بهینه‌سازی و ایجاد کالوس و کشت سوسپانسیون سلولی فندق (*Corylus avellana* L.)

حمید محمدزاده مطلق*[1]، مراد جعفری[2]

[1] دانشجوی کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی، گروه مهندسی تولید و ژنتیک گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه، ارومیه

[2] دانشیار گروه مهندسی تولید و ژنتیک گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه، ارومیه

*نویسنده مسئول: Hakanmotlagh9@gmail.com

چکیده

فندق (*Corylus avellana* L.) دارای یک ترکیب ضد سرطان تاکسول می‌باشد که به‌طور گسترده‌ای به‌عنوان عامل شیمی درمانی مورد استفاده قرار می‌گیرد. با استفاده از سیستم‌های کشت سوسپانسیون سلولی امکان تولید پایدار ترکیبات فعال زیستی وجود دارد. هدف از این مطالعه، ایجاد کالوس و کشت سوسپانسیون سلولی در فندق بود. محیط‌های پایه مختلفی از جمله MS، WPM و MB5 همراه با BAP ۰/۲۵ mg/L + NAA ۲ mg/L یا BAP ۰/۲۵ mg/L + 2,4-D ۲ mg/L برای توسعه یک پروتکل کارآمد القای کالوس و کشت‌های سلولی، مورد بررسی قرار گرفتند. بیش‌ترین درصد القای کالوس ترد (۵۸/۶۱ درصد) در محیط MB5 غنی شده با BAP ۰/۲۵ mg/L + 2,4-D ۲ mg/L به‌دست آمد. بهترین کشت‌های سوسپانسیون سلولی با عملکرد بالای چگالی سلولی (۷/۳۳ ×۱۰^{۸} در هر لیتر محیط کشت) با استفاده از همان محیط تعیین شده برای تولید میزان بالای کالوس، ایجاد گردید. نتایج مطالعه حاضر می‌تواند در آینده برای مطالعه و تولید متابولیت‌های ثانویه با ارزش در کشت سوسپانسیون فندق مورد استفاده قرار گیرد.

کلمات کلیدی: فندق (*Corylos avellana* L.)، کشت سلول، تنظیم‌کننده رشد گیاهی، محیط پایه

مقدمه

فندق (*Corylus avellana*) یکی از گونه‌های متعلق به خانواده بتولاسه[1] است که در مناطقی از اروپا و آسیای میانه با زمستان‌های معتدل و مرطوب و تابستان‌های خنک به صورت خودرو رشد می‌کند (Olsen, 2003). بخش‌های مختلف فندق حاوی متابولیت‌های ثانویه متعددی با خواص دارویی و ضد میکروبی بسیار با ارزش است. همچنین مواد دارویی با اثرات ضد سرطانی که مهم‌ترین آن‌ها تاکسول است، در این گیاه گزارش شده است (Hoffman *et al.*, 1998; safari *et al.*, 2012). استفاده از راهکارهای فناوری زیستی از جمله کشت سوسپانسیون سلولی، راه‌حلی مناسب برای تولید سریع و انبوه متابولیت ثانویه دارویی می‌باشد (Rao and Ravishankar, 2002). با توجه به اینکه مطالعات محدودی در زمینه بهینه‌سازی کشت سوسپانسیون سلولی فندق صورت گرفته است، لذا هدف این مطالعه بهینه‌سازی و ایجاد کالوس و سوسپانسیون سلولی فندق بود.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی

در این پژوهش، بذور تازه فندق از شهرستان اردبیل تهیه و به عنوان منبعی برای تولید کالوس و کشت سوسپانسیون سلولی مورد استفاده قرار گرفتند. برای ضدعفونی، بذور فندق پنج دقیقه با مایع ظرفشویی شستشو شده و به مدت یک ساعت زیر آب جاری قرار گرفتند و پس از یک دقیقه غوطه‌ور سازی در الکل ۷۰ درصد با هیپوکلریت سدیم ۵ درصد به مدت ۲۰ دقیقه تیمار و سپس چندین مرتبه آبکشی گردید و در نهایت بذور به مدت ۷ دقیقه داخل آب اکسیژنه ۱۰ درصد قرار داده شدند و مجددا آبکشی شده و در نهایت پس از حذف آب اضافی، در محیط‌های مختلف کشت شدند. آزمایش‌های مربوط به

