DOI: http://dx.doi.org/10.22092/ijmapr.2017.109318

دوماهنامه علمی- پژوهشی تحقیقات گیاهان دارویی و معطر ایران
جلد ۳۲، شماره ۶، صفحه ۱۰۰۹-۹۹۸ (۱۳۹۵)

تأثیر منشأ ریزنمونه و غلظت‌های مختلف تنظیم‌کننده‌های رشد بر بهینه‌سازی سوسپانسیون سلولی مرزه بختیاری (*Satureja bachtiarica* L.)

لیلا الیاسی[۱]، علی‌اشرف مهرابی[۲]، مهدی صیدی[۳] و زینب صفری[۴*]

۱- دانش‌آموخته کارشناسی ارشد، اصلاح نباتات، دانشگاه ایلام، ایران

۲- دانشیار، گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ایلام، ایران

۳- استادیار، گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ایلام، ایران

۴*- نویسنده مسئول، دانشجوی دکترای اصلاح نباتات، دانشگاه ایلام، ایران، پست الکترونیک: zsafari_89@yahoo.com

تاریخ دریافت: تیر ۱۳۹۴ تاریخ اصلاح نهایی: اسفند ۱۳۹۴ تاریخ پذیرش: فروردین ۱۳۹۵

چکیده

مرزه بختیاری (*Satureja bachtiarica* L.) متعلق به خانواده نعناعیان و غنی از اسانس‌های ضروریست که برای اهداف مختلف دارویی، خوراکی و بهداشتی مورد استفاده قرار می‌گیرد. کشت درون شیشه‌ای مرزه به‌منظور القاء کالوس و بهینه‌سازی سوسپانسیون سلولی، امکان تولید سریع و استخراج آسان متابولیت‌های ثانویه را فراهم می‌کند. در این تحقیق، القاء کالوس با استفاده از ریزنمونه‌ها و غلظت‌های مختلف تنظیم‌کننده‌های NAA و BAP انجام شد. مناسب‌ترین کالوس‌ها برای القاء کشت‌های سوسپانسیون انتخاب و به محیط‌های کشت مایع تکمیل شده با ترکیب‌های مختلف NAA و BAP منتقل شدند. آزمایش به‌صورت فاکتوریل و در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار اجرا شد و میزان بیوماس سلولی (تعداد سلول) در روزهای مختلف مورد بررسی قرار گرفت. نتایج حاصل از مقایسه میانگین منشأ ریزنمونه نشان داد که ریزنمونه میان‌گره بیشترین تعداد سلول را تولید کرد. همچنین بررسی برهم‌کنش ریزنمونه و محیط کشت مشخص کرد که حداکثر بیوماس سلولی در روز پنجم و توسط ریزنمونه میان‌گره و محیط کشت محتوی ۲mg.L^{-1} NAA+۰/۵mg.L^{-1} BAP بدست آمد. از سوی دیگر، روند رشد و تکثیر سلولی طی روزهای پس از استقرار کشت‌های سوسپانسیون نیز نشان داد که این ترکیب هورمونی دارای بیشترین مطلوبیت برای تولید حداکثر تعداد سلول در تمام ریزنمونه‌های مورد آزمون می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: القاء کالوس، بیوماس سلولی، مرزه بختیاری (*Satureja bachtiarica* L.)، سوسپانسیون، BAP، NAA.

مقدمه

جنس مرزه (*Satureja*) متعلق به خانواده نعناعیان (Lamiaceae) و دارای بیش از ۳۰ گونه است که مرکز توزیع آنها در بخش‌های شرقی مدیترانه می‌باشد (EL-Gazzar & Watson, 1970؛ Hadian *et al*., 2008). گونه‌های مختلف مرزه به‌صورت یک‌ساله و چندساله در مناطق مختلف ایران می‌رویند. مرزه بختیاری با نام علمی *Satureja bachtiarica* L. دارای پراکندگی نسبتاً وسیعی در ایران است و در استان‌های غربی، مرکزی و جنوب‌غربی ایران پراکنده است (Sefidkon *et al*., 2004).

مهمترین ترکیب‌های شیمیایی اسانس جنس مرزه، مونوترپنوئیدها می‌باشند. با وجود این، گونه‌های مختلف جنس مرزه از نظر میزان اسانس و نوع ترکیب‌های تشکیل‌دهنده تنوع زیادی دارند. در اسانس برخی گونه‌ها، ترکیب‌های عمده پولگن و منتول هستند، در حالی که در برخی دیگر از گونه‌ها ترکیب‌هایی مانند کارواکرول، تیمول، گاما-ترپینن، پارا-سیمن، بتا-کاریوفیلن و بورنئول ترکیب‌های عمده اسانس را تشکیل می‌دهند (Ahmadi *et al.*, 2009؛ Baser *et al.*, 2004؛ Sefidkon *et al.*, 2007).

تولید انبوه و سریع متابولیت‌ها از طریق روش‌های شیمیایی عمدتاً مشکل و یا غیرممکن می‌باشد. از سوی دیگر محدود بودن منابع گیاهی، بالا بودن هزینه‌ها و سایر مشکلات مربوط به فرآوری متابولیت‌های ثانویه از گیاهان طبیعی، موجب تشدید گرایش به بهره‌گیری از کشت سلولی در شرایط آزمایشگاهی و کنترل شده برای تولید این ترکیبهای با ارزش در سال‌های اخیر شده‌است (Ahmadi *et al.*, 2012؛ Mulabagal & Tsay, 2004؛ Omidi & Farzin, 2012).

سوسپانسیون سلولی معمولاً با انتقال قطعاتی از کالوس به یک محیط کشت مایع بوجود می‌آید و شامل مجموعه‌ای از سلول‌های منفرد است که در محیط کشت مایع شناور بوده و به‌طور نامحدود و بدون تغییر رشد و تکثیر می‌یابند (Omidi & Farzin, 2012).

البته تاکنون مطالعه‌ای در زمینه کشت کالوس و استقرار کشت سلولی گونه مرزه بختیاری انجام نشده‌است. مطالعات انجام شده بر روی یکی از گونه‌های جنس مرزه (*Satureja hortensis* L.) مشخص کرد که محیط کشت‌های محتوی BAP و IBA در مقایسه با محیط‌های حاوی IBA به تنهایی، کال‌زایی بهتری داشتند (Motaghinia, 2013). همچنین Sahrarooa و همکاران (۲۰۱۴) نشان دادند که محیط کشت B5 محتوی ۱ میلی‌گرم در لیتر IBA در ترکیب با ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP و نیز محیط کشت MS تکمیل شده با ۲ میلی‌گرم در لیتر IBA و ۲ میلی‌گرم در لیتر BAP منجر به حصول حداکثر سرعت القاء کالوس در *Satureja khuzistanica* شدند.

