



فصل نامه داروهای گیاهی

journal homepage: www.jhd.iaushk.ac.ir

بهینه سازی کالوس زایی و کشت سوسپانسیون سلولی گیاه دارویی پروانش

زیبا فولادوند^{۱*}، بهمن فاضلی نسب^۲، رضا دریگوند^۳، عبدالله قاسمی پیربلوطی^۴

۱. باشگاه پژوهشگران جوان و نخبگان دانشگاه آزاد اسلامی واحد خرم آباد، خرم آباد، ایران؛

*مسئول مکاتبات (Zibafooladvand83@gmail.com or Zfooladvand92@uoz.ac.ir)

۲. پژوهشکده زیست فناوری کشاورزی و پژوهشکده کشاورزی دانشگاه زابل، زابل، ایران؛

۳. گروه زراعت و اصلاح نباتات دانشگاه آزاد اسلامی واحد خرم آباد، خرم آباد، ایران؛

۴. مرکز پژوهش های گیاهان دارویی و دام پزشکی سنتی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد، شهرکرد، ایران؛

چکیده	شناسه مقاله
مقدمه و هدف: پروانش، گیاهی دارویی، حاوی بیش از ۱۳۰ نوع آلکالوئید ایندولی ترپنوئیدی، دو آلکالوئید دایمری وین بلاستین و وین کریستین، دارای خاصیت ضد توموری و در درمان بسیاری از سرطان ها بکار می‌رود. در این پژوهش، هدف تعیین ترکیب هورمونی برای تولید کالوس و سوسپانسیون سلولی می‌باشد.	تاریخ دریافت مقاله: ۹۲/۱۰/۱۳ تاریخ پذیرش مقاله: ۹۳/۱/۱۴ نوع مقاله: علمی - پژوهشی موضوع: بیوتکنولوژی
روش تحقیق: آزمایش کالوس زایی در قالب طرح فاکتوریل با سه عامل، ریز نمونه و سطوح هورمون‌های BAP و 4-D و 2، اجرا شد. بافت برگ در تعداد کمی از تیمارها، کالوس زایی بالاتری ولی قطعات ساقه در تیمارهای هورمونی مختلف، سطوح متوسطی از کالوس زایی را داشتند. در آزمایش سوسپانسیون سلولی از طرح آماری کاملاً تصادفی با شش تیمار هورمونی مختلف (BAP، KN، 4-D و 2) در سه تکرار استفاده شد	کلید واژگان: ✓ کالوس ✓ سوسپانسیون ✓ برگ ✓ ساقه ✓ تنظیم‌کننده‌های رشد
نتایج و بحث: تجزیه واریانس صفت تعداد سلول، برای تیمارهای سوسپانسیونی نشان داد که بین تیمارهای مختلف در سطح احتمال ۱ درصد اختلاف معنی‌دار وجود دارد و تیمار دوم بیشترین تعداد سلول را در بازه‌های زمانی مساوی در مقایسه با دیگر ترکیبات هورمونی تولید کرده است. تجزیه واریانس وزن خشک سلول‌ها نشان داد که بین تنظیم‌کننده‌های مختلف در سطح احتمال ۱ درصد اختلاف معنی‌داری وجود دارد، به طوری که تیمار سوم بالاترین تولید بیوماس را داراست.	
توصیه کاربردی / صنعتی: در این پژوهش با توجه به نتایج به‌دست آمده می‌توان در تولید انبوه این گیاه دارویی در شرایط درون شیشه‌ای از میزان ۲/۵ mg/l هورمون توفوردی و ۲ mg/l بنزیل آمینوپورین در محیط تولید کالوس در بافت برگ و ساقه این گیاه مناسب است.	

