فصل‌نامه داروهای گیاهی

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

بهینه سازی کالوس زایی و کشت سوسپانسیون سلولی گیاه دارویی پروانش

زیبا فولادوند[۱،۲*]، بهمن فاضلی نسب[۲]، رضا دریکوند[۳]، عبدالله قاسمی‌پیربلوطی[۴]

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

* *مسئول مکاتبات* **E-mail: (Zibafooladvand83@gmail.com or Zfooladvand92@uoz.ac.ir)**

۲. *پژوهشکده زیست‌فناوری 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 دام‌پزشکی سنتی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد، شهرکرد، ایران؛*

شناسه مقاله

تاریخ دریافت مقاله: ۹۲/۱۰/۱۳

تاریخ پذیرش مقاله: ۹۳/۱/۱۴

نوع مقاله: علمی - پژوهشی

موضوع: بیوتکنولوژی

کلید *واژگان* :

- ✓ *کالوس*
- ✓ *سوسپانسیون*
- ✓ *برگ*
- ✓ *ساقه*
- ✓ *تنظیم‌کننده‌های رشد*

چکیده

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 سرطان‌ها بکار می‌روند. در این پژوهش، هدف تعیین ترکیب هورمونی برای تولید کالوس و سوسپانسیون سلولی می‌باشد.

روش تحقیق: آزمایش کالوس زایی در قالب طرح فاکتوریل با سه عامل، ریز نمونه و سطوح هورمون‌های BAP و 2, 4-D 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 (KN، BAP و 2, 4-D) در سه تکرار استفاده شد

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، به‌طوری‌که تیمار سوم بالاترین تولید بیوماس را داراست.

توصیه کاربردی/ صنعتی: در این پژوهش با توجه به نتایج به‌دست‌آمده می‌توان در تولید انبوه این گیاه دارویی در شرایط درون شیشه‌ای از میزان۲/۵ 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

پروانش یکی از گیاهان تیره خرزهره می‌باشد که به دلیل وجود ترکیبات دارویی و آلکالوئیدها موردتوجه قرارگرفته است. در این میان وین‌کریستین و وین‌بلاستین 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.*, 2001; Verpoorte *et al.*, 2000). به‌طوری‌که استفاده از روش‌های کشت درون شیشه‌ای پروانش، کالوس، سوسپانسیون سلولی، گیاهچه و ریشه‌های تراریخت در بیوراکتورها توصیه‌شده 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.*, 2000; Senoussi *et al.*, 2009)؛ 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، کاینتین و ۳- ایندول استیک اسید کشت شدند و محیط MS حاوی NAA و KN[1] 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 5 ماه واکشت و نگهداری شدند و از آن‌ها جهت تهیه سوسپانسیون سلولی با همان ترکیب هورمونی استفاده شد (Xu & Dong, 2005).

در آزمایشی با کشت ریز نمونه‌های برگ و ریشه پروانش در محیط گامبورگ حاوی تنظیم‌کننده‌های 2,4-D[2] و6- بنزیل آمینوپورین کالوس های متراکم تولید شد. این کالوس ها به محیط سوسپانسیون حاوی تنظیم‌کننده‌های2,4-D و BAP[3] منتقل شدند، سلول‌های سوسپانسیون برای بررسی‌های سلول‌شناسی استفاده شدند. بررسی‌ها نشان داد که شکل سلول‌های جداشده از کالوس های 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 لیترD-4 ,2 کالوس و سپس سوسپانسیون تولید شد (Lee *et al.*, 2006).

۲. مواد و روش ها

این آزمایش در آزمایشگاه گروه بیوتکنولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد خرم آباد 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

1. kinetin

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

برای بررسی تولید کالوس، در محیط کشت پایه (Murashigo & Skoog. 1962) MS تنظیم‌کننده‌های رشد و ساکارز با غلظت ۳۰ گرم در لیتر به‌عنوان 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)، تنظیم‌کننده‌های 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 نمونه‌ها در پتری دیش‌ها، دمای ۲۶ درجه سانتی‌گراد، 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 نرم‌افزار SAS مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

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

شماره تیمار	نوع ریزنمونه	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.