[1] Betulaceae

IrHC2019

کالوس‌زایی و کشت سوسپانسیون به صورت طرح کاملا تصادفی با ۳ تکرار انجام شد. محاسبات آماری و تجزیه و تحلیل داده‌ها با نرم‌افزار SPSS و مقایسه میانگین با استفاده از آزمون دانکن در سطح احتمال ۵ درصد انجام گرفت.

القاء کالوس و استقرار کشت سوسپانسیون سلولی

در آزمایش القای کالوس، بذر ضدعفونی شده فندق به چهار قطعه تقسیم و در محیط کشت‌های پایه مختلف شامل MS، WPM و MB5 غنی شده با غلظت‌های مختلف فیتوهورمورن‌ها (جدول ۲) کشت داده شدند. لازم به ذکر است که محیط کشت MB5 همان محیط B5 بوده که تغییراتی در مقدار و نسبت ویتامین‌ها ایجاد شد (: (Thiamin-HCL (25 mg/L) Pyridoxin-HCL (2.5 mg/L) : Nicotinic Acid (2.5 mg/L) : Myoinositol (100 mg/L)). کشت‌ها در شرایط تاریکی و دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند و پس از گذشت دو الی چهار هفته درصد کالوس‌زایی محاسبه گردید.

جدول ۲- انواع محیط کشت‌های استفاده شده برای القاء کالوس به همراه ترکیبات هورمونی

کد محیط کشت	نوع محیط پایه	ترکیبات هورمونی (mg/L)		
		NAA	2,4-D	BAP
MS-1	MS	-	۲	۰/۲۵
MS-2	MS	۲	-	۰/۲۵
WPM-1	WPM	-	۲	۰/۲۵
WPM-2	WPM	۲	-	۰/۲۵
MB5-1	MB5	-	۲	۰/۲۵
MB5-2	MB5	۲	-	۰/۲۵

جهت بهینه‌سازی و استقرار کشت سوسپانسیون سلولی، مقدار دو گرم از کالوس‌های ترد و شکننده انتخاب و در ارلن‌های ml ۱۰۰ حاوی ۳۰ میلی‌لیتر از همان محیط کشت‌های مورد استفاده برای القای کالوس به صورت مایع کشت و به مدت ۲ هفته در شرایط تاریکی بر روی شیکر دورانی با سرعت rpm ۱۲۰ قرار داده شدند. پس از پاساژ اول، کشت‌ها با فیلترهای فلزی با اندازه منافذ ۵۰۰ میکرون صاف شدند و مجددا در شرایط تاریکی و بر روی شیکر دورانی قرار داده شدند.