این تحقیق با مقایسه پاسخ ریزنمونه‌های مختلف به کشت سلولی و چگونگی رشد سلول‌ها پس از ایجاد محیط سوسپانسیون سلولی، تلاشی در جهت بهینه‌سازی کشت کالوس و سوسپانسیون سلولی گیاه دارویی مرزه بختیاری برای اولین بار و زمینه‌سازی برای تولید اقتصادی، بهبود کمّیت و کیفیت ترکیب‌های دارویی موجود در این گیاه می‌باشد. به‌طوری که با تولید ترکیب‌های آلکالوئیدی و یا فلاونوئیدی به‌وسیله سلول‌های منفرد و نوع خاصی از کشت، می‌توان حجم وسیعی از نیازهای انسانی را برطرف کرد.

مواد و روش‌ها

برای تهیه مواد گیاهی، از گیاهچه‌های جوان رشد کرده در مزرعه دانشگاه ایلام استفاده شد. شستشوی اولیه گیاهچه‌ها توسط ۸ دقیقه آب معمولی حاوی چند قطره مایع شوینده (به‌منظور افزایش جذب سطحی) و ۳۰ دقیقه قرار دادن زیر آب جاری انجام شد. در ادامه گیاهچه‌ها توسط ۳۰ ثانیه اتانول ۷۰٪ گندزدایی و یک‌بار و به‌مدت ۵ دقیقه با آب مقطر استریل آبکشی شدند. در نهایت گیاهچه‌ها به مدت ۱۲ دقیقه در محلول هیپوکلریت سدیم ۱٪ فرو برده شدند و چهار مرتبه هر بار به مدت ۵ دقیقه آبکشی شدند.

ریزنمونه‌های مختلف از قسمت‌های رویشی گیاه مرزه بختیاری شامل میان‌گره، جوانه جانبی، جوانه انتهایی و برگ (قسمت میانی برگ شامل رگبرگ اصلی، به طول ۰/۵ سانتی‌متر) از گیاهچه‌های ضدعفونی شده تهیه شد و برای القاء کالوس به محیط کشت MS (Murashige & Skoog, 1962) تکمیل شده با ۳٪ ساکارز، ۰/۸٪ آگار و نسبت‌های مختلف دو نوع تنظیم‌کننده رشد ۶-بنزیل آمینوپورین (BAP, 6-benzylaminipurine) و نفتالین استیک اسید (NAA, Naphthaleneacetic acid) منتقل شدند. میزان pH روی ۵/۸ تنظیم شد و پتری‌دیش‌ها با پارافیلم مسدود شده

و در اتاقک رشد و در شرایط تاریکی مطلق و دمای ۱±۲۵ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

سوسپانسیون سلولی با انتقال قطعه‌ای از کالوس‌های ترد به میزان ۰/۵ تا ۰/۷۵ گرم، به‌عنوان مایه تلقیح به ظروف شیشه‌ای محتوی ۴۰ تا ۵۰ میلی‌لیتر محیط کشت مایع استریل با ترکیب‌های مشابه محیط کشت تولید کالوس ولی بدون اضافه کردن آگار منتقل گردیدند. در این تحقیق از ترکیب‌های هورمونی مختلف شامل (۱) ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA + ۲ میلی‌گرم در لیتر BAP، (۲) ۱ میلی‌گرم در لیتر NAA + ۱ میلی‌گرم در لیتر BAP و (۳) ۲ میلی‌گرم در لیتر NAA + ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP برای بهینه‌سازی سوسپانسیون سلولی استفاده شد.

درب ظروف توسط پارافیلم مسدود شد و به‌منظور ایجاد سوسپانسیون یکنواخت، روی شیکر اربیتالی ابتدا به مدت ۲۴ ساعت با سرعت ۱۲۰ دور در دقیقه و بعد ۲۴ ساعت با سرعت ۱۰۰ دور در دقیقه و بعد با سرعت ۹۰ دور در دقیقه مستقر گردیدند. کشت‌های سوسپانسیون سلولی در درجه حرارت ۱± ۲۵ سانتی‌گراد و در شرایط سایه‌دهی نگهداری شدند.

محاسبات آماری

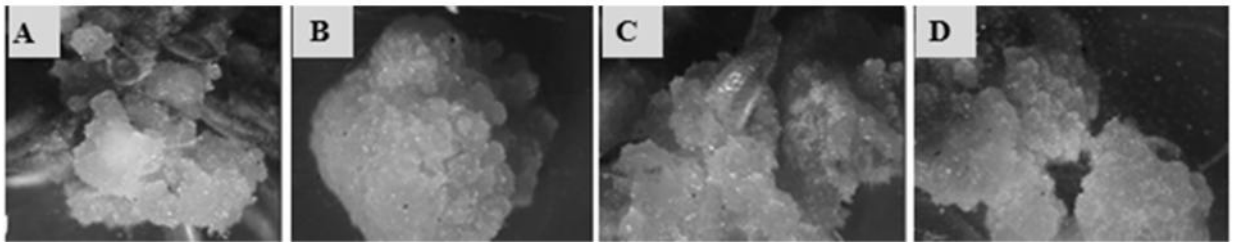
در این بررسی، تعداد سلول‌ها که پارامتر دقیقی برای محاسبه روند تقسیم سلول‌ها می‌باشد، در فواصل زمانی دو روز یک‌بار به مدت ۱۵ روز اندازه‌گیری شد. به‌منظور تفکیک سلول‌ها، از روش رنگ‌آمیزی با تری‌اکسید کروم ۱۲٪ استفاده شد. به این صورت که در شرایط استریل، یک میلی‌لیتر از محیط کشت سوسپانسیون با چهار میلی‌لیتر از محلول تری‌اکسید کروم (۱۲٪) مخلوط شد و در دمای ۶۵ تا ۷۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰ دقیقه درون بن‌ماری قرار گرفت. در طول این مدت، نمونه‌ها ۲ بار از بن‌ماری خارج و با استفاده از دستگاه ورتکس به مدت پنج ثانیه بهم زده شد. سپس مهلت داده شد تا در دمای اتاق خنک شود و دوباره با استفاده از دستگاه ورتکس، مخلوط بهم زده شد و پس از آن با استفاده از سمپلر مقدار ۲ میکرولیتر از مخلوط بر روی لام شیشه‌ای قرار داده شد و تعداد سلول‌های موجود در هر میلی‌لیتر از کشت سوسپانسیون سلولی به‌وسیله میکروسکوپ نوری و درشت‌نمایی ۱۰X شمارش گردید.

داده‌ها به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی و با ۳ تکرار مورد بررسی قرار گرفتند. تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار آماری SAS 9.2 انجام و برای مقایسه میانگین داده‌ها از آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح ۱٪ استفاده شد.