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 میلی‌لیتر 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 سانتی‌گراد قرار گرفتند و بازکشت هر ۱۴ روز انجام شد. در این آزمایش صفات تعداد سلول در هر میلی‌لیتر محیط کشت و وزن خشک سلول‌ها برای هر تیمار سوسپانسیونی اندازه‌گیری شد.

۲-۲-۱. شمارش سلول‌ها در کشت سوسپانسیون سلولی: به‌منظور شمارش سلول‌ها و تک‌سلول کردن توده‌ها با استفاده از روش آنزیمی، ۱ درصد سلولاز و ۰/۱ درصد پکتیناز به یک میلی‌لیتر از سوسپانسیون اضافه شد. سپس این مخلوط به مدت ۲۰ دقیقه در ۵۰۰ دور در دقیقه جهت سرعت دادن به تأثیر آنزیم‌ها سانتریفیوژ شد و با لام هموسیتومتر تعداد سلول‌ها شمارش شدند.

۲-۲-۲. اندازه‌گیری وزن خشک سلول‌ها در کشت سوسپانسیون سلولی: برای اندازه‌گیری وزن خشک سلول‌ها، سوسپانسیون با سرعت ۵۰۰ دور در دقیقه به مدت ۵ دقیقه سانتریفوژ و مایع رویی از سلول‌ها جدا شد. سلول‌ها برای خارج شدن آب اضافی آن‌ها بر روی کاغذ صافی قرار گرفتند. سپس نمونه‌ها در آون با دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت خشک‌شده و وزن خشک توده سلولی اندازه‌گیری شد.

۳. نتایج و بحث

بر اساس نوع ریز نمونه‌های استفاده‌شده در طرح، تفاوت معنی‌داری 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 هورمون‌ها با آزمون دانکن هم در سطح ۰/۰۵ و هم در سطح ۰/۰۱ در صد معنی‌دار 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 معنی‌دار، عامل b (هورمون BAP) در سطح ۱و ۵ درصد معنی‌دار 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 نوع سه	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(عاملa) 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-31	1.972152E-31	0.00	1

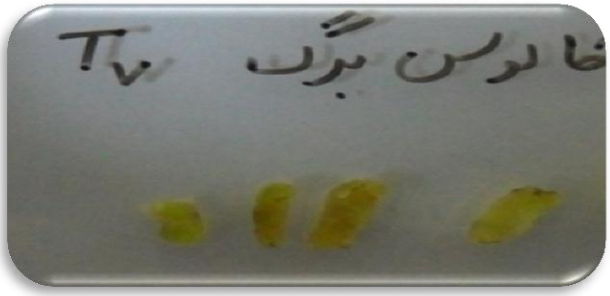
با توجه به نتایج جدول تجزیه واریانس (۴)، در ریز نمونه برگ بهترین ترکیب از هورمون‌ها، ۲/۵ میلی‌گرم از هورمون توفوردی (a_2) و ۲ میلی‌گرم از هورمون BAP (b_3) است. در تیمارهای حاوی غلظت‌های ۵ میلی‌گرم در لیتر هورمون توفوردی با افزایش غلظت BAP مقدار کالوس زایی کاهش یافته است، ممکن است دلیل این امر توانایی بالای هورمون توفوردی در تولید کالوس باشد که باعث می‌شود نقش هورمون BAP در تولید کالوس کم شده و در اثر افزایش فشار هورمونی غیرضروری 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 می‌دهد که افزایش سطح هورمون BAP در برابر سطح پایین‌تر از هورمون توفوردی یعنی ۲/۵ میلی‌گرم دارای میزان کالوس زایی بالاتری است، شکل ۱ نیز تأییدکننده این مطلب است. در تیمار شمارهٔ ۷، کالوس زایی با بالاترین قدرت در بین تمام تیمارها، در ریز نمونه برگ انجام‌شده است. کالوسهای تولیدشده دارای رنگ سبز و شفاف هستند (شکل ۱). در تیمار شمارهٔ ۸، در این تیمار نیز کالوس زایی با قدرت خوبی انجام‌شده است ولی میزان کالوس زایی نسبت به تیمار شمارهٔ ۷ در کالوس ساقه با شدت پایین‌تری صورت گرفته است (شکل ۲). در ریز نمونه ساقه از روی نتایج جدول تجزیه واریانس با آزمون دانکن مشاهده می‌شود که عامل a یعنی هورمون توفوردی و عامل b یعنی هورمون BAP در سطح ۰/۰۵ درصد معنی‌دارند (هر دو عامل در ۱ درصد معنی‌دار نیستند)؛ بنابراین فقط می‌توان گفت که با توجه به مقایسه میانگین و p-value ها، میزان ۲/۵ میلی‌گرم از هورمون توفوردی (a_2) و ۲ میلی‌گرم از هورمون BAP (b_3) بهترین بوده‌اند؛ اما بین میزان ۰/۵، ۱ و ۴ میلی‌گرم BAP تفاوت معنی‌داری در سطح ۵ درصد مشاهده نشد.

