سومین همایش ملی
پژوهش های محیط زیست وکشاورزی ایران
۲۲ مرداد ۱۳۹۴

بررسی اثر کلشیسین بر برخی صفات در کشت سلولی فندق

(*Corylus avellana L.*)

هدیه علیخانی[۱]، علاء الدین کردنائیج[۲]، ایت الله رضایی[۳]، نرگس علیرحیمی[۴]

[۱و۴] دانشجوی کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی کشاورزی دانشگاه شاهد — پست الکترونیکی: *hediehalikhani@yahoo.com*

[۲] استادیار گروه بیوتکنولوژی کشاورزی دانشگاه شاهد — پست الکترونیکی: *a_kordenaeej@yahoo.com*

[۳] استادیار گروه بیوتکنولوژی کشاورزی دانشگاه شاهد — پست الکترونیکی: *ayarezaei@gmail.com*

چکیده

امروزه کشت سلول گیاهی به عنوان یکی از منابع جایگزین و تجدید پذیر برای تولید متابولیت های ثانویه شناخته شده است. تولید متابولیت ثانویه با خصوصیات دارویی از طریق کشت سلولی در شرایط آزمایشگاهی، فواید زیادی در مقایسه با استخراج این ترکیبات از گیاهان، تحت شرایط طبیعی دارد. کنترل دقیق پارامترهای مختلف، سبب می شود که کیفیت مواد حاصل در طول زمان تغییر نکند. از طرفی فندق با توجه به خواص فراوان اثبات شده آن از دیرباز یکی از گیاهان مهم در زمینه مطالعات صورت گرفته است. اهمیت فراوان خوراکی و دارویی و اقتصادی این گیاه لزوم تحقیق بر روی روش های افزایش کارایی این گیاه را سبب می شود. از این رو این تحقیق با هدف بررسی اثر تیمارهای کلشیسین بر برخی صفات و تولید متابولیت های تولید شده در کشت بافت این گیاه صورت گرفت. این متابولیت ها شامل پروتئین، انتوسیانین و قند محلول بود. آزمایش به صورت طرح کاملا تصادفی با ۴ غلظت کلشیسین در سه زمان و با سه تکرار انجام شد. نتایج نشان داد که این تیمارها اثر معنی داری بر صفات و میزان تولید متابولیت های اندازه گیری شده نشان داد به طوری که می توان با اعمال زمان ۲۴ ساعت تیمار کلشیسین بیشترین میزان وزن تر و خشک را به دست آورد. همچنین با اعمال تیمار ۰.۰۵ درصد کلشیسین بیشترین میزان پروتئین نسبت به سایر تیمارها ایجاد کرد در حالی که تیمار زمان اثر معنی داری بر آن نداشت. در مورد صفت میزان قند محلول نیز تیمار ۶ و ۲۴ ساعت سبب ایجاد میزان تولید بالا شد.

کلمات کلیدی: فندق، متابولیت های ثانویه، کلشیسین، کشت سلولی، پروتئین، وزن خشک و تر

مقدمه

فندق (*Corylus avellana* L.)، گیاه یک پایه و یک جنسی از خانواده *Betulaceae* و از جنس *Corylus* می باشد. این جنس دارای ۲۵ گونه بوده و گونه ها از نظر اقتصادی و استفاده در به نژادی اهمیت به سزایی دارند. بیشتر کارشناسان فندق جهان بر این عقیده اتفاق نظر دارند که فندق نبایستی به عنوان یک گیاه پوششی به حساب آید و بایستی برای اصلاح و به نژادی آن برنامه های بلند مدت و کوتاه مدت تدوین شود (*Mehlenbucher 2000:164*). فندق اهمیت فراوانی از نظر دارویی و غذایی دارد به طوری که دارای ۷۰-۶۸٪ روغن و ۲۰-۱۷٪ پروتئین و مقادیر متنابهی ویتامین A , B, C می باشد. از مغز آن در شیرینی و شکلات سازی استفاده می کنند و چربی موجود در ترکیبات فندق به‌راحتی هضم می شود و از روغن آن در طب و لوازم آرایشی و از چوب آن در مبل سازی و دکوراسیون و از پوسته سخت جهت ایجاد حرارت در گلخانه ها استفاده می شود (*Thompson 1996:173*). فندق در بیش از ۲۰ کشور جهان کشت و کار می شود و دامنه گستره فندق به حوزه‌های آبی بزرگ مانند دریای سیاه، خزر، مدیترانه، اقیانوس آرام محدود می شود. از مراکز اصلی تولید آن می توان به ترکیه، ایتالیا، اسپانیا، امریکا، روسیه، ایران و جمهوری آذربایجان اشاره نمود. کشور ایران با توجه به تنوع آب و هوایی می تواند به یکی از کشورهای تولید کننده عمده فندق تبدیل شود. در ایران استان های گیلان، اردبیل، قزوین، گرگان، مازندران و قم از مناطقی فندق‌کاری محسوب می شوند(*Rahemi 2000:375*).