۱. مقدمه

در آزمایشی با کشت ریز نمونه‌های برگ و ریشه پروانش در محیط گامبورگ حاوی تنظیم‌کننده‌های 2,4-D^۲ و 6-بنزیل آمینوپورین کالوس‌های متراکم تولید شد. این کالوس‌ها به محیط سوسپانسیون حاوی تنظیم‌کننده‌های 2,4-D^۲ و BAP^۳ منتقل شدند. سلول‌های سوسپانسیون برای بررسی‌های سلول‌شناسی استفاده شدند. بررسی‌ها نشان داد که شکل سلول‌های جدا شده از کالوس‌های برگ و ریشه در حال تبدیل به یکدیگر بوده و مشخص شد که تنظیم‌کننده‌های رشد مستقل از بافت منشأ می‌توانند سلول‌ها را در مسیرهای مختلف رشد پیش ببرند (Dutta et al., 2007). از برگ‌های پروانش پرورش‌یافته در گلخانه، در محیط مایع MS حاوی یک میلی‌گرم در لیتر 2-4-D به همراه یک میلی‌گرم در لیتر IAA و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر KN سوسپانسیون تهیه کرد. (Valluri, 2009)، در آزمایشی از کشت قطعات نوک ساقه، برگ، ساقه و ریشه پروانش در محیط جامد MS به همراه BAP، 2, 4-D، NAA و KN در طی ۳۰ روز کالوس تهیه شد و نوک ساقه در یک محیط حاوی یک میلی‌گرم در لیتر توفوردی و یک میلی‌گرم در لیتر KN بهترین کالوس زایی را نشان داد (Taha et al., 2008). طی تحقیقی با استفاده از برگ‌های جوان در محیط MS حاوی ۰/۲۳ میلی‌گرم در لیتر BAP و ۰/۴۴ میلی‌گرم در لیتر 2, 4-D کالوس و سپس سوسپانسیون تولید شد (Lee et al., 2006).

۲. مواد و روش‌ها

این آزمایش در آزمایشگاه گروه بیوتکنولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد خرم‌آباد در سال ۱۳۹۲ به شرح زیر انجام شد. ابتدا با استفاده از کشت دانه، گیاهان مناسب جهت تهیه ریز نمونه‌های گیاهی فراهم شد. ریز نمونه‌ها از گیاهانی که دارای رشد مطلوبی بودند، جدا شدند. این ریز نمونه‌ها پس از قرار گرفتن در الکل ۷۰ درصد به مدت ۳۰ ثانیه، هیپوکلریت سدیم ۵ درصد و توئین بمدت ۵ دقیقه و چند بار شستشو با آب مقطر استریل به‌عنوان ریز نمونه‌های مناسب جهت کشت استفاده شدند.

