بهینه سازی کشت سوسپانسیون سلولی در گیاه دارویی همیشه بهار (*Calendula officinalis*)

اعظم رجبی[1*]، هدایت زکی زاده[2]، عبدا..حاتم زاده[3]، امیر صحرارو[4]

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد گروه علوم باغبانی دانشگاه گیلان. ۲- استادیار گروه علوم باغبانی دانشگاه گیلان. ۳- استاد گروه علوم باغبانی دانشگاه گیلان. ۴- استادیار گروه علوم باغبانی دانشگاه گیلان.

*نویسنده مسئول: Zakizadeh55@yahoo.com

چکیده

همیشه‌بهار (*Calendula officinalis*) یکی از مهمترین گیاهان زینتی و دارویی است که به دلیل تولید فلاونوئیدها، کارتنوئیدها، ساپونین‌ها و گلیکوزیدها اهمیت دارد، لذا آزمایش بهینه‌سازی کشت سوسپانسیون سلولی گیاه همیشه بهار با تنظیم کننده‌های رشد بنزیل آمینو پورین (BAP) و نفتالین استیک اسید (NAA) به منظور مشخص شدن طول یک دوره کشت سلولی و زمان شروع رشد تصاعدی سلول در این گیاه انجام شد. نتایج حاصل از اندازه‌گیری وزن تر، وزن خشک و درصد وزن خشک در زمان‌های ۴،۸،۱۲،۱۶،۲۰،۲۴،۲۸ روز پس از واکشت نشان داد که طول یک دوره رشد سلولی در همیشه بهار تقریبا ۲۸ روز است. و زمان شروع رشد و افزایش سلول‌ها از روز شانزدهم می‌باشدکه تعیین‌کننده زمان مناسب برای اضافه کردن الیستورها به کشت به منظور افزایش متابولیت‌های ثانویه می‌باشد.

کلمات کلیدی: دوره رشد، سوسپانسیون سلولی، الیسیتور

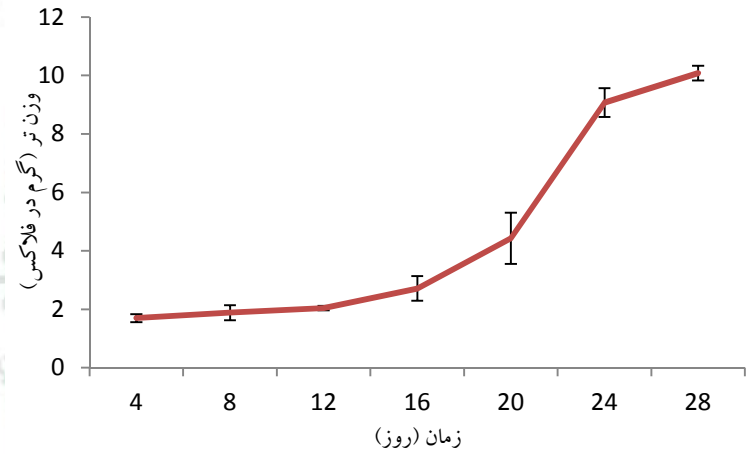
مقدمه

گل همیشه‌بهار با نام علمی *Calendula officinalis* متعلق به خانواده Asteracea است. مهمترین مواد موثره این گیاه را فلاونوئیدهای محلول در آب (۰/۴ تا ۰/۱ وزن گل خشک) تشکیل می‌دهند. از مواد دیگر می‌توان از کاروتنوئیدها (۳ ۰/۰ درصد وزن خشک گل) که در آب و چربی محلولند نام برد (امیدبیگی، ۱۳۸۸). گل‌های همیشه‌بهار دارای ترکیبات بسیاری از جمله ساپونین‌ها، فلاونوییدها وگلیکوزیدها هستند. با این‌حال برای بالا بردن عملکرد این ترکیبات در همیشه‌بهار باعث شده که مطالعات روی کشت بافت و سوسپانسیون این گیاه برای تولید متابولیت‌های ثانویه صورت پذیرد. این پژوهش با هدف مطالعه ویژگی‌های کشت سوسپانسیون سلولی همیشه‌بهار طراحی شد و اثر زمان بر فاکتورهای وزن تر (گرم در لیتر)، وزن خشک (گرم در لیتر) و درصد ماده خشک در آنها بررسی شد که با اندازه‌گیری این فاکتورها زمان لازم برای یک دوره رشد سوسپانسیون سلولی این گیاه و همچنین زمان شروع تقسیم سلولی و اضافه کردن الیسیتورها به سلول‌ها برای بالابردن درصد مواد موثره مشخص گردید.

