Archive of SID

دو فصلنامه علمی-پژوهشی تحقیقات ژنتیک و اصلاح گیاهان مرتعی و جنگلی ایران شناسه دیجیتال (DOI): 10.22092/ijrfpbgr.2018.110070.1251
جلد ۲۶، شماره ۱، صفحه ۳۱-۲۳ (۱۳۹۷)

ارزیابی کمی و کیفی پروتئین SO6 در کالوس گیاه غاسول صابونی (*Saponaria officinalis* L.)

حسین هنری[۱*]، سید مسیح اعتماد ایوبی[۲]، فرانک اسماعیلی[۳] و مسعود عبداللهی[۴]

۱* – نویسنده مسئول مکاتبات، دانشیار، مرکز علم و فناوری زیست‌شناسی، دانشگاه جامع امام حسین (ع)، تهران

پست الکترونیک: Honari.hosein@gmail.com

۲ – دانشجوی دکترای نانوبیوتکنولوژی، مرکز علم و فناوری زیست‌شناسی، دانشگاه جامع امام حسین (ع)، تهران

۳ – کارشناس ارشد بیوتکنولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم تحقیقات، تهران

۴ – دانشجوی کارشناسی ارشد زیست‌شناسی، مرکز علم و فناوری زیست‌شناسی، دانشگاه جامع امام حسین (ع)، تهران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۰۱/۱۳ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۰۳/۳۱

چکیده

غاسول صابونی (*Saponaria officinalis* L.) گیاه بومی اروپای مرکزی و جنوبی و از خانواده *Caryophyllaceae* می‌باشد. این گیاه به‌عنوان گیاه مهم و کمیاب در ایران به‌حساب می‌آید. غاسول صابونی کاربردهای متعددی در حوزه‌های پزشکی، کشاورزی و بهداشت دارد. ساپونین یکی از ترکیبات فعال زیستی این گیاه است که در شیمی‌درمانی مورد استفاده قرار می‌گیرد. کشت بافت یکی از راه‌های تکثیر این گیاه است که برای تولید ماده مؤثره استفاده می‌شود. ساپونین ۱۰ ایزوفرم دارد که در مهار ترجمه ریبوزوم و سمیت سلولی متفاوتند. یکی از ایزوفرم‌های ساپونین SO6 می‌باشد. در این تحقیق، به‌منظور بررسی حضور پروتئین، SO6 در کالوس گیاه غاسول صابونی، کشت بافت این گیاه به‌وسیله متغیرهایی مانند غلظت‌های مختلف تنظیم‌کننده‌های رشدی و عوامل محیطی، در شرایط درون شیشه‌ای مورد بررسی و ارزیابی قرار گرفت. پس از موفقیت‌آمیز بودن کشت بافت این گیاه، استخراج پروتئین از این گیاه انجام شد و حضور پروتئین، SO6 در کالوس با استفاده از روش وسترن‌بلات، تأیید و میزان پروتئین از طریق روش الایزا اندازه‌گیری شد. نتیجه آزمایش‌ها نشان‌داد که بذر گیاه با استفاده از تیمار مناسب قادر به جوانه‌زنی بوده و کالوس حاصل از ریشه گیاه غاسول‌صابونی بیشترین میزان پروتئین SO6 را داشت.

واژه‌های کلیدی: پروتئین SO6، تنظیم‌کننده‌های رشدی، غاسول‌صابونی، کالوس

مقدمه

گیاه غاسول صابونی یا غاسول رومی یک گیاه خودرو و از گونه میخک‌ها می‌باشد (Helepciuc, 2011). این گیاه در مکان‌های سرد و در ارتفاعات کم یا متوسط زیر پرچین-ها و در امتداد شانه‌های جاده‌ها می‌روید (Lokker and Cavers, 1995). در ایران در مناطق معتدل و مرطوب خزری، در کنار جاده‌ها و رودخانه‌ها می‌روید. این گیاه دارای ریشه‌ای ضخیم و سمی می‌باشد. در گذشته از ریشه آن برای تولید صابون استفاده می‌کردند. از این‌رو به آن صابونی می‌گویند، زیرا برگ‌های آن دارای ماده ساپونینی است و مانند صابون در آب کف می‌کند (Linke, 2009). ساپونین یکی از ترکیبات فعال زیستی تولیدشده توسط این