نتایج

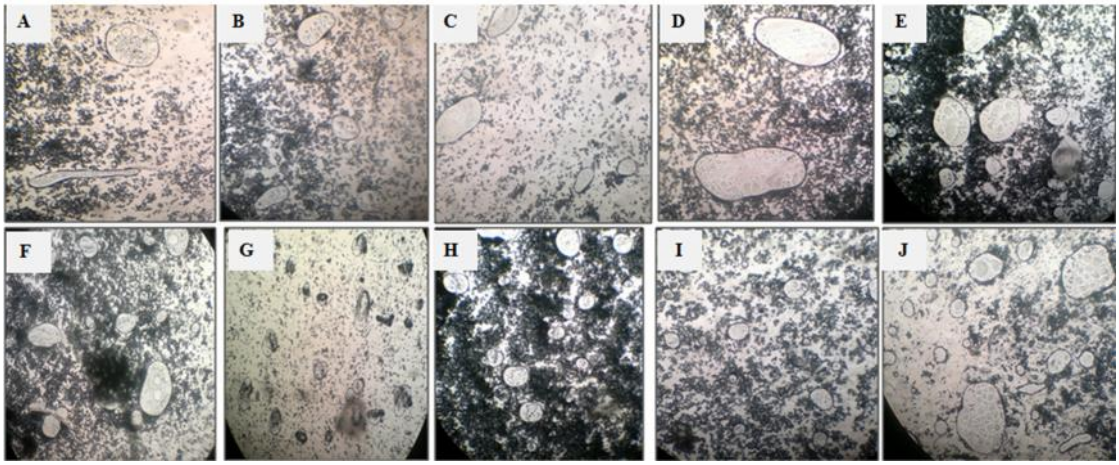
نتایج حاصل از کشت کالوس مشخص کرد که ریزنمونه‌ها دارای واکنش‌های متفاوتی نسبت به ترکیب‌های مختلف دو تنظیم‌کننده BAP و NAA از نظر درصد کال‌زایی و حجم کالوس هستند. با این حال، کالوس‌های بدست‌آمده از همه ریزنمونه‌ها کالوس‌هایی سفید، ترد و شکننده بودند که به نظر می‌رسد به‌دلیل قرار دادن کالوس‌ها در شرایط تاریکی باشد (شکل ۱).

در این مطالعه، رنگ‌آمیزی با تری‌اکسید کروم ۱۲٪ توانست سلول‌ها را از هم جدا کرده و شمارش آنها را آسان کند. با توجه به شکل ۲، ملاحظه می‌شود که در روزهای نخست استقرار کشت سوسپانسیون سلولی اندازه سلول‌ها بزرگ اما تعداد آنها اندک است (شکل ۲، A، B و C). البته هرچه به مراحل پایانی مرحله تأخیری نزدیک می‌شویم، سلول‌ها تقسیم قابل ملاحظه‌ای انجام نمی‌دهند و بیشتر از نظر اندازه تغییر می‌کنند (شکل ۲، D). با شروع مرحله تصاعدی، تقسیم سلولی افزایش یافته و بتدریج تعداد سلول‌ها افزایش یافته و اندازه آنها کاهش می‌یابد (شکل ۲، G، H و I). پس از ورود سلول‌ها به مرحله سکون افزایش قابل ملاحظه‌ای در تعداد سلول‌ها مشاهده نمی‌شود. در این مرحله اندازه سلول‌ها به‌طور قابل ملاحظه‌ای نسبت به مرحله تصاعدی افزایش یافته است (شکل ۲، J).



شکل ۱- پاسخ ریزنمونه‌های مختلف به سطوح مختلف تنظیم‌کننده‌های رشد برای القاء کالوس

الف) ریزنمونه قطعات گرهی، ترکیب هورمونی ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر BAP و ۲ میلی‌گرم در لیتر NAA، ب) ریزنمونه برگ، ترکیب هورمونی ۱ میلی‌گرم در لیتر BAP و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA، ج) ریزنمونه جوانه انتهایی، ترکیب هورمونی ۲ میلی‌گرم در لیتر BAP و ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر NAA، د) ریزنمونه میان‌گره، ترکیب هورمونی ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP و ۲ میلی‌گرم در لیتر NAA



شکل ۲- تنوع شکل و اندازه سلول‌ها در مراحل مختلف سوسپانسیون سلولی

A، B و C: روزهای آغاز استقرار کشت سوسپانسیون سلولی، D: اواخر مرحله تأخیری سلول‌ها، E و F: آغاز مرحله تصاعدی، G، H و I: مرحله تصاعدی و J: مرحله سکون

با توجه به نتایج تجزیه واریانس (جدول ۱)، نوع محیط کشت تأثیر معنی‌داری بر تعداد سلول‌ها در روز سوم و پنجم نداشت. در حالیکه بین محیط کشت‌های مختلف برای صفات تعداد سلول‌های شمارش شده در روزهای نهم و یازدهم تفاوت معنی‌داری مشاهده شد. به‌طوری که بیشترین بیوماس سلولی (تعداد سلول در هر میلی‌لیتر محیط کشت) در روز نهم، مربوط به ترکیب هورمونی ۱mg.L^{-1} NAA+۱mg.L^{-1} BAP بود (جدول ۲).

نتایج بدست‌آمده برای تعداد سلول‌های شمارش شده در روز یازدهم، بیانگر اختلاف معنی‌دار محیط کشت با ترکیب تیماری ۱mg.L^{-1} NAA+۱mg.L^{-1} BAP نسبت به محیط کشت حاوی ۰/۵mg.L^{-1} NAA+۲mg.L^{-1} BAP است، در حالیکه تفاوت معنی‌داری با محیط کشت mg.L^{-1} ۲mg.L^{-1} NAA+۰/۵BAP از خود نشان نداد. از سوی دیگر محیط کشت‌های حاوی تنظیم‌کننده‌های BAP و NAA با نسبت ۱:۴ و ۴:۱، همانند روز نهم تفاوت معنی‌داری با هم نداشتند (جدول ۱ و ۲).