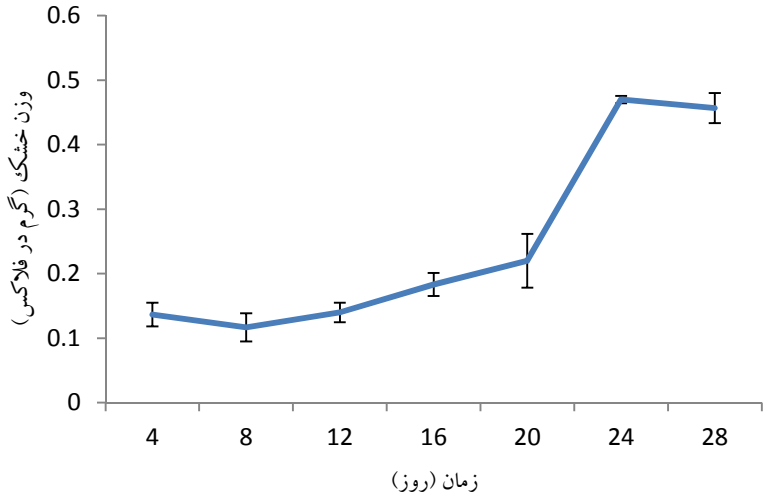
مواد و روش ها

این آزمایش در سال ۹۳ در آزمایشگاه کشت بافت دانشکده علوم کشاورزی دانشگاه گیلان انجام شد. برای کشت سوسپانسیون سلولی گیاه دارویی همیشه‌بهار، در ابتدا آزمایشی برای انتخاب بهترین تیمار در فاز کالوس زایی انجام گرفت. محیط کشت حاوی ۲ میلی‌گرم در لیتر NAA و ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP در مدت زمان یک ماه پس از کاشت بهترین شرایط موثر بر رشد کالوس معرفی گردیدند. در ادامه کار برای انتخاب محیط کشت سوسپانسیون سلولی گیاه همیشه بهار، از نتایج آزمایش نخست بهره گرفته شد. در همین خصوص محیط کشت مایع موراشیگ و اسکوگ (MS) حاوی تنظیم‌کننده‌های رشد ذکر شده تهیه گردید. در پایان محیط‌های آماده شده در ارلن‌های ۵۰۰ میلی‌لیتری توزیع شد (۱۰۰ میلی لیتر در هر ارلن) و درب‌های ارلن‌ها بصورت کامل با فویل آلومینیوم بسته‌شد. برای شروع کشت سوسپانسیون، مقدار ۵ گرم کالوس نرم در شرایط استریل توزین و در ارلن‌ها ریخته شد. ارلن‌های کشت شده در شرایط دمایی ۲۳ درجه سانتیگراد و تاریکی نگهداری شدند. به منظور هوادهی مناسب به