www.SID.ir

Archive of SID

گیاه است. ساپونین، گلیکوزیدی با وزن مولکولی زیاد است که به‌طور عمده توسط گیاهان، برخی از موجودات دریایی و حشرات تولید می‌شود و کاربردهای متعددی در حوزه پزشکی (شیمی درمانی)، کشاورزی (تولید سم) و بهداشت (تولید مواد شوینده و پاک‌کننده) دارد. ترکیبات ساپونینی به‌علت اهمیت فراوانشان در سلامت انسان‌ها از گذشته مورد توجه بوده‌اند. ساپونین دارای ساختارهای متعددی می‌باشد، نوع استروئیدال که یک تتراسیلیک تری‌ترپینوئید است، C-27 و نوع پنتاسیلیک‌تری‌ترپینوئید، C-30 می‌باشد، که هر دو یک اتصال گلیکوزیدال در کربن سه و یک ناحیه بیوسنتزی متداول از طریق موالونیک‌اسید و واحدهای ایزوپرن دارند (Linke, 2009). ساپونین ۱۰ ایزومر دارد و ایزومر SO6 آن از سایر ایزومرها سمی‌تر است. پروتئین ساپونین، SO6 به خانواده پروتئین‌های غیرفعال‌کننده ریبوزوم تعلق دارد که خانواده‌ای از آنزیم‌های سمی با ماهیت پروتئینی هستند که در یوکاریوت‌ها با اخلال در کار ریبوزوم‌ها و دیگر اندام‌های سیتوپلاسمی در تولید پروتئین‌ها وقفه ایجاد کرده و باعث شکستن پیوند بین آدنین و قند ریبوز شده و از ادامه ترجمه پروتئین جلوگیری می‌کنند و در نهایت موجب مرگ سلول می‌شوند (Puri *et al*., 2012). ساپونین‌ها به‌عنوان مثالی از پروتئین‌های غیر فعال‌کننده ریبوزومی، که پروتئین SO6 هم جزو این دسته از پروتئین‌ها است منجر به نابودی کامل ریبوزوم می‌شوند (Barbieri *et al*., 1997). از آنجایی که این ترکیبات بسیار پایدار بوده و فعالیت آنزیمی قوی از خود نشان می‌دهند توانایی از بین بردن سلول‌ها از طریق اختلال در سنتز پروتئین‌ها را دارند، همچنین به‌عنوان یک ترکیب ضد سرطانی قوی استفاده می‌شود (Stirpe, 2004). ساپونین‌ها به‌عنوان مثالی از پروتئین‌های غیرفعال‌کننده ریبوزومی، از بافت‌های مختلف گیاه غاسول‌صابونی جداسازی شده‌اند (Carzaniga *et al*., 1994). دو ترکیب تری‌ترپنوئید ساپونین عمده به‌نام‌های ساپوناریوزید، A و B توسط Jia و همکاران (1998) از غاسول‌صابونی جداسازی شده‌است. در صورت انجام کشت بافت گیاه غاسول صابونی و تأیید حضور پروتئین SO6 در کالوس‌های تولید شده می‌توان از پروتئین حاصل در پژوهش‌های بعدی استفاده کرد و خواص ضد سرطانی آن را مورد بررسی قرار داد.

در طی مطالعه‌ای که Fatima و همکاران (2009) روی کشت بافت گل انگشتانه انجام دادند، گزارش کردند که نمونه‌های برگی این گیاه در مقایسه با ریزنمونه‌های دیگر مانند ساقه، هیپوکوتیل و کالوس‌دهی بیشتری داشتند و به‌عنوان یک منبع ایده‌آل به‌منظور باززایی به‌شمار می‌روند. در بررسی انجام‌شده، اثر نوع محیط کشت بر درصد باززایی اندام‌های هوایی از کالوس در سطح احتمال پنج درصد معنی‌دار بود و محیط کشت MS نسبت به محیط B5 درصد باززایی بیشتری را به‌خود اختصاص داد. فاکتورهای شیمیایی، مواد معدنی و تنظیم‌کننده‌های رشد به‌عنوان مهمترین عوامل بر روی تمایززایی و رشد گیاه مؤثرند. در مطالعه‌ای اثر جیبرلیک اسید به‌منظور افزایش میزان جنین‌زایی سوماتیکی در رازیانه مورد بررسی قرار گرفت. این هورمون میزان نمونه‌های جنینی را افزایش داد و ریزنمونه هیپوکوتیل به‌عنوان ریزنمونه موفق در کالوس‌زایی معرفی شد (Sarkheil *et al*., 2009). بذر غاسول‌صابونی دارای پوسته سخت می‌باشد و جوانه‌زنی در آن بسیار مشکل است.

در این پژوهش از طریق کشت‌بافت بذر گیاه غاسول‌صابونی، حضور پروتئین SO6 در کالوس بررسی و مقدار آن اندازه‌گیری شد. با موفقیت‌آمیز بودن کشت بافت این گیاه و اندازه‌گیری و تأیید حضور پروتئین مورد نظر در کالوس، پروتئین آن جداسازی شد که در تحقیقات بعدی مورد استفاده قرارگیرد. کشت‌بافت گیاهی یکی از راه‌های تکثیر گیاهان در شرایط آزمایشگاهی است. البته تاکنون در ایران کشت بافت و بررسی پروتئین‌های موجود در کالوس گیاه غاسول‌صابونی انجام نشده بود و این تحقیق در نوع خود می‌تواند راهگشای کشت بافت گیاه مورد نظر، استحصال پروتئین ساپونین از کالوس و اندازه‌گیری میزان پروتئین باشد. کشت بافت گیاه در شرایط درون شیشه‌ای به‌وسیله متغیرهای مختلف ازجمله غلظت‌های مختلف تنظیم‌کننده رشد و عوامل محیطی مورد بررسی قرارگرفت.