۲-۱. آزمایش تولید کالوس

پروانش یکی از گیاهان تیره خرزهره می‌باشد که به دلیل وجود ترکیبات دارویی و آلکالوئیدها مورد توجه قرار گرفته است. در این میان وین کریستین و وین بلاستین مهم‌ترین آلکالوئیدهایی هستند که برای درمان انواع سرطان‌ها کاربرد دارند (Gupta and Bhattacharyya, 2003). مقدار بسیار اندک آلکالوئیدهای این گیاه به‌عنوان تنها منبع تهیه (درحد ۰/۰۰۰۵ درصد)، پیچیدگی و چندمرحله‌ای بودن مسیر سنتز این دو آلکالوئید، تولید اختصاصی برخی پیش ماده‌های مسیر سنتز آن‌ها در بافته‌ای تخصص‌یافته، اثربخشی کمتر داروهای نیمه سنتزی نسبت به انواع طبیعی و تقاضای زیاد برای این دو دارو از مهم‌ترین دلایلی هستند که توجه محققین را به استفاده از روش‌های کشت بافت برای افزایش تولید این آلکالوئیدهای حیاتی در گیاه پروانش جلب نموده است (Sato et al., 2000; Verpoorte et al., 2001). به‌طوری‌که استفاده از روش‌های کشت درون شیشه‌ای پروانش، کالوس، سوسپانسیون سلولی، گیاهچه و ریشه‌های تراریخت در بیوراکتورها توصیه شده است. در شرایط مناسب، سلول‌های کالوس در محیط سوسپانسیون می‌توانند به رشد دایم و بدون تغییر خود به‌طور نامحدودی و با سرعت بیشتری نسبت به سلول‌های کالوس ادامه دهند (Mujib et al., 2009; Senoussi et al., 2000). بنابراین در شرایطی که تقسیم سلولی سریع و نسل‌های سلولی پرجمعیت نیاز باشد، کاربرد دارند (Phillips et al., 1995). در آزمایشی قطعات ساقه پروانش برای تشکیل کالوس در محیط MS مایع حاوی ترکیبات مختلف آلفا نفتالین استیک اسید، کاپنتین و ۳- ایندول استیک اسید کشت شدند و محیط MS حاوی NAA و KN^۱ و IAA بهترین محیط برای تولید حداکثر کالوس شناخته شد (Zhao et al., 2001). از قطعات ساقه پروانش در محیط MS حاوی ۲ میلی‌گرم در لیتر NAA و ۲ میلی‌گرم در لیتر IAA و ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر KN کالوس تولید کردند. کاووس مای تولیدشده به مدت ۵ ماه واگشت و نگهداری شدند و از آن‌ها جهت تهیه سوسپانسیون سلولی با همان ترکیب هورمونی استفاده شد (Xu & Dong, 2005).

2. 2-4-dichlorophenoxy acetic acid
3. Banzyl amino purine

1. kinetin

برای تهیه محیط کشت پایه سوسپانسیون سلولی از همان فرمول محیط کشت آزمایشات کالوس زایی، بدون افزودن آگار استفاده شد. از قطعات کالوس تولیدشده برای تشکیل سوسپانسیون سلولی استفاده شد. آزمایش سوسپانسیون در ارلن های حاوی ۵۰ میلی لیتر محیط کشت به همراه میزان مساوی کالوس انجام شد. ارلن ها بر روی شیکر انکوباتور با سرعت ۱۲۰ دور در دقیقه و دمای ۲۶ درجه سانتی گراد قرار گرفتند و بازکشت هر ۱۴ روز انجام شد. در این آزمایش صفات تعداد سلول در هر میلی لیتر محیط کشت و وزن خشک سلول ها برای هر تیمار سوسپانسیونی اندازه گیری شد.

۲-۲-۱. شمارش سلول ها در کشت سوسپانسیون سلولی: به منظور شمارش سلول ها و تک سلول کردن توده ها با استفاده از روش آنزیمی، ۱ درصد سلولاز و ۰/۱ درصد پکتیناز به یک میلی لیتر از سوسپانسیون اضافه شد. سپس این مخلوط به مدت ۲۰ دقیقه در ۵۰۰ دور در دقیقه جهت سرعت دادن به تأثیر آنزیم ها سانتریفیوژ شد و با لام هموسیتومتر تعداد سلول ها شمارش شدند.

۲-۲-۲. اندازه گیری وزن خشک سلول ها در کشت سوسپانسیون سلولی: برای اندازه گیری وزن خشک سلول ها، سوسپانسیون با سرعت ۵۰۰ دور در دقیقه به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ و مایع رویی از سلول ها جدا شد. سلول ها برای خارج شدن آب اضافی آن ها بر روی کاغذ صافی قرار گرفتند. سپس نمونه ها در آون با دمای ۶۰ درجه سانتی گراد به مدت ۲۴ ساعت خشک شده و وزن خشک توده سلولی اندازه گیری شد.