تکثیر گیاهان در شرایط آزمایشگاهی روشی بسیار مفید جهت تولید ترکیبات گیاهی با کیفیت است. تولید و توسعه مؤثر جنین های سوماتیکی، پیش نیازی برای تولید گیاهان در به عنوان *in vitro* سطح تجاری است. همچنین تکنیک های این روش ابزار نیرومندی برای حفاظت ژرم پلاسم و تولید انبوه بسیاری از گونه های گیاهی در معرض تهدید ارائه شده اند. (*Tejavathi 1999:450*) برای تحقیقات بیشتر روی ترکیبات بیوشیمیایی و ارزش های دارویی بالقوه، سیستم باززایی درون شیشه ای برای تولید گیاهان مورد نیاز است زیرا گیاهانی که در مزرعه رشد می کنند در معرض هجوم فصلی باکتری ها و قارچ ها و همچنین آلودگی های محیطی هستند که می تواند ارزش دارویی بافت های برداشت شده را تحت تأثیر قرار دهد (*Geng 200:303*). ترکیبات مفید کشت های سلول گیاهی غالباً متابولیت های ثانویه هستند که معمولاً به مقدار بسیار کم در سلول های گیاهی تیمار نشده تجمع می یابند. تجمع متابولیت های ثانویه در گیاهان بخشی از پاسخ های دفاعی در برابر حملات پاتوژنی می باشد که

توسط الیسیتورها القا و فعال می شوند. بنابراین تیمار سلول های گیاهی با الیسیتورهای زیستی و غیر زیستی یکی از استراتژی های سودمند برای افزایش تولید متابولیت های ثانویه در کشت سلول گیاهی می باشد *(Dornenburg 1995:680)*.

در کشت سلولی وقتی سلول های جدید در محیط سوسپانسیون تشکیل می شوند به صورت پراکنده یا توده هایی درمی آیند. این سلول ها سرعت تقسیم سلولی بیشتری نسبت به سلول های کالوس نشان می دهند. به این دلیل سوسپانسیون سلولی در شرایطی که تقسیم سلولی سریع و نسل های سلولی پرجمعیت نیاز باشد کاربرد داد (*Philips et al. 1995:75*). تولید متابولیت های ثانویه در گیاهان از طریق کشت سلولی و سوسپانسیونی یکی از زمینه هایی است که در سال های اخیر به دلیل دارا بودن ارزش اقتصادی بالای این ترکیبات و یا هزینه بالای فراوری ترکیبات، به صورت گسترده مورد استفاده قرار گرفته است (*Sato et al. 2001:370*). همچنین کشت سلولی برای تولید متابولیت های با ارزش در محیطی کنترل شده و مستقل از تغییرات آب و هوایی سودمند است (*Verpoarte et al. 1991*).