www.SID.ir

Archive of SID

مواد و روش‌ها

به‌منظور کشت درون‌شیشه‌ای گیاه غاسول‌صابونی بذر مورد نیاز از مؤسسه پاکان بذر اصفهان تهیه شد. هورمون‌های گیاهی شامل جیبرلیک‌اسید که تنظیم‌کننده رشد حساس به حرارت است، به‌منظور جوانه‌زنی بهتر بذرها استفاده شد. اکسین‌های مصنوعی مانند D–4,2 نسبت به اکسین‌های طبیعی مانند IAA فعالیت بیشتری دارند و به‌میزان کمتری مورد استفاده قرار می‌گیرند. در این پژوهش از D–4,2 با غلظت های نیم، یک، یک و نیم و دو میلی‌گرم در لیتر استفاده شد. سیتوکنین‌ها اغلب برای تحریک رشد و نمو به‌کار می‌روند. از NAA نیز در غلظت‌های نیم، یک، یک و نیم و دو میلی‌گرم در لیتر استفاده‌شد. از محیط کشت MS (Murashige & Skoog, 1962) استفاده شد. کلیه مواد مورد استفاده محصول شرکت دوچفا بود.

سایش پوسته بذر برای جوانه‌زنی و ضدعفونی بذر

جوانه‌زنی فرایندی است که طی آن و در شرایط مناسب محیطی، رویان موجود در بذرهای دارای قوه نامیه فاقد خواب، به یک گیاهچه تبدیل می‌شود، اما بذر بیشتر گیاهان در شرایط طبیعی دارای خواب می‌باشد، بذر گیاه غاسول‌صابونی دارای پوسته خارجی سخت می‌باشد. برای بررسی این موضوع آزمایشی برای جوانه‌زنی بذرها انجام شد. در مرحله اول قبل از کشت بذر از کاغذ سمباده برای خراش‌دادن و در بار دوم بدون خراش‌دهی کشت شدند. برای انجام یک کشت موفق و به‌دور از هرگونه آلودگی، به‌دست آوردن ترکیب ضدعفونی‌کننده مؤثر امری اجتناب‌ناپذیر است، بدین‌منظور تیمارهای مختلف سترون‌سازی بررسی‌شد. بذرها پس از خراش‌دهی در هیپوکلرید سدیم قرار گرفتند، چند مرتبه به آرامی ظرف تکان داده‌شد و پس از آن روی یک بشر، صافی قرار داده‌شد، بذرها از صافی رد شد و سه مرتبه با آب مقطر شستشو شدند، سپس بذرهای خراش داده شده و سترون به‌منظور تحریک جوانه‌زنی، به شیشه‌های محتوای جیبرلیک‌اسید ۵۰۰ پی‌پی‌ام انتقال یافتند.

بذرهای ضدعفونی و آبکشی‌شده و برای جوانه‌زنی در پتری‌دیش‌های سترون بر روی کاغذ صافی واتمن مرطوب‌شده با آب مقطر قرار داده‌شدند که پس از چهار هفته شروع به جوانه‌زنی کردند و ریزنمونه‌های آنها قابلیت استفاده در محیط کشت را داشتند. پس از طی‌کردن مراحل جوانه‌زنی، به‌منظور القاء کالوس اندام‌های مختلف گیاهچه در محیط درون‌شیشه‌ای بر روی محیط کشت MS حاوی تنظیم‌کننده رشد، D–4,2 و NAA کشت شدند. به‌منظور القاء کالوس نمونه‌های کشت شده در دمای ۲۲ درجه سانتی‌گراد، ۱۶ ساعت روشنایی و هشت ساعت تاریکی قرار گرفتند. در این مرحله از ریزنمونه برگ و ریشه و هیپوکوتیل استفاده شد. پس از چهار هفته گیاهچه‌های حاصل از جوانه‌زنی بذرها به‌محیط کشت انتقال داده شد. پس از واکشت نمونه‌ها کالوس‌های تشکیل شده دوباره به‌قطعات کوچکتر تقسیم شد و در محیط کشت، MS و سوسپانسیون قرار گرفتند. میزان رشد کالوس‌ها پس از طی ۵، ۷ و ۱۰ هفته اندازه‌گیری شد. پس از ۱۰ روز تشکیل کالوس شروع شد که پس از ۳۰ روز اندازه کالوس‌ها به‌طور میانگین به‌قطر یک و نیم سانتی‌متر رسید.

عصاره‌گیری از کالوس

استخراج پروتئین از بافت‌های گیاهان دارویی افزون بر وجود مقادیر بالای کربوهیدرات‌ها با مشکل مواد پلی‌فنلی نیز روبروست که بر کیفیت پروتئین استخراجی اثر منفی می‌گذارد. بنابراین، روش‌های استخراج که این مواد را به حداقل برساند بسیار مطلوب هستند. استفاده از کیت‌های تجاری پرهزینه است و استفاده از روش مناسب می‌تواند علاوه بر کیفیت بالاتر، باعث صرفه‌جویی در هزینه‌های تحقیقاتی شود. در این پژوهش استخراج پروتئین بر اساس روش گای انجام شد (Guy, 1992).