۳. نتایج و بحث

بر اساس نوع ریز نمونه های استفاده شده در طرح، تفاوت معنی داری بین سطوح مختلف هورمونی در کالوس زایی مشاهده شد که نتایج (Taha et al., 2008) تأییدکننده این مطلب است. در ریز نمونه برگ در سطوح مختلف هورمونی، اثرات متقابل هورمون ها با آزمون دانکن هم در سطح ۰/۰۵ و هم در سطح ۰/۰۱ در صد معنی دار است. با توجه به p -value جدول تجزیه واریانس، جدول ۳، مقادیر p -value در عامل a (هورمون 2, 4-D) در سطح ۰/۰۵ در صد معنی دار، عامل b (هورمون BAP) در سطح ۰/۰۱ و ۵ درصد معنی دار است.

برای بررسی تولید کالوس، در محیط کشت پایه (Murashigo MS (Skoog, 1962) تنظیم کننده های رشد و ساکارز با غلظت ۳۰ گرم در لیتر به عنوان منبع کربن و آگار با غلظت ۷ g/l و با pH=۵/۸ قرار گرفتند (جدول ۱). در این پژوهش، الگوی کشت در قالب طرح فاکتوریل با سه عامل، ریز نمونه (ساقه و برگ)، تنظیم کننده های رشد BAP و 2, 4-D و در قالب طرح پایه کاملاً تصادفی با دو تکرار و در هر تکرار سه ریز نمونه انجام شد. بعد از کشت ریز نمونه ها در پتری دیش ها، دمای ۲۶ درجه سانتی گراد، شرایط نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی در دستگاه انکوباتور به کار گرفته شد. میزان کالوس دهی پس از چهار هفته با استفاده از نرم افزار SAS مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

جدول ۱. تیمارهای مربوط به کالوس زایی ریز نمونه های ساقه و برگ در پروانش.

شماره تیمار	نوع ریز نمونه	نوع تیمار
۱	ساقه و برگ	BAP(0.5mg/l)+2,4-D(5mg/l)
۲		BAP(1mg/l)+2,4-D(5mg/l)
۳		BAP(2mg/l)+2,4-D(5mg/l)
۴		BAP(4mg/l)+2,4-D(5mg/l)
۵		BAP(0.5mg/l)+2,4-D(2.5mg/l)
۶		BAP(1mg/l)+2,4-D(2.5mg/l)
۷		BAP(2mg/l)+2,4-D(2.5mg/l)
۸		BAP(4mg/l)+2,4-D(2.5mg/l)

جدول ۲. تیمارهای به کار رفته مربوط به کشت سوسپانسیون در پروانش

شماره تیمار	نوع تیمار
۱	KN(0.5mg/l)+2,4-D(1mg/l)
۲	BAP(0.5mg/l)+2,4-D(1mg/l)
۳	2,4-D(1mg/l)
۴	BAP(0.5mg/l) +2,4-D(2mg/l)
۵	BAP(1mg/l)+2,4-D(2mg/l)
۶	BAP(1mg/l)+2,4-D(1mg/l)
۷	Control

۲-۲. تهیه سوسپانسیون سلولی

برای تهیه سوسپانسیون سلولی از طرح آماری کاملاً تصادفی با شش تیمار هورمونی مختلف، جدول ۲ و در سه تکرار استفاده شد.

۱). در تیمار شماره ۸، در این تیمار نیز کالوس زایی با قدرت خوبی انجام شده است ولی میزان کالوس زایی نسبت به تیمار شماره ۷ در کالوس ساقه با شدت پایین تری صورت گرفته است (شکل ۲). در ریز نمونه ساقه از روی نتایج جدول تجزیه واریانس با آزمون دانکن مشاهده می شود که عامل a یعنی هورمون توفوردی و عامل b یعنی هورمون BAP در سطح ۰/۰۵ درصد معنی دارند (هر دو عامل در ۱ درصد معنی دار نیستند)؛ بنابراین فقط می توان گفت که با توجه به مقایسه میانگین و p-value ها، میزان ۲/۵ میلی گرم از هورمون توفوردی (a₂) و ۲ میلی گرم از هورمون BAP (b₃) بهترین بوده اند؛ اما بین میزان ۰/۵، ۱ و ۴ میلی گرم BAP تفاوت معنی داری در سطح ۵ درصد مشاهده نشد.