کلشیسین

کلشیسین یک ترکیب آلکالوئیدی است که از غده‌های گل حسرت پاییزه (*Colchicum autumnale*) برای اولین بار در سال ۱۸۸۳ استخراج شد. این ترکیب دارای ساختار شیمیایی سه حلقه‌ای با فرمول $C_{22}H_{25}O_6N$ می‌باشد. این ترکیب مانع از تشکیل دوک تقسیم در هنگام تقسیم سلولی شده، کروموزوم‌ها را در مرحله متافاز متوقف می‌کند و مانع وقوع آنافاز شده، در نتیجه منجر به دو برابر شدن تعداد کروموزوم‌ها در سلول می‌شود. تیمار کلشیسین یکی از رایج‌ترین روش‌هایی است که اغلب برای القای پلی-پلوئیدی و در نتیجه تغییر تابولیت های حاصل از این تغییر در گیاهان از آن استفاده می‌شود و نسبت به مواد جهش‌زای دیگر تغییرات مورفولوژیک بیشتر و کثرت موتاسیون بالاتری ایجاد می‌کند (*Pickens, 2004:2429*). از این رو از این ماده در جهت القای تغییرات ژنی و در نتیجه تغییر متابولیت های حاصل از این تغییرات بدون ایجاد مرگ سلولی و یا تغییر کیفیت متابولیت های حاصل استفاده می شود.

مواد و روش ها

القای تولید کالوس و راه اندازی کشت سلولی:

به منظور کشت تعلیقی از کالوس‌های تحقیق رضایی و همکاران *(2011)* در مهر ۱۳۹۲ استفاده گردید. سپس کالوس های مورد نظر هر ۲ هفته یک بار واکشت گردیدند. برای تهیه کشت تعلیقی حدود ۲ گرم کالوس نرم و سفید و فاقد آلودگی در زیر هود لامینار به ۵۰ میلی لیتر محیط کشت *MS* با ترکیبات هورمونی ۴،۲ - دی کلروفنوکسی استیک اسید و بنزیل آدنین به ترتیب با غلظت های ۰.۱ و ۰.۵ میلی گرم در لیتر و بدون آگار اضافه شد و با سرعت ۱۲۰ دور در دقیقه در دمای ۲۵ درجه سانتیگراد در تاریکی روی شیکر نگهداری شده و هر 2 هفته یک بار واکشت گردیدند. پس از رشد کافی کالوس ها برای انجام آزمایشات از غلظت

های مختلف کلشیسین استفاده گردید. جهت آماده شدن سلول ها برای انجام تیمار، کالوس ها طی چندین نسل و هر دو هفته یک بار واکشت شدند تا این که سوسپانسیونی از سلول های یک دست و بدون توده به وجود آمد.
برای تیمار نمونه ها، سلول ها در معرض غلظت های ۰ و ۰/۰۵ درصد، ۰/۱ درصد و ۰/۲ درصد کلشیسین قرار گرفتند. به این صورت که به ترتیب ۱/۵، ۳ و ۶ میلی لیتر از محلول کلشیسین در سه زمان مختلف ۶ ، ۱۲ و ۲۴ ساعت به ارلن های جداگانه اضافه گردید. سلول های تیمار شده درون محیط کشت MS با ترکیبات ذکر شده قرار گرفتند. برای جداسازی سلول های تحت اثر کلشیسین پس از گذشت زمان مورد نظر(۶ و ۱۲و ۲۴ ساعت) به کمک نایلون مش $2\mu m$، پمپ خلاء و قیف بیرمن سلول های تحت تیمار را در زیر هود لامینار جداسازی کرده و مقدار ۲/۵ گرم از هرتیمار به ۳ ارلن جداگانه که حاوی ۳۰ میلی لیتر محیط کشت MS جدید بودند اضافه شد (برای هر زمان ۳ تکرار).. بدین ترتیب سه زمان مختلف و ۴ غلظت مختلف اعمال شد که همگی در سه ارلن جداگانه تکرار شدند که در مجموع ۳۶ نمونه وجود داشت که همگی نمونه ها بر روی شیکر و در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد و با سرعت ۱۲۰ دور در دقیقه در تاریکی به منظور رشد کافی سلول ها و انجام بررسی های بعدی نگه داشته شدند.
پس از رشد کافی سلول ها به مدت ۲ هفته درون شیکر، بررسی های لازم جهت تعیین پارامترهای مختلف انجام گرفت. بدین منظور سلول های هر نمونه توسط نایلون مش و قیف بیرمن و پمپ خلاء جداسازی شدند و از محیط کشت خارج شده و درون فویل آلومینیومی قرار گرفتند و اندازه گیری ها بر روی سلول های جدا شده از محیط کشت صورت گرفت.