بررسی کمیت و کیفیت پروتئین استخراج شده از بافت گیاهی اهمیت زیادی دارد. بدین‌منظور از سه روش ۱- الکتروفورز روی ژل، SDS-PAGE، ۲- الایزا و ۳- وسترن‌بلات استفاده شد. از الکتروفورز ژل پلی‌آکریل‌آمید به‌منظور بررسی پروتئین بیان‌شده و تعیین وزن مولکولی

www.SID.ir

Archive of SID

پروتئین‌ها،استفاده شد. با توجه به اینکه پروتئین بیان‌شده در حدود ۲۵ کیلودالتون وزن داشت، از این‌رو ژل ۱۲ درصد مورد استفاده قرار گرفت. درنهایت از آزمون الایزا برای اندازه‌گیری میزان پروتئین SO6 موجود در عصاره کالوس، از روش لکه‌گذاری وسترن برای تأیید حضور پروتئین SO6 در کالوس و برای تعیین غلظت پروتئین موجود در محلول‌های حاصل از مرحله قبل از روش برادفورد استفاده‌شد.

نتایج

برای بررسی جوانه‌زنی بذرهای غاسول‌صابونی، در مرحله اول بذرها بدون خراش‌دهی کشت شدند که پاسخی داده‌نشد و بذری جوانه نزد؛ در مرحله بعد از کاغذ سمباده برای خراش‌دادن بذر به‌منظور از بین‌بردن خواب فیزیکی استفاده‌شد که پاسخ مثبت بود و تیمار خراش‌دهی در بذرهایی که تحت تأثیر کاغذ سمباده قرار گرفته‌بود جوانه‌زنی بذرها را درپی‌داشت. تیمار خراش‌دهی، جوانه‌زنی بذر غاسول صابونی را از صفر درصد به ۳۳ درصد رساند که نشان‌دهنده آن است که علت اصلی خواب بذر در گیاه غاسول‌صابونی، وجود پوسته سخت بذر و از نوع فیزیکی می‌باشد. در آزمایشی دیگر بذرها بدون خراش‌دهی ولی زمان بیشتری در هیپوکلرید سدیم تیمار شدند که جوانه‌زنی آنها به ۹۵ درصد افزایش یافت. به‌منظور جوانه‌زنی بذرها در پتری-دیش سترون و روی کاغذ صافی مرطوب کشت شدند.

تعیین درصد کالوس‌زایی

پس از طی مراحل جوانه‌زنی، اندام‌های مختلف گیاهچه در محیط درون شیشه‌ای بر روی محیط کشت، MS کشت شدند. نتایج کشت اندام‌های مختلف گیاهچه در محیط کشت MS نشان داد که بیشترین درصد کالوس-زایی متعلق به ریزنمونه ریشه بود. این نتایج در جدول ۱ نشان داده شده‌است.

جدول ۱- درصد کالوس‌زایی اندام‌های مختلف در محیط کشت **MS**

نوع ریزنمونه	درصد کالوس‌زایی
ریشه	۱۰۰
ساقه	۸۵
هیپوکوتیل	۳۰

اندازه‌گیری میزان رشد کالوس‌ها

میزان رشد کالوس‌ها تا هفته پنجم بسیار کند بود، بعد از هفته پنجم اندازه کالوس‌ها به نیم سانتی‌متر رسید، پس از هفته هفتم به یک سانتی‌متر افزایش یافت و در پایان هفته دهم، به یک‌ونیم سانتی‌متر افزایش یافت. بیشترین حجم رشد در کالوس متعلق به ریزنمونه‌های حاصل از ریشه بود.

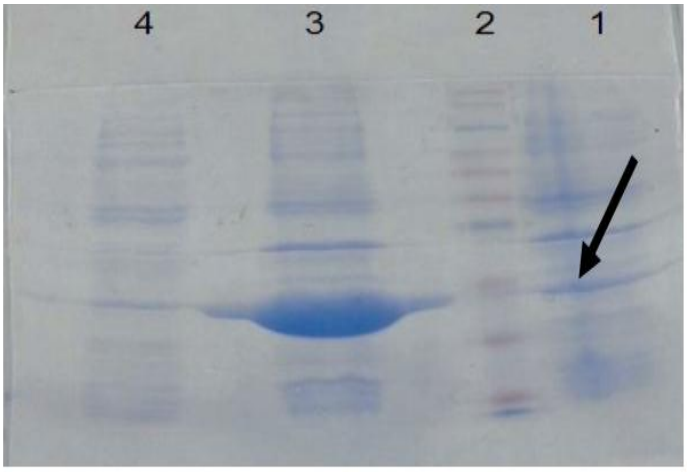
کمیت و کیفیت پروتئین استخراج شده

برای تعیین غلظت پروتئین استخراج شده از سوسپانسیون سلولی ریزنمونه‌های گیاه، از روش برادفورد استفاده شد. بررسی کمی و کیفی پروتئین‌های استخراجی به‌روش SDS-PAGE انجام شد. نتایج حاصل از بررسی کمی و کیفی پروتئین‌های استخراجی در شکل ۱ نشان داده شده‌است و فلش نمونه پروتئین SO6 استخراج‌شده از گیاه را نشان می‌دهد. همچنین در چاهک شماره ۳ نمونه پروتئین SO6 بیان شده در باکتری *E.coli* نشان داده شده که در پژوهش Abdollahi و همکاران (2017) به‌دست آمده‌است.