جدول ۵. جدول تجزیه واریانس اثرات متقابل هورمون های توفوردی و BAP در ریز نمونه ساقه.

منبع تغییرات	درجه آزادی	مجموع مربعات	میانگین مربعات	ارزش F	Pr > F
a	1	2.25	2.25	6	0.04
b	3	6	2	5.33	0.026
a*b	3	2.75	0.9167	2.44	0.1388

در ریز نمونه های مربوط به ساقه روند مربوط به کاهش کالوس زایی با افزایش 4-D، 2 نیز مشاهده شده است ولی این روند نسبت به برگ محسوس تر است، چون خود ساقه ها منابع تولید اکسین هستند و وجود مقادیر زیادی از این هورمون در محیط کشت همان اثر بیشتر 4-D، 2 را در برابر BAP تشدید می کند و مانع از کالوس زایی در ریز نمونه های ساقه می شود و این می تواند دلیلی بر نبود اثر متقابل بین این دو هورمون نسبت به ریز نمونه برگ باشد، کالوسهای تولید شده در تیمار ۴ در مقایسه با تیمارهای ۷ و ۸، (شکل ۳) تأییدی بر این مطلب است.

در آزمایشی با کشت ریز نمونه های برگ و ریشه پروانش در محیط گامبورگ حاوی تنظیم کننده های 2,4-D و BAP کالوس های متراکم تولید شد. این کالوس ها به محیط سوسپانسیون منتقل شدند (Dutta et al., 2007) که نتایج حاصل از این آزمایش تأیید دیگری بر انتخاب صحیح تنظیم کننده های رشد در این طرح است.

جدول ۳. جدول تجزیه واریانس برای اثرات متقابل هورمون توفوردی (عامل a) و هورمون BAP (عامل b) در ریز نمونه برگ.

منبع تغییرات	درجه آزادی	مجموع مربعات	میانگین مربعات	Pr > F
a	1	1.5625	1.5625	0.0203
b	3	9.6875	3.2291	0.0008
a*b	3	10.6875	3.5625	0.0005

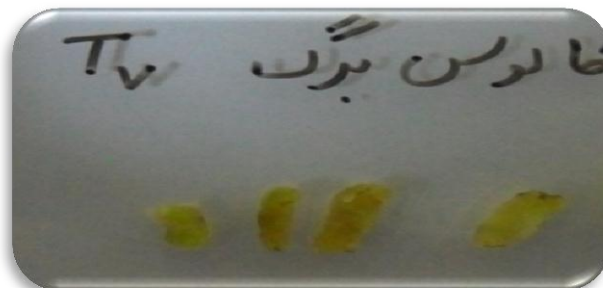
جدول ۴. جدول تجزیه واریانس برای اثرات سطوح مختلف هورمون توفوردی (عامل a) و سطوح مختلف هورمون BAP (عامل b) در ریز نمونه برگ.

a*b Effect Sliced by a for y					
a	درجه آزادی	مجموع مربعات	میانگین مربعات	ارزش F	Pr > F
1	3	9	3	16	0.0010
2	3	11.375	3.797	20.22	0.0004
a*b Effect Sliced by b for y					
b	درجه آزادی	مجموع مربعات	میانگین مربعات	ارزش F	Pr > F
1	1	2.25	2.25	12.	0.0085
2	1	1	1	5.33	0.0497
3	1	9	9	48	0.0001
4	1	1.972152E-	1.972152E-31	0.00	1