جدول ۱- تجزیه واریانس بیوماس سلولی کشت سوسپانسیون سلولی گیاه دارویی مرزه بختیاری در روزهای مختلف

منابع تغییر	درجه آزادی	میانگین مربعات			
		روز سوم	روز پنجم	روز نهم	روز یازدهم
محیط کشت	۲	۲۱۸/۱۱ ns	۲۸۶/۰۳ ns	۲۹۱۸۲/۰۳ **	۱۲۴۴۰/۰۲ *
ریزنمونه	۳	۱۹۹/۸۱ ns	۱۳۷۶/۰۴ **	۱۶۰۰۵/۷۳ *	۹۶۵۵/۵۱ *
محیط کشت x ریزنمونه		۴۶۲/۳۷ **	۱۱۴۰/۰۶ **	۸۵۴۹/۹۵ ns	۹۰۶۵/۴۰ *
خطای آزمایشی	۲۴	۱۰۵/۷۵	۲۷۴/۰۳	۴۱۸۳/۴۷	۳۱۲۴/۵۰

**: تفاوت معنی‌دار در سطح $P<0.01$، *: تفاوت معنی‌دار در سطح $P<0.05$ و ns: عدم تفاوت معنی‌دار

جدول ۲- مقایسه میانگین تأثیر محیط کشت‌های مختلف بر تعداد سلول شمارش شده در کشت سوسپانسیون سلولی

محیط کشت (میلی‌گرم در لیتر)	بیوماس سلول (تعداد سلول در میلی‌لیتر)	
	روز نهم	روز یازدهم
۰/۵NAA+۲BAP	۱۱۲۴۵۸b±۱۰۷۵۸	۱۶۵۸۳۳b±۹۴۰۰
۱NAA+۱BAP	۱۵۹۹۱۶a±۸۵۷۹	۱۹۷۵۰۰a±۷۴۴۱
۲NAA+۰/۵BAP	۱۲۴۵۸۳b±۱۳۷۴۴	۱۷۶۶۲۵ab±۱۲۴۹۶

مقادیر، میانگین ۳ تکرار±SE است. حروف یکسان بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن است.

مطابق نتایج بدست‌آمده، منشأ ریزنمونه برای صفت بیوماس سلولی در روزهای پنجم، نهم و یازدهم اختلاف معنی‌داری را در سطوح مختلف (۱٪ و ۱٪) نشان دادند (جدول ۱). مقایسه میانگین تأثیر نوع ریزنمونه بر بیوماس سلولی، نشان می‌دهد که ریزنمونه میان‌گره برای بیوماس سلولی بدست‌آمده در روزهای پنجم و نهم دارای حداکثر کارایی و مطلوبیت نسبت به سایر ریزنمونه‌ها می‌باشد. از سوی دیگر، بررسی صفت بیوماس سلولی در روز یازدهم حکایت از عدم وجود تفاوت معنی‌دار بین ریزنمونه‌های آزمون شده داشت. مطابق این نتایج، ریزنمونه‌های جوانه انتهایی، جوانه جانبی و میان‌گره دارای کارایی یکسانی برای تولید بیوماس سلولی بودند (جدول ۱ و ۳).

جدول ۳- مقایسه میانگین تأثیر ریزنمونه مختلف بر تعداد سلول شمارش شده در کشت سوسپانسیون سلولی

منشأ ریزنمونه	بیوماس سلول (تعداد سلول در میلی لیتر)		
	روز پنجم	روز نهم	روز یازدهم
جوانه انتهایی	۳۲۱۱۱b±۴۰۳۹	۱۳۸۸۳۳ab±۱۳۲۰۳	۱۹۶۰۵۵a±۱۱۸۸۴
جوانه جانبی	۲۶۸۳۳b±۳۳۲۸	۱۲۱۷۲۲b±۹۳۵۴	۱۶۸۸۸۸ab±۱۰۳۹۸
میان‌گره	۳۹۵۰۰a±۳۹۸۱	۱۵۸۵۵۵a±۱۵۷۱۵	۱۹۱۸۳۳a±۱۰۴۹۸
برگ	۲۶۱۱۱b±۲۳۰۷	۱۱۰۱۶۶b±۱۴۸۵۲	۱۶۳۱۶۶b±۱۳۲۶۸

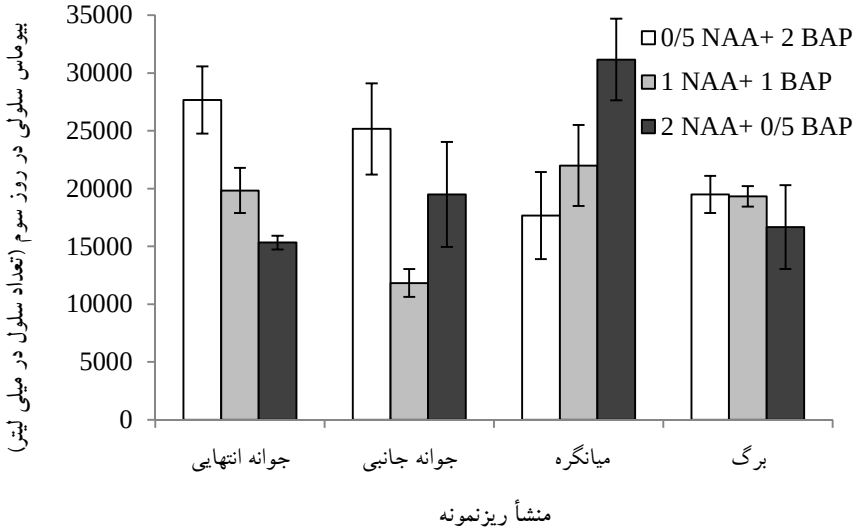
مقادیر، میانگین ۳ تکرار±SE است. حروف یکسان بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن است.

با توجه به تجزیه واریانس برهم‌کنش نوع محیط کشت و منشأ ریزنمونه، تعداد سلول در هر میلی‌لیتر محیط کشت اختلاف معنی‌داری را در سطح احتمال ۱٪ برای روزهای سوم و پنجم و در سطح ۵٪ برای روز یازدهم نشان داد. مطابق این نتایج، برهم‌کنش تیمارهای مورد بررسی تأثیر معنی‌داری بر بیوماس سلولی در روز یازدهم نداشت (جدول ۱).

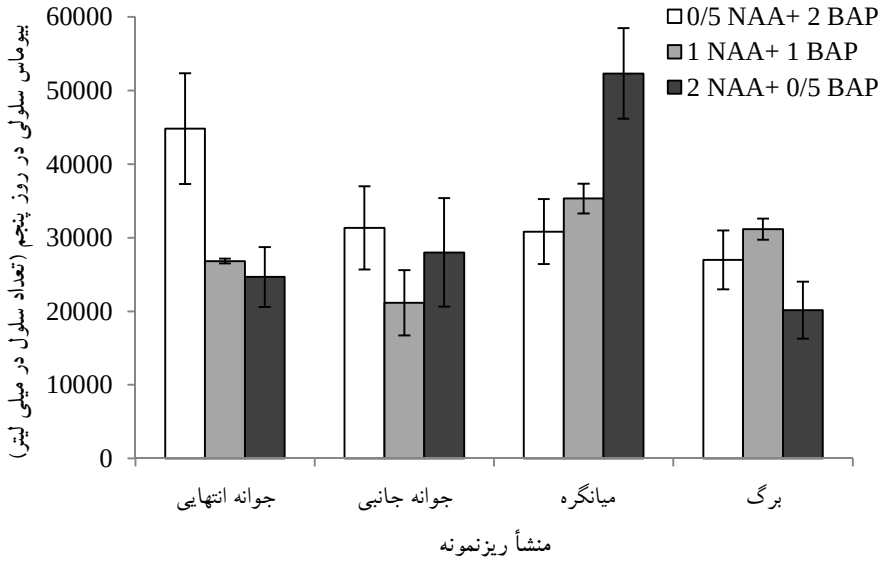
با توجه به نتایج مقایسه میانگین، ریزنمونه‌های با منشأ مختلف واکنش‌های متفاوتی به محیط کشت‌های بررسی شده داشتند. به‌نحوی که ریزنمونه میان‌گره نسبت به سایر ریزنمونه‌ها در محیط کشت حاوی تنظیم‌کننده‌های رشد با ترکیب ۲mg.L^{-1} NAA+۰/۵mg.L^{-1} BAP، منجر به حصول حداکثر بیوماس سلولی در روز سوم گردید. در حالیکه بررسی واکنش ریزنمونه‌های جوانه انتهایی و جانبی نشان داد که حداکثر بیوماس سلولی در روز سوم، توسط ترکیب هورمونی ۰/۵mg.L^{-1} NAA+۲mg.L^{-1} BAP حاصل شد (شکل ۳).