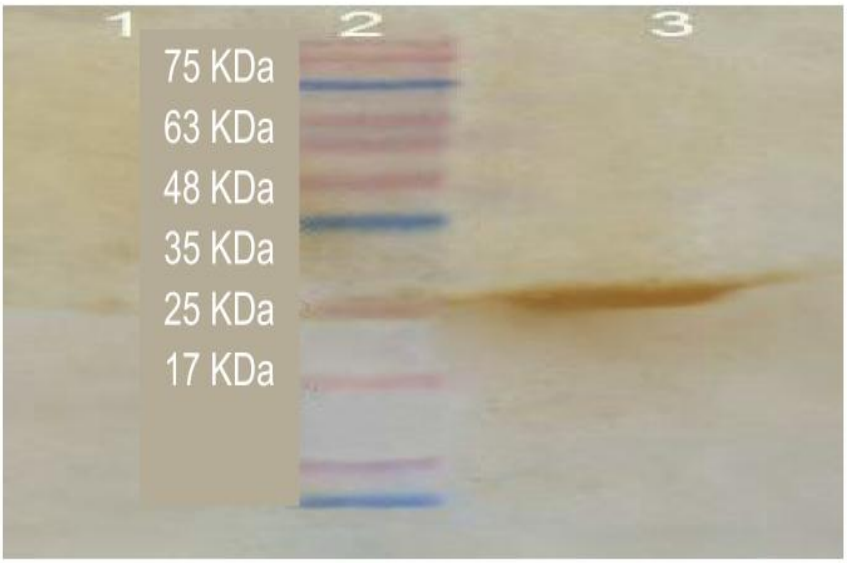
برای تأیید پروتئین استخراجی از روش لکه‌گذاری وسترن‌بلات استفاده‌شد، در این روش از آنتی‌بادی ضد برچسب هیستیدین استفاده‌شد. نتایج در شکل ۲ نشان داده‌شده‌است. باند حاصل در چاهک شماره ۳ پروتئین استخراجی را تأیید می‌کند.

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۱- الکتروفورز روی ژل SDS-PAGE، ۱- نمونه پروتئین گیاهی SO6 استخراج شده، ۲- مارکر پروتئینی، ۳- نمونه پروتئین SO6 بیان شده در باکتری، ۴- شاهد، بیان در *E. coli* بدون القاگر IPTG.



شکل ۲- لکه‌گذاری وسترن. ۱- نمونه شاهد، ۲- مارکر پروتئینی، ۳- نمونه عصاره سلولی

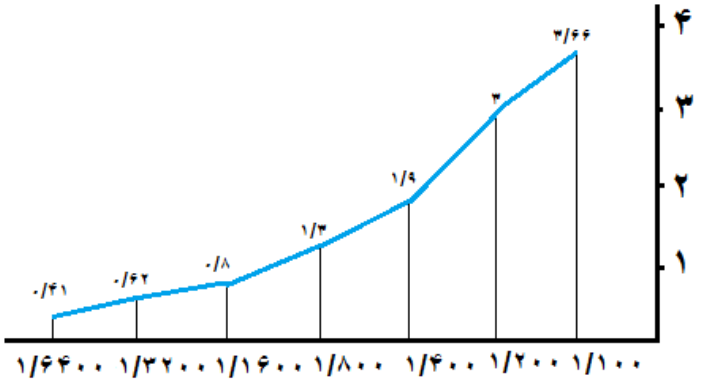
برای اندازه‌گیری مقدار پروتئین SO6 در عصاره کالوس از روش الایزا استفاده‌شد، کالوس‌های مورد استفاده برای عصاره‌گیری تحت تیمار هورمونی 2,4-D با غلظت ۵۰۰ppm قرار گرفته بودند. غلظت پروتئین موجود برحسب نوع کالوس در جدول شماره ۲ نشان داده شده‌است. رقت سم در غلظت پروتئین نیز در شکل ۳ نشان داده شده‌است.

جدول ۲- نتیجه آزمون الایزا

غلظت (میلی‌گرم بر میلی‌لیتر)	نوع نمونه عصاره کالوس
۰/۴۴۸	برگ
۰/۴۵۸	ریشه
۳/۶۶۵	کنترل +
۰/۱۳۵	کنترل -

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۳- رقت سم در غلظت پروتئین (میلی‌گرم بر میلی‌لیتر)