اندازه گیری رشد سلولی در کشت سوسپانسیون

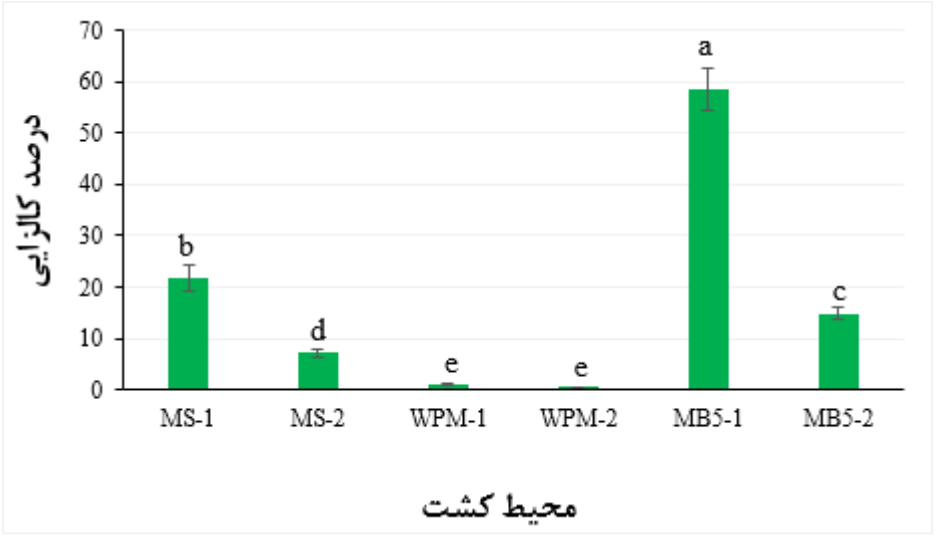
به منظور بررسی رشد سلولی در کشت سوسپانسیون، شمارش تعداد سلول‌ها به عنوان شاخص رشدی در نظر گرفته شد. برای شمارش سلولی، میزان ۲۰۰ میکرولیتر محلول تری‌اکسید کروم ۸ درصد (CrO_3) به ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون سلولی حاصل از سه نوع محیط MB5، WPM و MS اضافه شد. سپس نمونه‌ها به مدت ۱۵دقیقه در بن‌ماری با دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند و به مدت ۱۵ دقیقه ورتکس شدند. سپس به اندازه ۱۰ میکرولیتر از محلول حاصل برداشته شده و بر روی لام نئوبار تزریق شد و با استفاده از عدسی 20X میکروسکوپ سلول‌ها شمارش شدند و چگالی سلولی به صورت تعداد سلول‌ها در هر میلی‌لیتر سوسپانسون سلولی طبق فرمول زیر محاسبه شد.

$$\text{تعداد سلول در یک میلی‌لیتر} = \text{تعداد سلول‌های شمارش شده} \times \frac{\text{میزان رقیق شدگی}}{\text{تعداد مربع‌ها}} \times ۱۰۰۰۰ \text{ سلول در یک میلی لیتر}$$

نتایج و بحث

نتایج حاصل از آزمایش کالزایی نشان داد که، بین محیط کشت‌های مختلف از نظر آماری تفاوت معنی‌داری (P < ۰/۰۵) وجود داشت. بیش‌ترین درصد کالزایی (۵۸/۶۱ درصد) مربوط به محیط MB5-1 حاوی ترکیبات هورمونی ۰/۲۵ mg/L BAP و 2,4-D ۲ mg/L بود، در حالی‌که کم‌ترین درصد کالزایی (۰/۵ درصد) در محیط کشت WPM-2 حاوی ترکیب فیتوهورمونی ۰/۲۵ mg/L BAP و ۲ mg/L NAA مشاهده گردید (نمودار ۱).

IrHC2019

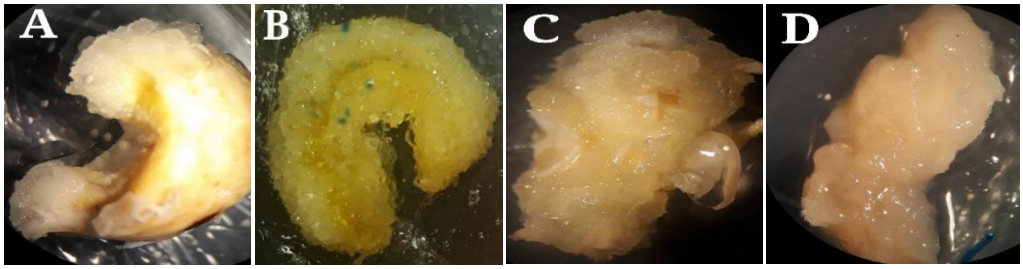


نمودار ۱- میانگین درصد کالوس‌زایی در محیط کشت‌های مختلف غنی شده با غلظت‌های مختلف فیتوهورمون‌ها (جدول ۱).