نتایج مقایسه میانگین بدست آمده برای روز پنجم نیز نتایج مشابهی را با روز سوم نشان داد. به این صورت که برای این صفت نیز استفاده از ریزنمونه میان‌گره برای القاء کالوس و محیط کشت ۲mg.L^{-1} NAA+۰/۵mg.L^{-1} BAP دارای بیشترین کارایی برای تولید بیوماس سلولی بود. با این حال استفاده از این نوع ترکیب تنظیم‌کننده‌های رشد در سایر ریزنمونه‌های بررسی شده، کارایی چندانی برای تولید بیوماس سلولی نداشت (شکل ۴).

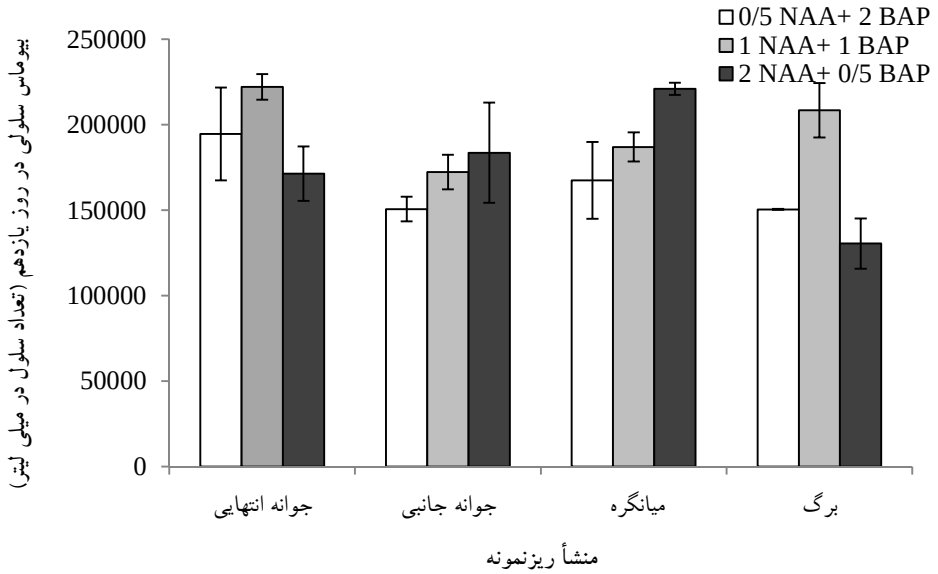
نتایج بدست آمده در شکل ۵ نیز حکایت از مطلوبیت محیط کشت ۲mg.L^{-1} NAA+۰/۵mg.L^{-1} BAP برای تولید بیشترین تعداد سلول داشت. به‌نحوی که ریزنمونه‌های میان‌گره و جوانه جانبی در این محیط کشت بیشترین بیوماس سلولی را نسبت به سایر ترکیب‌های هورمونی تولید کردند. اما در مورد سایر ریزنمونه‌های مورد آزمون (برگ و جوانه انتهایی)، این روند صادق نبود و استفاده از این محیط کشت منجر به کاهش تعداد سلول‌ها شد.



شکل ۳- بررسی پاسخ ریزنمونه‌های مختلف به ترکیب‌های مختلف تنظیم‌کننده‌های رشد در روز سوم کشت سوسپانسیون سلولی (مقادیر تنظیم‌کننده‌ها: میلی‌گرم در لیتر)



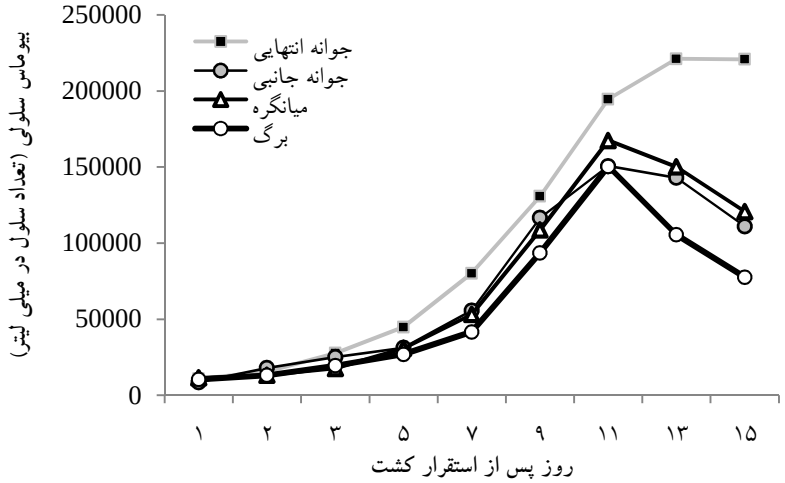
شکل ۴- بررسی پاسخ ریزنمونه‌های مختلف به ترکیب‌های مختلف تنظیم‌کننده‌های رشد در روز پنجم کشت سوسپانسیون سلولی (مقادیر تنظیم‌کننده‌ها: میلی‌گرم در لیتر)



شکل ۵- بررسی پاسخ ریزنمونه‌های مختلف به ترکیب‌های مختلف تنظیم‌کننده‌های رشد در روز یازدهم کشت سوسپانسیون سلولی (مقادیر تنظیم‌کننده‌ها: میلی‌گرم در لیتر)

بررسی رشد و تکثیر سلول‌ها نشان می‌دهد که ریزنمونه‌های مختلف در محیط کشت حاوی ۰/۵$mg.L^{-1}$ NAA+۲$mg.L^{-1}$ BAP پاسخ متفاوتی دارند. مطابق این نتایج، بهترین رشد و تکثیر سلول‌ها، برای تمام ریزنمونه‌ها از روز پنجم آغاز شده و برای ریزنمونه‌های میان‌گره، جوانه جانبی و برگ تا روز یازدهم ادامه و بعد کاهش یافته است. از سوی دیگر، ریزنمونه جوانه انتهایی تفاوت معنی‌داری را با سایر ریزنمونه‌ها نشان داد. به‌طوری