بحث

کشت‌بافت ابزاری مهم در مطالعات پایه و دارای کاربردهای تجاری است. امروزه بسیاری از گیاهان در سطح جهان از طریق کشت‌بافت تولید می‌شوند. کشت سلول و بافت گیاهی در مورد انواع کشت‌های سترون که در شرایط درون‌شیشه‌ای انجام می‌شود به‌کار می‌رود. جوانه‌زنی و دوره خواب در گیاهان اهمیت زیادی دارد (Bewley et *al.*, 1997). در حال حاضر تکنیک‌های کشت‌بافت به‌عنوان ابزاری قوی برای مطالعه مشکلات اساسی و کاربردی بیولوژی گیاهی درآمده است. در نتیجه آزمون جوانه‌زنی، جوانه‌زنی بذر با خراش‌دهی ۳۰ درصد بود که مؤید نتایج تیمار خراش‌دهی توسط Ehyayi و همکاران (2012) است. زیرا آنان در تیمار خراش‌دهی بیشترین میزان شکست خواب را در گیاه غاسول‌صابونی به‌میزان ۳۳ درصد مشاهده کردند. با این تفاوت که در این تحقیق برای دستیابی به درصد بیشتر جوانه‌زنی از تیمار هیپوکلریدسدیم استفاده شد و جوانه‌زنی به ۹۰ درصد افزایش یافت. برای جوانه‌زنی بهتر بذر گیاه غاسول‌صابونی، از هورمون جیبرلیک‌اسید در غلظت‌های مختلف استفاده‌شد که بهترین پاسخ را غلظت ۵۰۰ پی‌پی‌ام داشت. در تحقیقات مشابه Nabai و همکاران (2012) برای شکست خواب بذر گیاه خارمریم، از جیبرلیک‌اسید با غلظت ۵۰۰ پی‌پی‌ام استفاده کردند. همینطور Sarkheil و همکاران (2009) اثر هورمون، D–4,2 روی کالوس‌زایی رازیانه را بررسی کردند، نتایج تحقیق آنان نشان‌داد که هورمون D–4,2 نقش مهمی در کالوس‌زایی ریزنمونه‌ها داشت. در این آزمایش اثر جیبرلیک‌اسید برای افزایش میزان جنین‌زایی سوماتیکی در رازیانه بررسی‌شد. با اضافه‌کردن اسیدجیبرلیک به این محیط میزان نمونه‌های جنینی افزایش‌یافت. ریشه بهترین پاسخ را در حجم کالوس-زایی داد. نتایج این تحقیق، آزمایش Karimi و همکاران (2014) را که بر روی کشت‌بافت گیاهی گل انگشتانه انجام دادند تأیید کرد. نمونه‌های برگی این گیاه در مقایسه با ریزنمونه‌های دیگر مانند ساقه، هیپوکوتیل و ریشه کالوس-دهی بیشتری داشتند و پس از کشت در محیط‌کشت MS و رشد گیاهچه‌های با بنیه مناسب، از ریزنمونه‌های برگی به-منظور کالوس‌دهی از هورمون‌های NAA و D–4,2 به‌عنوان منابع اکسین استفاده شد. در تحقیق دیگری که روی گیاه سالویا انجام شد، از هورمون NAA به‌عنوان عاملی برای کالوس‌زایی در گیاه استفاده‌شد و کالوس‌زایی در ریزنمونه ریشه و برگ پاسخ داد. بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که بهترین تیمار برای شکست خواب بذر گیاه، هورمون جیبرلیک‌اسید با غلظت ۵۰۰ پی‌پی‌ام است (Ourmazd & Chalabian, 2006).

گیاه غاسول‌صابونی جزو گیاهان خودرو بوده و بذر آن پوسته سختی دارد و برای جوانه‌زنی باید روی بذر تیمارهایی انجام شود. تیمار خراش‌دهی برای جوانه‌زنی

www.SID.ir

Archive of SID

مؤثر بود اما آنچنان‌که تصور می‌شد نتوانست باعث جوانه‌زنی شود، زیرا باعث شد رویان بذر آسیب دیده و از بین برود ولی ضدعفونی بذر در هیپوکلرید سدیم به‌مدت بیشتر سبب جوانه‌زنی بیشتر شد. در چهار غلظت هیپوکلرید سدیم، چهار زمان، با خراش‌دهی و بدون خراش‌دهی، با تیمار جیبرلیک‌اسید بذرها مورد آزمایش قرار گرفتند که در نهایت بیشترین جوانه‌زنی بدون خراش‌دهی و ضدعفونی به‌مدت دو ساعت در هیپوکلرید سدیم به‌دست آمد. نخستین شمارش جوانه‌زنی در سومین روز و آخرین شمارش ۲۰ روز پس از اعمال تیمار انجام شد. چهار صدم درصد از وزن دانه یا هفت درصد از کل پروتئین‌های دانه را Saporin-S6 تشکیل می‌دهد. از کل پروتئین موجود در عصاره کالوس گیاه غاسول‌صابونی، ۲ درصد آن SO6 می‌باشد، ۰/۱۲۵ درصد وزن کالوس‌های تولیدی، SO6 است، یعنی در ۱۰ گرم کالوس، ۰/۰۰۱ گرم SO6 وجود دارد که ۰/۰۶ نانومولار آن خاصیت ضد سرطانی دارد (Stirpe *et al*., 1983). عوامل متعددی می‌توانند در افزایش میزان این پروتئین نقش داشته باشند. برای دستیابی به این هدف پیشنهاد می‌شود در پژوهش‌های آینده به‌منظور افزایش میزان جوانه‌زنی بذر گیاه تیمارهای مختلف مورد ارزیابی قرارگیرد و همچنین میزان کالوس‌زایی با هورمون‌های دیگر بررسی شود و از محیط کشت‌های دیگر نیز برای تعیین میزان کالوس‌زایی استفاده شود. به‌عنوان مثال هورمون TDZ فعال‌ترین ماده شبه‌سیتوکینین است و تأثیر آن بر تحریک مناسب ریزنمونه‌ها به اندام‌زایی، شاخه‌زایی، کالوس‌دهی و جوانه‌زایی نابجا در بسیاری از تحقیقات دیگر نیز بیان شده‌است (Safarnejad & Darroudi, 2016). البته تغییر در مقدار میکرو و ماکروالمنت‌های یک محیط کشت تأثیر معنی‌داری در خصوصیات بیوشیمیایی خانواده کاریوفیلاسه ایجاد نکرده است (Holobiuc *et al*., 2013). همچنین تأثیر نوع محیط کشت نیز بر ازدیاد جوانه و رشد طولی شاخه معنی‌دار می‌باشد، به‌عنوان مثال محیط کشت DKW اثر بیشتری از محیط کشت MS داشته است (Emam *et al*., 2013). درصد کالوس‌زایی چهار هفته پس از کشت ریزنمونه‌ها در محیط کشت MS در دو تیمار تنظیم‌کننده رشدی، D–4,2 و NAA نشان داد که بالاترین درصد کالوس‌زایی حدود ۹۵ درصد و بهترین تیمار از لحاظ حجم کالوس، از ریزنمونه ریشه با غلظت ۵۰۰ پی‌پی‌ام، D–4,2 حاصل شد و رنگ کالوس نیز زرد و شفاف بود. در محیط کشت حاوی درصد بیشتری از D–4,2 به‌میزان ۲۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر به‌سمت شوت رفته و اندام‌زایی مشاهده شد.