با مقایسه دو ترکیب فیتوهورمونی می‌توان نتیجه گرفت که در محیط کشت‌هایی که از ترکیب هورمونی ۰/۲۵ mg/L BAP و ۲ mg/L 2,4-D استفاده شده است به مراتب درصد کالزایی بیشتر از ترکیب فیتوهورمونی حاوی ۰/۲۵ mg/L BAP و ۲ mg/L NAA می‌باشد. به عبارتی دیگر، 2,4-D نسبت به هورمون NAA در القاء کالوس در بذور فندق تاثیر بیشتری داشت. این نتایج با نتایج حضرتی‌جهان (۱۳۹۳) مطابقت دارد. حضرتی‌جهان (۱۳۹۳) در تحقیق خود گزارش کردند که درصد کالزایی در محیط کشت حاوی 2,4-D به طور معنی‌داری بیشتر از NAA بود، به‌طوری که بیش‌ترین درصد کالوس‌زایی (۱۰۰ درصد) و وزن تر کالوس در محیط MS حاوی ۲ mg/L 2,4-D و ۰/۵ mg/L BAP مشاهده شده بود. از آنجایی که در محیط کشت MB5-1 نسبت به محیط‌های MS و WPM درصد کالزایی بالا و رشد کالوس‌ها عالی بود. لذا می‌توان نتیجه گرفت که محیط کشت MB5 محیط مناسبی جهت القاء کالوس بوده که یافته حاضر مطابق نتایج تحقیق بمانی (۱۳۹۰) می‌باشد.

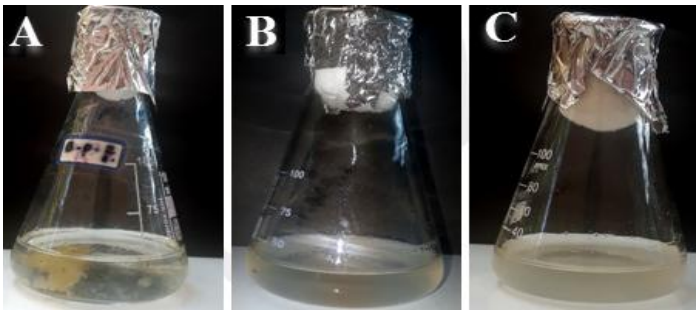
کالوس‌های تولید شده در محیط‌های مختلف، از نظر کیفیت کالوس مورد بررسی قرار گرفتند که شاخص کیفیت تردی و وضعیت ظاهری سالم و مناسب آن‌ها در نظر گرفته شد که شامل دو تیپ کالوس‌های سخت و آبکی و کالوس‌های ترد و شکننده بودند (شکل۱). کالوس‌های ترد و شکننده مناسب‌ترین کالوس‌ها برای کشت‌های سوسپانسیون سلولی هستند (Bernabé-Antonio *et al.*, 2017). کالوس‌های به دست آمده در محیط کشت MB5-1 از نظر بافت، تردی و شکنندگی بیشتری نسبت به کالوس‌های به‌دست آمده از محیط کشت‌های دیگر داشتند و برای تولید سوسپانسیون مناسب تشخیص داده شدند.

نتایج آزمایش بهینه‌سازی کشت سوسپانسیون نشان داد که بین محیط کشت‌های مختلف از نظر میزان چگالی سلولی تفاوت معنی‌دار آماری ($P < ۰/۰۵$) وجود داشت. بیش‌ترین چگالی سلولی مربوط به محیط کشت MB5 غنی شده با ترکیب هورمونی ۰/۲۵ mg/L BAP و ۲ mg/L 2,4-D می‌باشد و محیط‌های WPM و MS به‌ترتیب در رتبه‌بندی بعدی قرار گرفتند (نمودار۲). در این تحقیق محیط کشت MB5 حاوی ترکیب هورمونی ۰/۲۵ mg/L BAP و ۲ mg/L 2,4-D شرایط رشدی بهتری را برای سلول‌های فندق مهیا کرد که این یافته با نتایج بمانی (۱۳۹۰) مطابقت دارد. با این حال، در تحقیق حاضر اضافه کردن هورمون 2,4-D به محیط MB5 نسبت به NAA تاثیر بیشتری بر رشد و تقسیم سلول‌ها داشته است، لذا می‌توان نتیجه گرفت که در محیط کشت مایع MB5 با ترکیب هورمونی ۰/۲۵ mg/L BAP و ۲ mg/L (2,4-D) سلول‌های فندق از پتانسیل رشد بیشتری برخوردارند. نمونه‌ای از کشت سوسپانسیون سلولی فندق در شکل۲ آورده شده است.