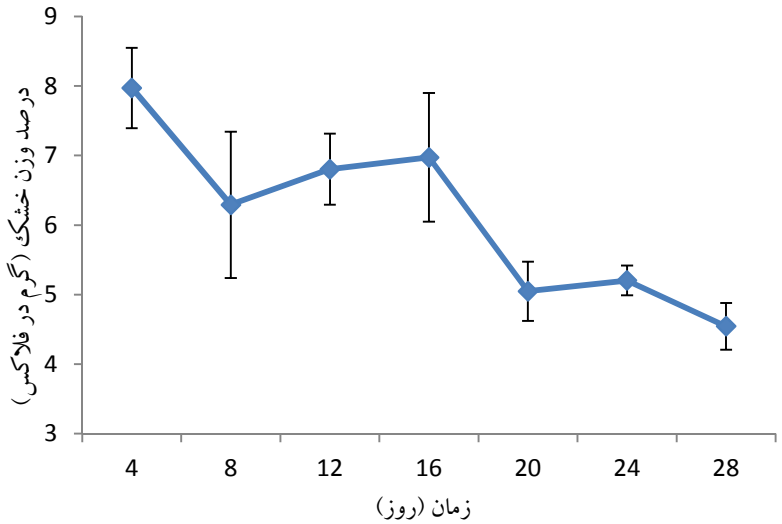
سلول‌ها، چرخش شیکر روی ۱۰۰ دور در دقیقه تنظیم گردید. کشت‌های مایع سری نخست پس از ۴ هفته در محیط کشت‌های مشابه واکشت گردیدند. برای دومین واکشت توده‌های سلولی بزرگتر از ۱ میلی‌متر توسط توری‌های استریل جدا گردیدند. از آن-جا که کشت‌های سلولی به از دست دادن آب حساس هستند، در طی واکشت‌ها مقدار ۲ گرم سلول برای هر ارلن ۱۰۰ میلی لیتری حاوی ۲۰ میلی‌لیتر محیط کشت مایع در نظر گرفته‌شد. سپس واکشت نمونه‌ها هر ۲ هفته یک‌بار و به‌مدت ۵ ماه صورت گرفت. پس از بدست آمدن کشت‌های یکنواخت سلولی، آزمایش اصلی با هدف مشخص کردن خصوصیات کشت سوسپانسیون سلولی گیاه همیشه‌بهار طراحی شد.در این بخش تنها اثر زمان بر فاکتورهای مورد نظر مطالعه شد. در این خصوص داده‌برداری در روزهای ۲۸، ۲۴، ۲۰، ۱۶، ۱۲، ۸، ۴ پس از واکشت صورت گرفت. برای هر بار داده‌برداری تعداد ۳ ارلن (هر ارلن به عنوان یک تکرار) انتخاب گردید. شاخص‌های وزن تر (گرم در لیتر)، وزن خشک (گرم در لیتر) و درصد ماده خشک اندازه‌گیری شد. برای اندازه-گیری وزن تر، بیشتر آب نمونه‌ها با قرار دادن آن‌ها روی کاغذ صافی و در مقابل جریان هوا بنحوی که بیشتر آب همراه نمونه‌ها حذف شود و در آخر با ترازوی حساس صورت گرفت. خشک کردن نمونه‌های سلولی نیز در آون با دمای ۳۵ تا ۴۰ درجه سانتی-گراد و در مدت شش روز صورت گرفت (Karam et al., 2003). درصد ماده خشک نیز از تقسیم وزن خشک بر وزن تر بدست آمد و داده‌های حاصل وارد اکسل شدند و نمودار مربوط به هرکدام رسم گردید.



شکل ۱- روند تغییرات وزن تر سلول های همیشه بهار در کشت سوسپانسیون سلولی



شکل ۲- روند تغییرات وزن خشک سلول های همیشه بهار در کشت سوسپانسیون سلولی



شکل ۳- روند تغییرات درصد وزن خشک سلول های همیشه بهار در کشت سوسپانسیون سلولی

یکی دیگر از شاخص‌هایی که در کشت سلولی مورد مطالعه قرار میگیرد، نسبت وزن خشک به وزن تر است که به‌عنوان درصد ماده خشک از آن نام برده می‌شود (Abdel Basset & Matsumoto, 2008). براساس این منحنی، درصد ماده خشک در هفته اول پس از کشت بیشترین بود و سپس روند کاهشی در پی داشت. یکی از دلایل محتمل، افزایش فعالیت و ماده‌سازی در طی هفته نخست آزمایش می‌باشد.

نتایج و بحث

این تحقیق با هدف مطالعه ویژگی‌های کشت سلولی گیاه همیشه‌بهار تنظیم گردید. کالوس‌های نرم گیاه همیشه‌بهار پس از انتقال به محیط کشت مایع از هم جدا و بصورت اجتماعات چند سلولی غوطه‌ور شدند. رنگ محیط کشت‌های سلولی گیاه همیشه-بهار در ابتدای هر کشت، شفاف بود که در ادامه و با گذشت زمان، این شفافیت جای خود را با کدری عوض کرد. از دلایل این مشاهدات می‌توان به ازدیاد سلول‌ها در طول دوره و همچنین افزایش مواد خارج شده از سلول‌ها در محیط کشت اشاره کرد. یک دوره کشت سلولی در همیشه‌بهار ۴ هفته طول کشید. البته داده‌برداری در این تحقیق تا هفته پنجم صورت گرفت تا نتایج دقیق‌تری بدست آید. سلول‌های همیشه‌بهار در ابتدا رشد کندی از خود نشان دادند و این رشد کند یا مرحله انتظار (مرحله واماندگی) در سلول‌های این گونه نزدیک به ۱۴ روز به طول انجامید. در این مرحله، افزایش چندانی در وزن تر و وزن خشک سلول ها رخ نداد به نحوی که در روز هشتم پس از کشت تنها ۵/۶ گرم در لیتر وزن تر و ۰/۳۵ گرم در لیتر وزن خشک نمونه‌ها بدست آمد. پس از این مرحله تاخیر در رشد، منحنی رشد سلول‌ها وارد مرحله تصاعدی شدند که افزایش قابل ملاحظه‌ای در وزن تر و خشک سلول‌ها دیده شد. مرحله تصاعدی رشد از روز شانزدهم از کشت یعنی برداشت چهارم از کشت منطبق بود و بیشترین میزان وزن تر وخشک در روز۲۴ مشاهده گردید.در این مرحله رشد سلولی به میزان ۳۰/۲۵ گرم وزن تر در هر لیتر مشاهده شد. طبق گزارشها، کشت سلولی گیاهان ریحان و اسطوخودوس نیز مورد مطالعه قرار گرفت. بیشترین میزان رشد سلولی در کشت سوسپانسیون ریحان ۱۴ روز و برای اسطوخودوس، ۸ روز پس از کشت بوده است (Kintzios et al., 2003). یک دوره کشت سوسپانسیون سلولی در گیاه مرزه خوزستانی ۳ هفته به طول انجامید (Georgiev et al., 2009). تولید مشتقات تری ترپنویید، در غلظت بالا و دوره کوتاه زمانی، با استفاده از کشت درون شیشه‌ای بوسیله تغییرات شرایط تغذیه‌ای و استفاده از الیسیتورها امکان پذیر است (Kamiisako et al., 1984).