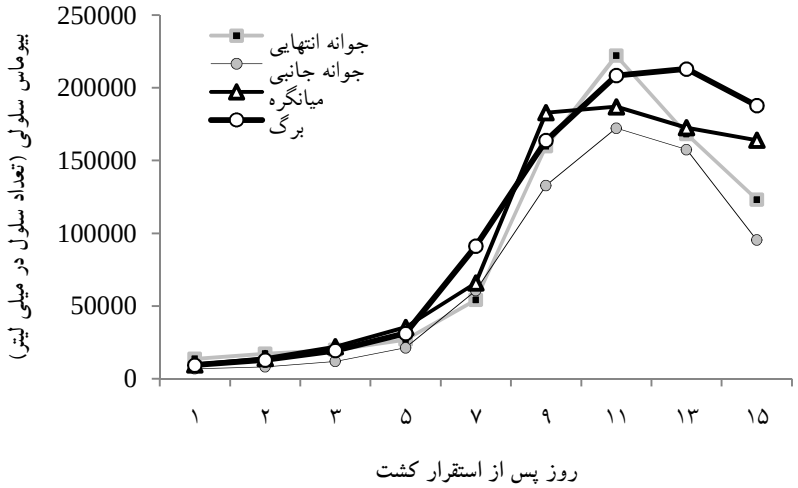
که برتری آن نسبت به سایر ریزنمونه‌ها قابل مشاهده می‌باشد. اما از روز یازدهم و آغار مرحله کاهشی، این اختلاف با شدت بیشتری مشهود بود. روند تکثیر سلولی برای این ریزنمونه تا روز سیزدهم ادامه یافت و پس از آن، به حالت سکون درآمد تا جایی که افزایش قابل ملاحظه‌ای در تعداد سلول‌ها مشاهده نشد. به‌طور کلی و پس از طی پانزده روز شمارش سلول، مشخص شد که ریزنمونه جوانه انتهایی در این محیط کشت، بیشترین تکثیر را نسبت به سایر ریزنمونه‌ها دارد (شکل ۶). لازم به ذکر است با توجه به سرعت رشد بالای تکثیر سلول‌ها در این گیاه، برای استقرار کشت سوسپانسیون سلولی موفق از گیاه دارویی مرزه بختیاری در این محیط کشت لازم است حداکثر بعد از ۱۰ روز کشت سلولی واکشت شود.



شکل ۶- مقایسه رشد سلول‌های شمارش شده ریزنمونه‌های با منشأ مختلف در پاسخ به محیط کشت حاوی ۰/۵mg.L^{-1} NAA+۲mg.L^{-1} BAP

نتایج حاصل از مقایسه تعداد سلول‌های شمارش شده ریزنمونه‌های با منشأ مختلف در پاسخ به محیط کشت ۱mg.L^{-1} NAA+۱mg.L^{-1} BAP، نشان می‌دهد که بیشترین تکثیر سلول‌های تمام ریزنمونه‌های بررسی شده، از روز پنجم شروع شده و تا روز یازدهم ادامه داشته است.

با توجه به نتایج، اگرچه تعداد سلول‌های تولید شده از کالوس برگی تا روز یازدهم اختلاف جزئی با تعداد سلول‌های سایر ریزنمونه‌ها دارد، اما از روز یازدهم این اختلاف بیشتر قابل ملاحظه است. به‌طوری که ورود سلول‌های ریزنمونه برگ به مرحله سکون با آغار مرحله کاهشی سلول‌ها در سایر ریزنمونه‌ها همراه است. براساس این نتایج، مشخص می‌شود که مرحله کاهشی سلول‌های حاصل از ریزنمونه میان‌گره نسبت به ریزنمونه‌های جوانه جانبی و جوانه انتهایی زودتر آغاز شده، اما با شدت کمتری نسبت به این دو ریزنمونه ادامه می‌یابد. بنابراین پس از پایان آزمایش (۱۵ روز) مشخص شد که کالوس‌های حاصل از ریزنمونه‌های برگی در این ترکیب هورمونی، بیشترین تکثیر را نسبت به سایر ریزنمونه‌ها نشان دادند. به‌طور کلی می‌توان گفت برای ایجاد کشت سوسپانسیون سلولی موفق در این محیط کشت برای تمام ریزنمونه‌ها به‌استثنای ریزنمونه میان‌گره، انجام واکشت حداکثر ده روز پس از کشت سلولی واکشت ضروری می‌باشد. البته ریزنمونه میان‌گره با توجه به سرعت رشد نسبتاً بالایی که دارد، پس از گذشت ۸ روز از کشت سلولی باید واکشت شود (شکل ۷).

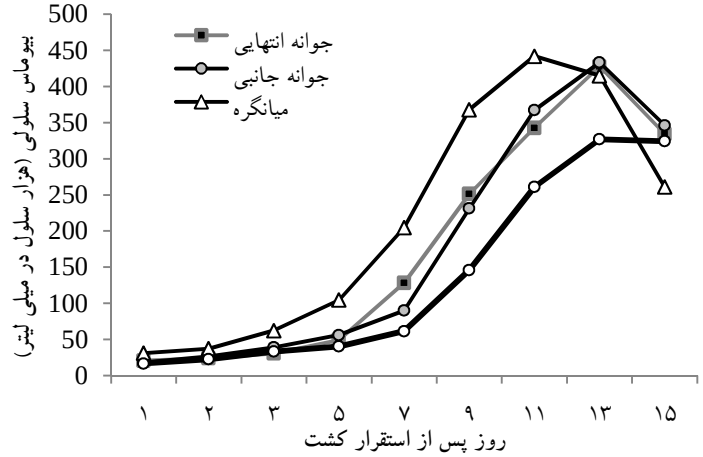


شکل ۷- مقایسه رشد سلول‌های شمارش شده ریزنمونه‌های با منشأ مختلف در پاسخ به محیط کشت حاوی ۱mg.L^{-1} NAA+m۱mg.L^{-1} BAP

مطابق نتایج بررسی تعداد سلول‌های بدست آمده از کالوس‌های با منشأ ریزنمونه‌های مختلف در محیط کشت محتوی ۲mg.L^{-1} NAA+۰/۵mg.L^{-1} BAP، حداکثر رشد سلول‌ها برای ریزنمونه میان‌گره از روز سوم و برای سایر ریزنمونه‌ها از روز پنجم آغاز گردید. این روند برای ریزنمونه میان‌گره تا روز یازدهم و برای سایر ریزنمونه‌ها تا روز سیزدهم ادامه داشت و پس از رشد سلول‌ها کاهش یافت (به‌استثنای ریزنمونه برگی که از روز سیزدهم وارد مرحله سکون شد).