ساپونین‌ها به‌عنوان مثالی از پروتئین‌های غیرفعال‌کننده ریبوزومی از بافت‌های مختلف گیاه غاسول صابونی جداسازی شده‌اند (Carzaniga ,1994). قسمت‌های مورد استفاده این گیاه عمدتاً ریشه و ریزوم آن و گاهی هم برگ است. ریشه دارای ساپونین، ساپوتوکسین، ساپونارین، صمغ و رزین می‌باشد. البته مقدار ساپونین در دانه‌های گیاه خیلی کمتر است. همچنین هیچ‌گونه تجمع ساپونین در جنین گیاهی که بیانگر اختصاصی بودن بیان ساپونین در بافت‌های مختلف می‌باشد مشاهده نشد (Augustin *et al*., 2011). کالوس هم به‌عنوان یک بافت گیاهی این ظرفیت را دارد که حاوی این پروتئین باشد. با کشت بافت موفقیت‌آمیز این گیاه و اثبات وجود پروتئین SO6 در کالوس آن می‌توان راهی مؤثر در تولید پروتئین در شرایط آزمایشگاهی ارائه کرد. از آنجایی که این ترکیبات بسیار پایدار بوده و فعالیت آنزیمی قوی از خود نشان می‌دهند و توانایی از بین بردن سلول‌ها از طریق اختلال در سنتز پروتئین‌ها را دارند (Abdollahi *et al*., 2017)، در نتیجه اثرات دارویی ضد-سرطانی قوی آن، ضرورت انجام چنین تحقیقاتی را ایجاب می‌کند. این پژوهش بر آن است تا ضمن معرفی بیشتر این گیاه به جامعه علمی کشور، با بررسی، تأیید و اندازه‌گیری میزان آن، وجود پروتئین، SO6 در کالوس گیاه، قابلیت‌ها و کاربردهای گیاه را مورد تأکید قرار دهد.

سپاسگزاری

در پایان از زحمات تمامی استادان، پژوهشگران و دانشجویان محترم مرکز علم و فناوری زیست‌شناسی و دانشگاه جامع امام حسین (ع) تهران که در به‌نتیجه رسیدن

www.SID.ir

Archive of SID

این پژوهش ما را یاری کردند سپاسگزاری می‌شود.