اندازه گیری وزن تر و وزن خشک

رشد سلولی با اندازه گیری افزایش در وزن تر سلول ها تعیین شد. بدین منظور سلول ها توسط نایلون مش ($2\mu m$)و پمپ خلا از محیط کشت جدا شدند و برای تعیین وزن تر بلافاصله توزین شدند. به منظور اندازه گیری وزن خشک سلول ها مقدار ۱ گرم از سلول های تر را در ظرفی درون آون به مدت ۲۴ ساعت قرار داده و سپس وزن ۱ گرم سلول های خشک شده توزین گردید و با تناسب بندی وزن خشک کل سلول های مربوط به هر تیمار محاسبه گردید.
سلول هایی توزین شده ی تر درون فویل آلومینیومی قرار داده شد و توسط نیتروژن مایع منجمد گردید و جهت انجام آزمایش های فیزیولوژی در دمای ۸۰- نگه داری شدند. جهت اندازه گیری متابولیت های مورد نظر در هر اندازه گیری سلول ها از فریزر ۸۰- بیرون آورده می شدند و درون یخ گذاشته و پس از جداسازی مقدار لازم ازسلول ها باقی مانده سلول ها به فریزر ۸۰- انتقال داده شدند. زمان نگه داری سلول ها در دمای ۸۰- در حدود ۶ ماه بود.

اندازه گیری پروتئین

غلظت پروتئین نمونه ها به روش برادفورد (۱۹۷۶) تعیین شد. برای تعیین غلظت پروتئین ها از هر نمونه به مقدار ۰/۲ گرم از سلول ها توزین شد و به سلول ها ۳میلی لیتر بافر فسفات افزوده و درون هاون به خوبی سائیده شد که در مجموع ۳۰ نمونه حاصل گردید. سپس ۱.۵ میلی لیتر از هر نمونه سانتریوفیوژ ($۱۲۰۰۰rpm$، به مدت ۱۵ دقیقه) شد. پس از آن به ۰.۱ میلی لیتر از عصاره

سانتریوفیوژ شده مقدار ۱میلی لیتر از محلول برادفورد اضافه شد و پس از ورتکس کردن نمونه ها و ماندن به مدت حداقل ۵ دقیقه در دمای اتاق، مقدار جذب آنها در طول موج $595nm$ توسط اسپکتروفتومتر سنجیده شد، سپس با استفاده از نمودار استاندارد آلبومین سرم گاوی غلظت پروتئین نمونه ها به‌دست آمد.

نتایج و بحث

وزن خشک

با توجه به جدول (۱) تیمار غلظت های مختلف کلشیسین تفاوت معنی داری بر وزن خشک ایجاد نکرده است. با توجه به جدول (۳) نیز بیشترین میان وزن خشک مربوط به تیمار۰.۱٪ کلشیسین بود درحالی که این یزان با سایر تیمارها تفاوت معنی دار نداشت. نتایج نشان داد که زمان های مختلف اعمال تیمار در سطح ۱ درصد تفاوت معنی داری ایجاد کرده است (جدول ۱). به گونه ای که تیمار ۲۴ ساعت سبب با سایر تیمارها تفاوت معنی دار نشان دادو در این زمان بیشترین میزان را داشت (جدول۲). اثر متقابل غلظت های کلشیسین و زمان نیز سبب ایجاد تفاوت معنی داری بر این صفت نشد (جدول۱).

جدول (۱) تجزیه واریانس صفات مختلف دونالیلا در سطوح مختلف غلظت کلشیسین و زمان

منابع تغییرات	درجه آزادی	وزن خشک	وزن تر	آنتوسیانین	پروتئین	قندمحلول
غلظت کلشیسین	3	0.0006ns	3.51*	0.0004ns	0.0010**	0.165ns
زمان	2	0.0044*	8.07**	0.0034*	0.0062ns	0.781**
غلظت کلشیسین× زمان	6	0.0027ns	2.6*	0.0012ns	0.0026*	0.227*
خطا	22	0.0023	4.09	0.0012	0.0019	0.089
Cv		12.05	16.56	75.52	31.49	24.6

ns، * و ** به ترتیب نشان دهنده عدم همبستگی وهمبستگی در سطح ۵٪ و ۱٪ بین صفات مورد ارزیابی می باشد.