نتیجه‌گیری

بر طبق این آزمایش مشخص شد که طول یک دوره رشد سلولی گیاه دارویی همیشه بهار ۲۸ روز است و دوره رشد تصاعدی سلول همیشه‌بهار از برداشت چهارم یعنی روز شانزدهم آغاز گردید و تا پایان روز بیست و چهارم ادامه داشته است و بعد از آن تا روز بیست و هشتم توقف در رشد را نشان داد. و مشخص شد که روز شانزدهم بهترین زمان برای اضافه کردن السیتور به‌منظور افزایش متابولیت‌های ثانویه نیز می‌باشد.

منابع

۱. امید بیگی، رضا، ۱۳۸۸. تولید و فراوری گیاهان دارویی. انتشارات آستان قدس رضوی.

2. Abdel Basset, R. & Matsumoto, H. (2008).Aluminum toxicity and cadepletion may enhance cell death of tobacco cells via similar syndrome. Plant signa ling & Behavior,3(5), 290-29
3. Georgiev, M., Abrashev, R., Kramova, E., Demirevska, K.,Ilieva, M. & Angelova, M.(2009).Rosmarinic Acid and Antionidant Enzyme Activities in lavandula vera MM cell suspension culture: A Comparative study. Applied Biochemistry and Biotechnology. 159, 415-425
4. Karam, N. S., Javad F. M., Arikat N.A. & Shibli, R. A. (2003).Growth and rosmarinic asid accumulation in callus, cell suspension, and root cultures of wild salvia fruticosa. Plant cell, Tissue and Organ Culltuer, 73. 117-121
5. Kamiisako W, Morimoto K, Makino I, Isoi K (1984) Changes in triterpenoid content during the growth cycle of cultured plant cells.plant cells physiol. 25: 1571-1574.
6. Kintzios, S., Makri, o., panagiotopoulos, E. M. & Scapeti, M. (2003) *Invitro* rosmarinic acid accumulation in sweet basil (*Ocimum* basilicum L.) biotechnology letters, 25, 405-408.

Optimizing cell suspension culture in *Calendula officinalis*

A. Rajabi[1*], H. Zakizadeh[2], A. Hatamzadeh[3], A. Sahraro[4]

1- M. Sc of Horticultural Science, University of Guilan. 2- Associate Professor, Dep. of Horticultural Science, University of Guilan. 3- Professor, Dep. of Horticultural Science, University of Guilan. 4- Associate Professor, Dep. of Horticultural Science, University of Guilan.

*Corresponding author: Zakizadeh55@yahoo.com

Abstract

Calendula officinalis is one of the most important ornamental and medicinal plants which is valuable for its Flavonoid, carotenoid, saponin and glycoside production. Therefore optimizing callus propagation of *Calendula officinalis* with growth regulator; BAP and NAA was done in order to specify the length of a cell culture period and the onset of exponential growth of marigold cells. The result of fresh weight, dry weight and the percentage of dry weight at periods of 4,8,12,16,20 and 24 days after subculture showed that the time needed for the growth of cell culture in marigold is about 28 days and the growth starting time and the increase in cell numbers happens from 14th day on which shows the perfect time for adding elicitors to cells in order to increase secondary metabolites.

Key words: cell suspension cultu, elisitou, perud