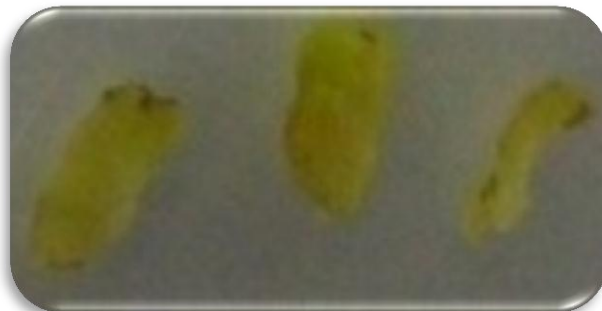
با توجه به نتایج جدول تجزیه واریانس (۴)، در ریز نمونه برگ بهترین ترکیب از هورمون ها، ۲/۵ میلی گرم از هورمون توفوردی (a₂) و ۲ میلی گرم از هورمون BAP (b₃) است. در تیمارهای حاوی غلظت های ۵ میلی گرم در لیتر هورمون توفوردی با افزایش غلظت BAP مقدار کالوس زایی کاهش یافته است، ممکن است دلیل این امر توانایی بالای هورمون توفوردی در تولید کالوس باشد که باعث می شود نقش هورمون BAP در تولید کالوس کم شده و در اثر افزایش فشار هورمونی غیر ضروری بر ریز نمونه، تولید کالوس کاهش یابد، زیرا در غلظت کمتر هورمون توفوردی، BAP بار دیگر اثر مثبتی در تشکیل کالوس دارد؛ و این نشان می دهد که افزایش سطح هورمون BAP در برابر سطح پایین تر از هورمون توفوردی یعنی ۲/۵ میلی گرم دارای میزان کالوس زایی بالاتری است، شکل ۱ نیز تأیید کننده این مطلب است. در تیمار شماره ۷، کالوس زایی با بالاترین قدرت در بین تمام تیمارها، در ریز نمونه برگ انجام شده است. کالوسهای تولید شده دارای رنگ سبز و شفاف هستند (شکل

2008. طی تحقیقی با استفاده از برگ‌های جوان در محیط MS حاوی ۰/۲۳ میلی‌گرم در لیتر BAP و ۰/۴۴ میلی‌گرم در لیتر 2-4-D کالوس و سپس سوسپانسیون تولید کرد (Lee et al., 2006). این نتایج، تأییدکننده نتایج ما می‌باشد که نوع ریز نمونه می‌تواند قدرت کالوس زایی را تحت تأثیر قرار دهد. در یک مطالعه مقدار وین کریستین 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 وین کریستین نسبت به ترکیب کینتین و 2-4-D دارد (Kalidass et al., 2010). از طرف دیگر استفاده از اسید آسکوربیک به‌عنوان یک آنتی‌اکسیدان در محیط کشت تفاوتی را از نظر کالوس زایی در تکرارهای مربوط به هر تیمار ایجاد کرده است. بطوریکه در پتری دیش‌های کشت‌شده که در محیط کشت آن‌ها از اسید آسکوربیک استفاده شده است، ماندگاری و تعداد ریز نمونه‌های کالوس دار شده به نسبت خیلی کمی، بیشتر است. گیاه پروانش، منبع غنی از ترکیبات فنلی است که در اثر تنش های زنده و غیرزنده مقدار آن‌ها افزایش می‌یابد. در حین جداسازی ریز نمونه و پس از صدمه دیدن بافت، این ترکیبات با فعالیت پلی فنل اکسیدازها که در پلاست های سلول‌ها وجود دارند، اکسیدشده و موجب قهوه‌ای یا سیاه شدن بافت مزبور می‌گردند، محصولات این اکسیداسیون فعالیت آنزیمی را متوقف نموده و سبب تیره شدن بافت‌ها، عدم تثبیت ریز نمونه‌ها در محیط کشت و درنهایت مرگ ریز نمونه می‌شود. تیره‌رنگ شدن نسبی محیط کشت‌های بدون اسید آسکوربیک در تکثیر پروانش تأییدی بر تولید ترکیبات فنلی فراوان در محیط کشت است که می‌تواند برای رشد ریز نمونه مضر باشد؛ بنابراین استفاده از این ماده به‌عنوان آنتی‌اکسیدان در محیط کشت‌های مربوط به این گیاه توصیه می‌شود (Istiaqh et al., 2013).