این نتایج نشان می‌دهد که تعداد سلول‌های حاصل از کالوس‌های با منشأ میان‌گره و برگ، اختلاف معنی‌داری را با هم و نیز با سایر ریزنمونه‌ها دارند. به گونه‌ای که ریزنمونه میان‌گره بیشترین تکثیر سلولی و ریزنمونه برگ کمترین تکثیر سلولی را به خود اختصاص داده‌اند. همچنین تفاوت معنی‌داری میان تعداد سلول‌های حاصل از ریزنمونه‌های جوانه جانبی و جوانه انتهایی مشاهده نشد.

با توجه به سرعت بالای رشد سلولی ریزنمونه‌ها در این محیط کشت برای دستیابی به بهترین نتایج، کشت‌های حاصل از ریزنمونه میان‌گره حداکثر ۱۱ روز پس از استقرار کشت سلولی و سایر ریزنمونه‌ها حداکثر ۱۳ روز پس از کشت سلولی باید واکشت شوند (شکل ۸).



شکل ۸- مقایسه رشد سلول‌های شمارش شده ریزنمونه‌های با منشأ مختلف در پاسخ به محیط کشت حاوی ۲mg.L^{-1} NAA+۰/۵mg.L^{-1} BAP

بحث

بکارگیری تکنیک‌های کشت بافت برای بهینه‌سازی کشت‌های سلولی و بدست آوردن سلول‌های یک شکل و سریع‌الرشد دارای اهمیت بالایی در مطالعه مسیرهای بیوشیمیایی تولید متابولیت‌های ثانویه است (Sarkheil *et al*., 2009؛ Razeghi *et al*., 2015).

کشت‌های سلولی باید به‌طور مرتب توسط یک شیکر (تکان‌دهنده)، هوادهی شوند تا از تجمع مواد سمّی در یک نقطه جلوگیری شود و سلول‌های کالوس به‌تدریج از هم جدا شوند (Omidi & Farzin, 2012). در این مطالعه نیز تکان خوردن محیط کشت مایع حاوی قطعات کالوس بر روی شیکر اربیتالی با شرایط ذکر شده، به خوبی توانست ارتباط بین سلول‌ها را از بین برده و تک سلول و یا توده‌های چند سلولی منفرد ایجاد کند.

در این مطالعه، به‌منظور القاء کال‌زایی و استقرار کشت‌های سوسپانسیون سلولی از ۳۰ گرم ساکارز (۳٪) استفاده شد. Lee و همکاران (۲۰۰۶) نیز پس از بررسی غلظت‌های مختلف ساکارز نشان دادند که ۳۰ گرم ساکارز دارای حداکثر کارایی برای تولید بیوماس سلولی می‌باشد.

سلول‌ها در روزهای آغازین کشت، نسبت به روزهای میانی بزرگتر و اسفنجی شدند و در روزهای میانی تعداد سلول‌ها زیادتر و اندازه آنها کوچکتر شد. از سوی دیگر، تنظیم‌کننده‌های NAA و BAP، فعالیت متفاوتی بر روی تقسیم و طویل شدن سلول‌ها در کشت‌های سوسپانسیون سلولی دارند. بنابراین به نظر می‌رسد اِعمال NAA در کشت سوسپانسیون سلولی، تقسیم سلولی را به تعویق می‌اندازد و باعث رشد طولی سلول‌ها می‌شود.

براساس نتایج حاصل از این مطالعه، محیط کشت حاوی تنظیم‌کننده‌های BAP و NAA با نسبت ۱:۱ بیشترین تعداد سلول را در روز نهم به خود اختصاص داد. از سوی دیگر محیط کشت‌های حاوی تنظیم‌کننده‌های BAP و NAA به‌ترتیب با نسبت ۱:۴ و ۴:۱، در روزهای نهم و یازدهم تفاوت معنی‌داری با هم نداشتند.

مطابق نتایج بدست آمده از برهم‌کنش تیمارهای مورد بررسی، کالوس‌های حاصل از جوانه‌های انتهایی و جانبی در محیط کشت شامل ۰/۵mg.L^{-1} NAA+۲mg.L^{-1} BAP، منجر به حصول افزایش چشمگیر بیوماس سلولی در روزهای سوم و پنجم گردیدند. مقایسه رشد سلول‌ها در محیط کشت‌های مختلف (شکل‌های ۵، ۶ و ۷)، مشخص می‌کند که ریزنمونه میان‌گره بیشترین تکثیر سلولی را در محیط کشت ۲mg.L^{-1} NAA+۰/۵mg.L^{-1} BAP نشان می‌دهد. Razeghi و همکاران (۲۰۱۵) نیز این نسبت از تنظیم‌کننده‌های رشد را به‌عنوان بهترین ترکیب‌ها برای استقرار کشت سلولی در کرفس کوهی گزارش کردند. Ahmadi و همکاران (۲۰۱۲) و Sarkheil و همکاران (۲۰۰۹) نیز نشان دادند که استفاده از غلظت کمتر سیتوکینین (BAP) نسبت به اکسین (2,4-D)، حداکثر کارایی را برای استقرار کشت‌های سوسپانسیون خواهد داشت.

بیشترین تکثیر سلولی ریزنمونه برگ در محیط کشت ۱mg.L^{-1} NAA+۱mg.L^{-1} BAP مشاهده می‌شود. این نتایج همسو با نتایج Hakkim و همکاران (۲۰۱۱) می‌باشد. مطابق نتایج آنان، استفاده از تنظیم‌کننده‌های NAA و BAP به غلظت ۱ میلی‌گرم در لیتر به همراه ۰/۵ میلی‌گرم Kin برای استقرار کشت‌های سلولی حاصل از کالوس‌های برگی منجر به حصول حداکثر بیوماس سلولی خواهد شد. در این مطالعه به علت عملکرد بهتر BAP نسبت به Kin (Ahmadi *et al*., 2012)، از اعمال Kin صرف‌نظر شد. با این حال، نتایج مشابهی با مطالعات گذشته (Hakkim *et al*., 2011) بدست آمد.

در مورد ریزنمونه جوانه انتهایی، از نظر تعداد سلول شمارش شده اختلاف معنی‌داری بین سه محیط کشت مشاهده نشد. در حالیکه اختلاف معنی‌داری بین سه محیط کشت در روند رشد سلولی برای ریزنمونه جوانه انتهایی مشاهده گردید؛ تا جایی که در محیط کشت ۰/۵mg.L^{-1} NAA+۲mg.L^{-1} BAP رشد سلولی مدت زمان بیشتری ادامه یافت و دیرتر وارد مرحله کاهشی شد.