جدول (۲) مقایسه میانگین صفات در تیمارهای مختلف زمان

زمان	وزن خشک	وزن تر	آنتوسیانین	پروتئین	قند محلول
6ساعت	0.3666b	11.31b	0.0503ab	0.1504a	1.159a
12 ساعت	0.3895b	11.98b	0.0633a	0.1064a	0.9496b
24 ساعت	0.5212a	14.11a	0.029b	0.1141a	1.2297a

میانگین ها با حروف مشابه درهرستون فاقد تفاوت آماری براساس آزمون دانکن در سطح ۵٪ هستند.

جدول (3) مقایسه میانگین صفات در غلظت های مختلف کلشیسین

غلظت کلشیسین	وزن خشک	وزن تر	آنتوسیانین	پروتئین	قندمحلول
%0	0.3879a	11.04b	0.381a	0.1492b	1.21a
%0.05	0.3933a	11.55b	0.496a	0.198a	1.29a
%0.1	0.4249a	13.98a	0.486a	0.1386b	1.1a
%0.2	0.4061a	12.73ab	0.547a	0.1256ab	1.05a

میانگین ها با حروف مشابه درهرستون فاقد تفاوت آماری براساس آزمون دانکن در سطح ۵٪ هستند.

وزن تر

نتایج حاصل از آزمون نشان داد که اعمال غلظت های مختلف کلشیسین سبب ایجاد تفاوت معنی دار در سطح ۵ درصد شد (جدول ۱). به طوری که بیشترین میزان آن مربوط به تیمار ۰.۱ درصد بوده و این تیمار با تیمار های شاهد و ۰.۰۵ درصد تفاوت معنی دار داشته اما با تیمار ۰.۲ ساعت تفاوت معنی دار ندارد (جدول۳). همچنین تیمار زمان های مختلف نیز سبب ایجاد تفاوت معنی دار در سطح ۵ درصد گردید (جدول۱). به گونه ای که تیمار ۲۴ ساعت سبب بیشترین میزان وزن تر شده و بیشترین میزان

آن را به خود اختصاص می دهد همچنین این تیمار با سایر تیمارها تفاوت معنی دار دارد (جدول۲). همچنین اثر متقابل تیمار زمان و غلظت های مختلف کلشیسین سبب ایجاد تفاوت معنی دار این فت در سطح ۵ درصد گردید (جدول ۱).

آنتوسیانین

نتایج نشان داد که تیمار غلظت های مختلف کلشیسین سبب ایجاد تفاوت معنی دار در میزان آنتوسیانین تولید شده نداشت (جدول ۱ و ۳). در حالی که تیمار زمان های مختلف اعمال کلشیسین سبب تفاوت معنی دار این صفت در سطح ۵ درصد گردید (جدول ۱). به این صورت که بیشترین میزان تولید آن در زمان ۱۲ ساعت بوده و میزان آن با تیمار ۲۴ ساعت تفاوت معنی دار دارد اما با تیمار ۶ ساعت تفاوتی مشاهده نمی شود (جدول ۲). همچنین اثر متقابل زمان و غلظت کلشیسین نیز سبب ایجاد تفاوت معنی دار این صفت نشد (جدول ۱).

پروتئین

نتایج حاصل از آنالیز داده ها نشان می دهند که تیمار غلظت های مختلف کلشیسین سبب ایجاد تفاوت معنی دار بر میزان تولید پروتیین در سطح ۱ درصد گردید (جدول۱). به گونه ای که بیشترین میزان پروتئین تولیدی مربوط به غلظت ۰.۰۵ درصد بوده و این غلظت با غلظت ۰.۲ درصد تفاوت معنی داری نداشت در حالی که با سایر غلظت ها تفاوت معنی دار نشان داد (جدول ۳). این در حالی است که نتایج نشان می دهد که تیمار زمان اثر معنی داری بر میزان پروتئین تولید شده نداشت (جدول ۱ و ۲). اثر متقابل تیمارهای زمان و غلظت های کلشیسین نیز سبب تفاوت معنی دار در میزان پروتئین تولیدی شد (جدول۱).

