‌ها در یک یا دو گونه، افزایش و گروهی نیز کاهش نشان دادند که با توجه به گفته‌های قبلی، ممکن است به

Archive of SID

www.SID.ir

دلیل افزایش تنوعات سوماکلونی در اثر افزایش غلظت اکسین به کار برده شده باشد. طبق گزارش Bayliss (۱۹۸۰)، احتمال دارد که تنظیم کننده‌های رشد به‌طور ترجیحی میزان تقسیم یاخته‌های غیرطبیعی ژنتیکی را افزایش دهند و نیز طبق یافته‌های LoSchiavo (۱۹۸۹)، افزودن اکسین به کشت‌های کالوسی غیر سازمان یافته باعث افزایش تغییرات سوماکلونال از طریق افزایش میزان متیلاسیون DNA می‌گردد.

بنابراین می‌توان به این استنباط کلی دست یافت که تولید متابولیت‌های ثانویه در محیط‌های کشت، وابسته به ترکیبی از عوامل مختلف ژنوتیپی و محیطی و گاه تاثیرات متقابل این عوامل و همچنین جهش‌های به وجود آمده در یاخته‌ها در اثر عوامل مختلف می‌باشد. وجود تمامی این عوامل کار را برای تفسیر نتایج به دست آمده از یک فرایند زیستی دشوار می‌سازد، به نحوی که در بسیاری از موارد نمی‌توان به نتایج کاملا منسجمی دست یافت و یا با قاطعیت یک یا چند عامل را در این فرایندها دخیل دانست. آنچه مسلم است این که، تنها می توان به ارزیابی تاثیر این عوامل پرداخت و آن ها را در بهبود فرایندهای مطلوب به کار گرفت.

۱. نتایج به دست آمده از پژوهش حاضر، نقش دو گانه سوکروز در محیط‌کشت گیاهی را هم به عنوان منبع تغذیه‌ای و هم به عنوان تنظیم کننده اسمزی، تایید کرد.

۲. یافته‌های این پژوهش نشان داد که مانیتول می‌تواند از طریق ایجاد تنش اسمزی باعث افزایش محتوای آلکالوئید تام در کالوس گردد.

۳. با توجه به نتایج مطالعه حاضر، افزایش ساکارز دارای تاثیرات مثبتی بر مقدار زی توده کالوسی و محتوای آلکالوئید تام آن، بود.

منابع:

[1] Abebe T, Guenzi AC, Martin B, Chushman JC, 2003, Tolerance of Mannitol-Accumulating Transgenic Wheat to Water Stress and SAlinity. Plant Physiology, 131:1748-1755.

[2] AjunglaL, Patil PP, Barmukh RB, Nikam TD, 2009, Influence of Biotic and Abiotic Elicitors on Accumulation Hyoscyamin and Scopolamine in Root Culture of Daturametel L., Indian Journal of Biotechnology, 8:317-322.

[3] Bayliss MW (1980) Chromosomal variation in plant tissues in culture. Int. Rev. Cytol. Suppl. 11A: 113–144.

[4] Brown D. C. W., Leung D. W. M, Thorpe T.A., 1979, Osmotic Requirement for Shoot Formation in tobacco callus, Physiologia Plantarum, 44 (1): 36-40.

[5] Dhar U, Joshi M. 2005, Efficient Plant Regeneration Protocol through Callus for Saussureaobvallata (DC.) Edgew (Asteraceae): Effect of Explants Type, Age and Plant Growth Regulators. Plant Cell. Reports, 24: 195–200.

[6] Gopi C. and Vatsala T. M. 2006. In vitro studies on effects of plant growth regulators on callus and suspension culture biomass yield from Gymnemasylvestre R.Br. African Journal of Biotechnology Vol. 5 (12), pp. 1215-1219.

[7] Karuppusamy S. 2009, A review on Trends in Production of Secondary Metabolites from Higher Plants by in vitroTtissue, Organ and Cell Cultures. Journal of Medical Plants Research, 3 (13): 1222-1239.

[8] Kaufman PB, Cseke LJ, Warber S, Duke JA, Brielmann HL (1999) Natural Products from Plants. (CRC Press, Boca Raton, FL).

[9] Keng C. L., Saidon N. A., and Bhatt A.,2009, Somatic Embryogenesis and Root Regeneration in Hyoscyamusniger L. for the Production of Hyoscyamine, African Journal of Biotechnology, Vol. 8 (24), pp. 6952-6960.

[10] Last, D.J., and R.I.S. Brettell, 1990, Embryo Yield in Wheat Anther Culture is Influencedby the Choice of Sugar in the Culture Medium. Plant Cell Rep. 9: 14-16.

[11] LoSchiavo F, Pitto L, Giuliano G, Torti G, Nuti-Ronchi V, Marazziti D, Vergara R, Orselli S, Terzi M., 1989, DNA Methylation of Embryogenic Carrot Cell Cultures and its Variations as Caused by Mutation, Differentiation, Hormones and Hypomethylating Drugs. Theoretical and Applied Genetics , 77:325-331.

[12] Maldonado, M.I.E. and Loyola V.V.M., 1995, Establishment and Characterization of Photosyntethic of Hairy Root Cultures of Daturastramonium.Plant Cell Tiss. Org. Cult., 33:321-329 .

Archive of SID

www.SID.ir

[13] Mano Y, Nabeshima S, Matsui C, Ohkawa H (1986) Production of tropane alkaloids by hairy root cultures of scopolia japonica. AgricBiolChem 50: 2715-2722.
[14] Murashige T. and Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cul- tures. PhysiologiaPlantarum 15:473–497.
[15] Roth G, Garske U, Drager B, 2001, Calystegines in root culture of Atropa belladonna Respond to Sucrose, not to Elicitation, Plant Science, 160: 1043- 1053.
Swankar, P., S.P. Bohra, and N. Chandra. 1986, Biochemical Changes during Growth and Differentiation of the Callus of Solanumsurattense. J Plant Physiol. 76: 75-81.
[16] Valliyodan, B. & Nguyen, H.T. 2006, Biological mechanisms that influence soy protein concentration and composition. USA 103, 16666–16671.
[17] Vijayasree N, Udayasri P, V.V Aswanikumar Y, Ravi Babu B, Phanikumar Y, Vijay Varma M. 2010, Advancements in the Production of Secondary Metabolites. Indian Journal of Natural Products, 3: 112-123.

Archive of SID

www.SID.ir