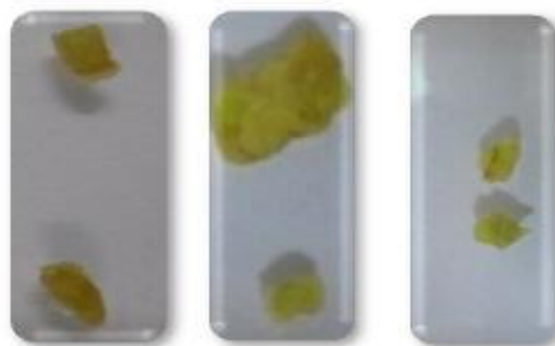
ژو و دانگ (Xu & Dong, 2005) از قطعات ساقه پروانش در محیط MS حاوی ۲ میلی‌گرم در لیتر NAA و ۲ میلی‌گرم در لیتر IAA و ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر KN کالوس تولید کردند. کالوس‌های



شکل ۱. نمونه کالوس‌های تولیدشده در تیمار شماره ۷، ریز نمونه برگ



شکل ۲. نمونه کالوس‌های تولید شده در تیمار شماره ۸، ریز نمونه برگ.



شکل ۳. کالوس‌های تولید شده در ریز نمونه ساقه، به ترتیب از راست به چپ: تیمار ۴ و ۷ و ۸.

والوری (Valluri, 2009) از برگ‌های پروانش پرورش‌یافته در گلخانه، در محیط مایع MS حاوی یک میلی‌گرم در لیتر 2, 4-D به همراه یک میلی‌گرم در لیتر IAA و ۰.۵ میلی‌گرم در لیتر KN سوسپانسیون تهیه کرد. در آزمایشی از کشت قطعات نوک ساقه، برگ، ساقه و ریشه پروانش در محیط جامد MS به همراه BAP، 2, 4-D، NAA و KN در طی ۳۰ روز کالوس تهیه شد و نوک ساقه در یک محیط حاوی یک میلی‌گرم در لیتر توفوردی و یک میلی‌گرم در لیتر KN بهترین کالوس زایی را نشان داد (Taha et al., 2013).