منابع مورد استفاده

- Abdollahi, M., Honari, H., Nazarian, S.H. and Masoudi Kerahroudi, M., 2017. Subcloning and expression of SO6 gene, *Saponaria Officinalis* plant in *E. coli* and investigation of antibody titer in laboratory rat. J. Shahid Sadoughi Univ Med. Sci. 24(12):1024-1033.
- Augustin, J.M., Kuzina, V., Andersen, S.B. and Bak, S., 2011. Molecular activities, biosynthesis and evolution of triterpenoid saponins. Phytochemistry, 72(6):435-457.
- Bewley, J.D., 1997. Seed germination and dormancy. Plant Cell, 9: 1055-1066.
- Carzaniga, R., Sinclair, L., Fordham-Skelton, A.P., Harris, N. and Croy, R.R., 1994 Cellular and subcellular distribution of saponins, type-1 ribosome-inactivating proteins, in soapwort (*Saponaria officinalis* L.). Planta, 4: 461-470.
- Ehyayi, H. and Khajehoseyni, M., 2012. Evaluation of germination characteristics and sleep in 30 mass medicinal plants. Iranian Journal of Field Crops Research, 9: 651-658.
- Emam, M., Ghamari Zare, A., Asadicorom, F. and Looki Anaraki, K., 2013. Micropropagation of *Amygdalus scoparia* L. by bud and embryo culture. Iranian Journal of Rangelands and Forests Plant Breeding and Genetic Research, 21:77-86.
- Guy, C., Haskell, D., Neven, L., Klein, P. and, Smelser, C., 1992. Hydration-state-responsive proteins link cold and drought stress in spinach. Planta, 188: 265-270.
- Holobiuc, I., Helepciuc, F. and Mitoi, E.M., 2010. In vitro conservation under slow growth conditions of two rare plant species from Caryophyllaceae family. Electronic Journal of Biology. 6(4): 86-91.
- Fatima, Z., Mojib, A., Fatima, S., Arshi, A. and Umar, S.H., 2009. Callus induction, biomass growth, and plant regeneration in *Digitalia lanata* Ehrh. influence of plant growth regulators and carbohydrates. 33: 393-405.
- Jia, Z., Koike, K. and Nikaido, T., 1998. Major triterpenoid saponins from *Saponaria officinalis*. Journal of Natural Products, 61: 1368-1373.
- Karimi, M., Kazemitabar, S.K., Azad Bakht, M. and Nematzadeh, G., 2014. Tissue cultur studty in foxglove plant (*Digitalis Nervosa* Staud & Hochst). Journal of Crop Breeding, 6: 13.
- Linke, D., 2009. Detergents: an overview. Methods in Enzymology, 463: 603-617.
- Lokker, C. and Cavers, P.B., 1995 The effects of physical damage on seed production in flowering plants of *Saponaria officinalis*. Canadian Journal of Botany, 73(2): 235-243.
- Murashige, T. and Skoog, F., 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. Physiologia Plantarum, 15(3): 473–497.
- Nabaee, M., Roshandel, P. and Mohammad Khani, A., 2013. The effects of Plant Growth Regulators on Breaking Seed Dormancy in *Silybum marianum L*. Journal of Cell & Tissue Spring, 4(1): 45-54
- Ourmazd, P. and Chalabian, F., 2006. Tissue culture and organogenesis of *Salvia nemorosa*. Iranian Journal of Rangelands and Forests Plant Breeding and Genetic Research. 69- 79
- Puri, M., Kaur, I., Perugini, M.A. and Gupta, R., 2012. Ribosome-inactivating proteins: current statusand biomedical applications. Drug Discov. Today, 17: 83-774.
- Sarkheil, P., Omidi, M., Peyghambari, S.A. and Davazdahemami, S., 2009. The effects of plant growth regulators and explants on callogenesis, regeneration and suspension culture in *Foeniculum vulgare* Mill. Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants. 25: 3. 364-375
- Safarnejad, A. and Darroudi, H., 2016. Indirect regeneration of *Acer monospessulanum* by *in vitro* techniques. Iranian Journal of Rangelands and Forests Plant Breeding and Genetic Research. 25. 1. 1-12
- Stirpe, F., Gasperi-Campani, A., Barbieri, L., Falasca, A., Abbondanza, A. and Stevens, W.A., 1983. Ribosome-inactivating proteins from the seeds of *Saponaria officinalis* L. (soapwort), of *Agrostemma githago* L. (corn cockle) and of *Asparagus officinalis* L. (asparagus), and from the latex of *Hura crepitans* L. (sandbox tree). The Biochemical Journal, 216(3): 617. 617–625
- Stirpe, F., 2004. Ribosome-inactivating proteins. Toxicon, 44: 83-371.

www.SID.ir

Archive of SID

Evaluation of SO6 protein in *Saponaria officinalis* L. callus

H. Honari[1*], S.M. E'temad Aubi[2], F. Esmaili[3], M. Abdollahi[4]

1- Corresponding author, Associ. Prof., Biology Science and Technology Center, Imam Hossein University, Tehran, I.R. Iran.
Email: Honari.hosein@gmail.com
2- PhD Student of nanobiotechnology, Biology Science and Technology Center, Imam Hossein University, Tehran, I.R. Iran
3- M.Sc., Biotechnology, Islamic Azad University, Science and Research Branch, Tehran, I.R. Iran
4- M.Sc. Student of biology, Biology Science and Technology Center, Imam Hossein University, Tehran, I.R. Iran

Received: 02.04.2017 Accepted: 21.06.2017

Abstract

Soapwort (*Saponaria officinalis* L.) is a native plant to central and southern Europe. It is an important and rare plant species in Iran. The species has numerous applications in medicinal, agricultural and health fields. Saponins is one of the bioactive compounds in the species that is used in chemotherapy. Tissue culture is one of the ways of proliferation of the species that is used for production of active ingredients. Saponin has ten isoforms that are different to inhibition of translating ribosomes and cytotoxicity. SO6 is one of the isoforms of saponins. Presence of SO6 protein in soapwort callus was studied through plant tissue culture and different concentrations of growth regulators and environmental factors. After achieving success in tissue culture, protein was extracted from its callus and presence of SO6 protein was confirmed by western blot analysis and measured by ELISA. Results showed that seed germination was possible through using appropriate treatment and soapwort root callus had the highest amount of SO6 protein.

Keywords: Callus, growth regulators, *Saponaria officinalis* L., SO6 protein

www.SID.ir