به‌طور کلی و مطابق نتایج حاصل از منحنی‌های رشد در کشت سوسپانسیون سلول، می‌توان نتیجه گرفت که بیشترین تکثیر سلولی کالوس‌های حاصل از تمام ریزنمونه‌های آزمون شده در محیط‌های کشت مختلف، از روز پنجم آغاز شده و تا روز یازدهم (و گاهی روز سیزدهم) ادامه دارد. به همین دلیل برای استقرار کشت سوسپانسیون سلولی موفق در این گیاه لازم است به‌طور میانگین ۱۰ روز پس از کشت سلولی در این گیاه واکشت انجام شود.

با توجه به ظرفیت ژنتیکی بالای بسیاری از گونه‌های وحشی و نژادهای محلی گیاهان دارویی در ایران و نیاز صنایع وابسته، در این راستا استفاده از تکنیک‌های وابسته به کشت بافت و بیوتکنولوژی به‌منظور ارتقاء صفات کمّی و کیفی و کاهش زمان اصلاح نباتات از اهمیت خاصی برخوردار است.

منابع مورد استفاده

- Ahmadi, J., Mohammadi, R., Garousi Gh. and Hosseini, R., 2012. Optimization of callus induction and cell suspension in *Catharanthus roseus*. Journal of Agricultural Biotechnology, 4(1): 1-18.
- Ahmadi, Sh., Sefidkon, F., Babakhanlo, P., Asgari, F., Khademi, K. and Karimifar, M.A., 2009. Comparing essential oil composition of *Satureja bachtiarica* Bunge before and full flowering stages in field and provenance. Iranian Journal Medicinal and Aromatic Plants, 25(2): 159-169.
- Baser, K.H.C., Ozek, T., Kirimer, N. and Tumen, G., 2004. A comparative study of the essential oil of wild and cultivated *Satureja hortensis* L. Journal of Essential Oil Research, 16(5): 422- 424.
- EL-Gazzar, A. and Watson, L., 1970. A taxonomic study of Labiatae and related genera. New Phytologist, 69: 451-486.
- Hadian, J., Tabatabaei, S.M.F., Naghavi, M.R., Jamzad, Z. and Ramak-Masoumi, T., 2008. Gentic diversity of Iranian accessions of *Satureja hortensis* L. based on horticultural traits and RAPD markers. Scientia Horticultuare, 115: 196-202.
- Hakkim, F.L., kalyani, S., Essa, M., Girija, S. and Song, H., 2011. Somatic embryogenesis, embyogenic cell suspension from *Ocimum sanctum* L. leaf callus cultures and their rosmarinic acid accumulation. International Journal of Biological & Medical Research, 2(4): 1064-1069.
- Lee, E., Mobin, M., Hahn, E.J. and Paek, K.Y., 2006. Effects of sucrose, inoculum density, auxins, and aeration volume on cell growth of *Gymnema sylvestre*. Journal of Plant Biology, 49: 427-431.
- Motaghinia, T., 2013. Effect of explant, medium and plant growth regulators on induction rate of *Satureja hortensis* L. M.Sc. Thesis, Faculty of Science, Mashhad University.
- Mulabagal, V. and Tsay, H.S., 2004. Plant cell cultures an alternative and efficient source for the production of biologically important secondary metabolites. International Journal of Applied Science Engineering, 2: 29-48.
- Murashige, T. and Skoog, F., 1962. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco cultures. Physiologia Plantarum, 15: 473-497.
- Omidi, M. and Farzin, N., 2012. Biotechnology approaches for improvement of medicinal plants. Modern Genetics Journal, 30(7): 209-220.
- Razeghi, L., Azizi, M., Ziaratnia, S.M., Bagheri, A.R. and Nemati, S.H., 2015. Impact of hormonal combination on callus induction of *Kelussia odoratissimia* Mozaff. and evaluating its growth in broth. Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants, 30(6): 943-953.
- Sahraroo, A., Babalar, M., Mirjalili, M.H., Fattahi-Moghaddam, M.R. and Nejad-Ebrahimi, S., 2014. *In vitro* callus induction and rosmarinic acid quantification in callus culture of *Satureja khuzistanica* Jamzad (Lamiaceae). Iranian Journal of Pharmaceutical Research, 13(4): 1447-1456.
- 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.
- Sefidkon, F., Jamzad, Z. and Mirza, M., 2004. Chemical variation in the essential oil of *Satureja sahandica* from Iran. Food chemistry, 88: 325-328.
- Sefidkon, F., Sadeghzadeh, L., Teimouri, M., Asgari, F. and Ahmadi, Sh., 2007. Antimicrobial effects of the essential oils of two *Satureja* species (*S. khuzistanica* Jamzad and *S. bachtiarica* Bunge) in two harvesting time. Iranian Journal Medicinal and Aromatic Plants, 23(2): 174-182.

Effect of explant origin and different concentrations of growth regulators on optimization of cell suspension in *Satureja bachtiarica* L.

L. Elyasi[1], A.A. Mehrabi[2], M. Seyedi[3] and Z. Safari[4*]

1- M.Sc. of Plant Breeding, Department of Agronomy and Plant Breeding, Faculty of Agriculture, Ilam University, Iran
2- Department of Agronomy and Plant Breeding, Faculty of Agriculture, Ilam University, Ilam, Iran
3- Department of Horticultural Sciences, Faculty of Agriculture, Ilam University, Ilam, Iran
4*- Corresponding author, Ph.D Student, Department of Agronomy and Plant Breeding, Faculty of Agriculture, Ilam University, Ilam, Iran, E-mail: zsafari_89@yahoo.com

Received: July 2015 Revised: March 2016 Accepted: April 2016

Abstract

Satureja bachtiarica L., belonging to the Lamiaceae family, is rich in essential oils, used for various purposes including pharmaceutical, food, and health applications. *In vitro* culture of *Satureja,* in order to callus induction and optimization of cell suspension, provides rapid production and easy extraction of secondary metabolites. In the present study, callus induction was conducted by using different explants and concentrations of growth regulators. The most suitable calli were selected to induce suspension cultures and were transferred to liquid media supplemented with different combination of BAP and NAA. The experiment was performed in a factorial completely randomized design by using three replications. The cell biomass (cell number) was examined on different days. The mean comparison results for the explant origin showed that the internode explant produced the highest cell number. In addition, evaluation of interaction of explants with media showed that the maximum cell biomass was obtained by internode explant and the medium containing 2mg.L^{-1} NAA plus 0.5mg.L^{-1} BAP in the fifth day. On the other hand, study of growth process and cell proliferation during the days after the establishment of suspension cultures, also revealed that this hormonal composition had the highest utility to generate the maximum number of cells in all explants tested.

Keywords: Callus induction, cell biomass, *Satureja bachtiarica* L., suspension, BAP, NAA.