- expression of repressors in *Catharanthus roseus* cell cultures. *Plant Cell Reports.*, 26: 907-915.
- Istiaqh, A., Tanveer, H., Irfan, A., Muhammad, N., Maryam, M., Muhammad, I. 2013. Leyhal effects of secondary metabolites on plant tissue culture. *American-Eurasian journal agriculture & environment Science.*, 13(4): 539-547
- Kalidass, C., Mohan, V.R., Daniel, A. 2010. Effect of auxin and cytokinin on vincristine production by callus cultures of *Catharanthus Roseus* l. (apocynaceae). *Tropical and Subtropical Agroecosystems.*, 12: 283 - 288
- Lee, E., Mobin, M., Hahn, EJ., Paek, KY. 2006. Effects of sucrose, inoculum density, auxins, and aeration volume on cell growth of *Gymnema sylvestre*. *Journal of Plant Biology.*, 49: 427-431.
- Mujib, A., Bandhyopadhyay, S., Ghosh, PD. 2000. Tissue culture derived plantlet variation in *Caladium* an important ornamental. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture.*, 10: 149-155.
- Murashige, T., Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant.*, 15: 473-497.
- Phillips, GC., Hubstenberger, JF., Hansen, EE. 1995. Plant regeneration by organogenesis from callus and cell suspension cultures. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, pp. 67-78.
- Sato, F., Hashimoto, T., Hachiya, A. 2001. Metabolic engineering of plant alkaloid biosynthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.*, 98: 367-372.
- Schmeller, T., Wink, M. 1998. Utilization of alkaloids in modern medicine. Plenum Press, New York , pp 435-459.
- Senoussi, MM., Nora, B., Joe, C. 2009. Impact of hypoxia on the growth and alkaloid accumulation in *Catharanthus roseus* cell suspension. *Acta Physiologiae Plantarum.*, 31: 359-362.
- Gupta, S. and Bhattacharyya, B. 2003. Antimicrotubular drugs binding to vinca domain of tubulin. *Molecular and cellular biochemistry.*, 253:41-47.
- Taha, HS., El-Bahr, MK., Seif-El-Nasr, MM. 2008. In vitro studies on egyptian *Catharanthus roseus* (L.) G. Don.: 1- calli Production, direct shootlets Regeneration and alkaloids determination. *Journal of Applied Sciences Research.*, 4: 1017-1022..
- Valluri, JV. 2009. Bioreactor production of secondary metabolites from cell cultures of *Periwinkle* and تولیدشده به مدت 5 ماه واكشت و نگهداری شدند و از آنها جهت تهیه سوسپانسیون سلولی با همان ترکیب هورمونی استفاده شد (Dutta et al., 2007). در این پژوهش در محیط سوسپانسیون سلولی برای حداکثر وزن خشک حضور 2, 4-D در محیط کشت ضروری است. همچنین تنظیم‌کننده BAP در محیط مایع نیز از KN عملکردی بهتری داشت. بیشترین وزن خشک سلولی را یک میلی‌گرم در لیتر 2,4-D و دو میلی‌گرم در لیتر 2,4-D به همراه یک میلی‌گرم در لیتر BAP دارا بودند که نتایج به‌دست‌آمده از این طرح نیز مورد تأیید قرار می‌گیرد (Dutta et al., 2007).
- #### ۴. نتیجه گیری
- در این پژوهش با توجه به نتایج به‌دست‌آمده می‌توان در تولید انبوه این گیاه دارویی در شرایط درون شیشه‌ای از تیمارهای هورمونی بدین شرح استفاده کرد: در محیط تولید کالوس، در بافت برگ و ساقه، میزان ۲/۵ mg/l هورمون توفوردی، ۲ mg/l بنزیل آمینوپورین، البته در بافت ساقه باید روند کاهشی در هورمون توفوردی اعمال شود تا نتایج بهتری حاصل شود. در محیط سوسپانسیون تیمار دوم BAP(0.5mg/l)+2,4-D(1mg/l) در جهت تولید تعداد زیاد سلول و تیمار سوم 2,4-D(1mg/l) در جهت تولید بیوماس بیشتر اعمال شوند. علاوه بر این در محیط تولید کالوس از اسید آسکوربیک به‌عنوان یک آنتی‌اکسیدان برای جلوگیری از تأثیر مواد فنولی موجود در بافتهای جداشده از گیاه و مرگ ریز نمونه‌ها استفاده شود.
- #### ۵. قدردانی
- بدینوسیله از باشگاه پژوهشگران جوان دانشگاه آزاد اسلامی واحد خرم آباد بخاطر تامین مخارج مالی پروژه سپاسگذاری به عمل می‌آید.
- #### ۶. منابع
- Dutta, A., Singh, S., Kumar, S., Sen, J. 2007. Transcript profiling of terpenoid indole alkaloid pathway genes and regulators reveals strong

- Sandalwood. *Methods in Molecular Biology.*, 547: 325-335.
- Verpoorte, R., Van der Heijden, R., Memelink, J. 2000. Engineering the plant cell factory for secondary metabolite production. *Transgene Research.*, 9: 323-343.
- Xu, M., Dong, J. 2005. Nitric oxide stimulates indole alkaloid production in *Catharanthus roseus* cell suspension cultures through a protein kinase-dependent signal pathway. *Enzyme and Microbial Technology.*, 37: 49-53.
- Zhao, J., Zhu, WH., Hu, Q., Guo, YQ. 2001. Compact callus cluster suspension culture of *Catharanthus roseus* with enhanced indol alkaloid biosynthesis. In *Vitro Cellular and Developmental Biology – Plant.*, 37: 68-72.