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

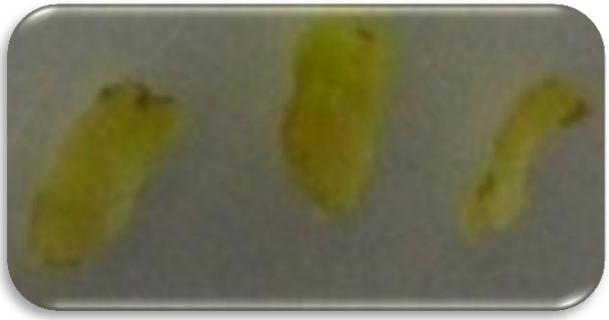
منبع تغییرات	درجه آزادی	مجموع مربعات نوع سه	میانگین مربعات	ارزش F	Pr > F
a	1	2.25	2.25	6	0.04
b	3	6	2	5.33	0.026
a*b	3	2.75	0.9167	2.44	0.1388

در ریز نمونه‌های مربوط به ساقه روند مربوط به کاهش کالوس زایی با افزایش 2, 4-D نیز مشاهده‌شده است ولی این روند نسبت به برگ محسوس‌تر است، چون خود ساقه‌ها منابع تولید اکسین هستند و وجود مقادیر زیادی از این هورمون در محیط کشت همان اثر بیشتر 2, 4-D را در برابر BAP تشدید می‌کند و مانع از کالوس زایی در ریز نمونه‌های ساقه می‌شود و این می‌تواند دلیلی بر نبود اثر متقابل بین این دو هورمون نسبت به ریز نمونه برگ باشد، کالوسهای تولیدشده در تیمار ۴ در مقایسه با تیمارهای ۷ و ۸، (شکل ۳) تأییدی بر این مطلب است.

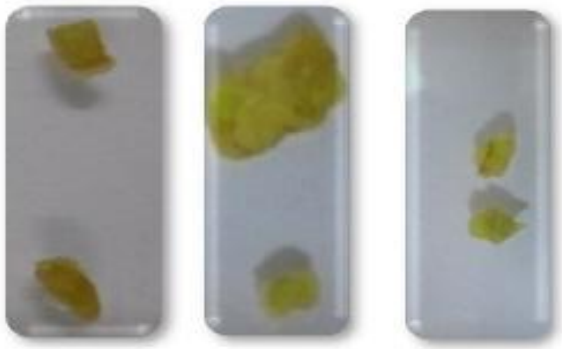
در آزمایشی با کشت ریز نمونه‌های برگ و ریشه پروانش در محیط گامبورگ حاوی تنظیم‌کننده‌های 2,4-D وBAP کالوس های متراکم تولید شد. این کالوس ها به محیط سوسپانسیون منتقل شدند (Dutta *et al*., 2007) که نتایج حاصل از این آزمایش تأیید دیگری بر انتخاب صحیح تنظیم‌کننده‌های رشد در این طرح است.



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



شکل ۲. نمونه کالوسهای تولید شده در تیمار شمارهٔ 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.*, 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 اکسین ها، 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 ازنظر کالوس زایی در تکرارهای مربوط به هر تیمار ایجاد کرده است. بطوریکه در پتری دیش‌های کشت‌شده که در محیط کشت آن‌ها از اسید آسکوربیک استفاده‌شده 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. کالوس های

تولیدشده به مدت 5 ماه واکشت 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 حضور2, 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، میزان۲/۵ 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 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

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.