قند محلول

نتایج نشان داد که تیمار غلظت های مختلف کلشیسین سبب ایجاد تفاوت معنی دار در میزان قند محلول تولیدی نشد (جدول ۱ و ۳). تیمار زمان های مختلف سبب ایجاد تفاوت معنی دار در میزان قند محلول تولید شده در سطح ۱ درصد گردید (جدول۱). همچنین تیمار ۱۲ ساعت کمترین میزان تولید قند محلول شده است در حالی که بین تیمارهای ۶ ساعت و ۲۴ ساعت تفاوت معنی داری وجود ندارد (جدول۲). اثر متقابل زمان و غلظت های کلشیسین نیز سبب تفاوت معنی دار بر میزان تولید قند محلول شد (جدول۱).

نتیجه گیری

نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که اعمال تیمار کلشیسین در زمان های مختلف سبب تفاوت معنی دار در صفات مورد بررسی گردید. که از این موضوع می توان در جهت بهبود کارایی کشت سلولی فندق و استحصال این مواد استفاده کرد.

سپاسگزاری

از دکتر رضایی و همکاران بخش آزمایشگاه بیوتکنولوژی دانشکده علوم کشاورزی دانشگاه شاهد که ما را در این مطالعه همیاری نمودند کمال تشکر و قدردانی را داریم.

Refrence:

1. *Bradford, M, (1976), « A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding», Analytical Biochemistry 72: 248-254.*
2. *Dornenburg H, Knorr D, (1995), « Strategies for the improvement of secondary metabolite production in plant cell cultures», Enzyme Microbial Technol.17:674–684.*
3. *Geng, S, Ma, M, Ye, HC, Liu BY, and Cong, K, (2001), « Effect of ipt gene expression on the physiological and chemicalcharacteristics of Artemisia annua L», Plant Sci; 160: 691 –698.*
4. *Mehlenbucher, A, Erdogan, V, (2000), «Incompatibility in wild corylus», Acta Hort. 163-170.*
5. *Murch, J, KrishnaRaj, S, and Saxena, K, (2000), «Phytomaceuticals:Mass production, standardization and conservation», Sci. Rev. Alternative Med; 4: 39 - 43.*
6. *Phillips GC, Hubstenberger JF, Hansen EE (1995), « Plant regeneration by organogenesis from callus and cell suspension cultures», Plant Cell, Tissue and Organ Culture: 67-78.*
7. *Pickens, k, Borstad, G.C, Bryant, R, Abel, P, Scroggie, D, Harris, M, Alloway, J, (2004), «Colchicine for prophylaxis of acute flares when initiating allopurinol for chronic gouty arthritis», JRheumatol. Dec;31(12):2429-2432.*
8. *Rahemi, M, and Javadi, D, (2000), «Effect of pollen source on nut and kernel characteristics of hazelnut», Acta Hort. 556:371-376.*
9. *Rezaei, A, Ghanati, F, and Behmanesh, M, (2010), « Static magnetic field improved salicylic acid effect on taxol production in suspensioncultured hazel (Corylus avellana) cells», 6th International Workshop on Biological Effects of Electromagnetic Fields, Bodrum, Turkey.*
10. *sasson A, (1991), «production of useful biochemical by higher plant cell culture: biotechnological and economic aspects», Options mediterraneennes serie seminaire, 14:59-74*
11. *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*
12. *Tejavathi, D, and Shailaja, S, (1999), «Regeneration of plants fromthe cultures of Bacopamonnieri (L.) Pennell», Phytomorphol; 49 (4): 447 - 52.*
13. *Thompson, M, Lagerstedt, H, Mehlenbacher, A, (1996), «Hazelnuts», pp. 125-184. in Janick. And More J.N. (eds).Fruit breeding Vol:III Nuts. John wiley and sons, New york.*

14. *Verpoorte, R, der Heijden, R, Van Gulik, W, (1991), « Plant biotechnology for the production of alkaloids: Present status and prospects. In: Brossi A, (ed),The Alkaloids», Vol 40. New York: Academic Press.*
15. *Yokoyama, M, Inomata, S, (1998), « Catharanthus roseus (periwinkle): in vitro culture and high level production of Arbutine by biotransformation», Biotechnology in Agriculture and Forestry 41: 67-80.*