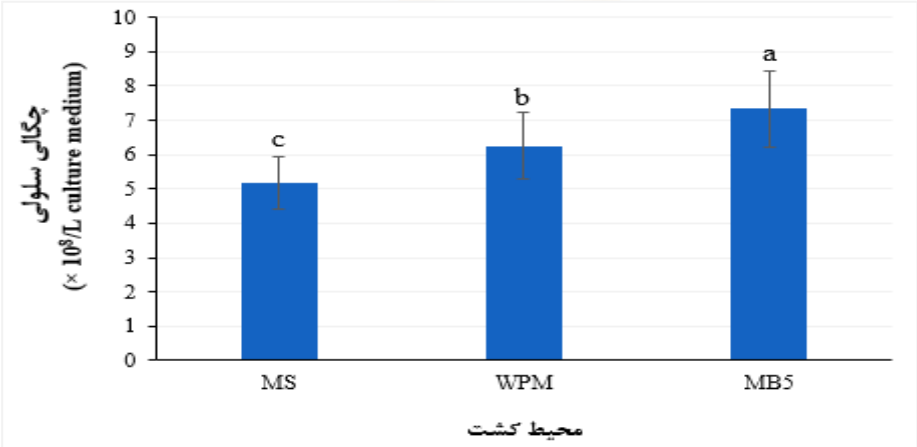


IrHC2019

شکل ۱- نمونه‌هایی از کالوس‌های القا شده در محیط MB5-1 : A)کالوس القاء شده بر روی ریزنمونه بذر فندق، B) کالوس-های ترد و شکننده پس از دو هفته واکشت، C) کالوس با بافت آبکی D) کالوس با بافت سخت.



شکل ۲-کشت سوسپانسیون سلولی فندق در محیط کشت MB5-1: A) قطعات کالوس منتقل شده به محیط مایع و پاساژ اول، B و C) به ترتیب پاساژ دوم و سوم که رشد سلول‌ها و افزایش چگالی سلولی در طی دو الی چهار هفته کشت را نشان می‌دهند.



نمودار ۲- چگالی سلولی در هر لیتر محیط کشت.

منابع

بمانی، ا. ۱۳۹۰. تاثیر بنزوئیک اسید، فنیل‌آلانین و سینامیک اسید بر تولید تاکسول در سلول‌های جداکشت فندق (*Corylos avellana*)، پایان‌نامه دوره کارشناسی ارشد رشته علوم گیاهی-گرایش فیزیولوژی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس،۵۷.

حضرتی جهان، ر. ۱۳۹۳. ارزیابی تاثیر عوامل مختلف بر تولید تاکسول در کشت سوسپانسیون سلولی فندق (*Corylus avellana*). پایان نامه کارشناسی ارشد در رشته مهندسی کشاورزی گرایش اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه محقق اردبیلی، ۸۴ صفحه.

Bernabé-Antonio, A., Maldonado-Magaña, A., Ramírez-López, C.B., Salcedo-Pérez, E., Meza-Contreras, J.C., González-García, Y., López-Dellamary Toral, F.A. and Cruz-Sosa, F., 2017. Establishment of callus and cell suspension cultures of *Eysenhardtia polystachya* (Ortega) and fugistatic activity of their extracts. South African Journal of Botany, 112: 40-47.

Hoffman, A., Khan, W., Worapong, J., Strobel, G., Griffin, D., Arbogast, B. 1998. Bioprospecting for Taxol in Angiosperm Plant Extracts-Using high performance liquid chromatography-thermospray mass spectrometry to detect the anticancer agent and its related metabolites in plant extracts. Spectroscopy, 13(6): 22-32.

Olsen, J.L., 2002. Growing hazelnuts in the Pacific Northwest. Extension Service, Oregon State University.

Rao, S.R. and Ravishankar, G.A., 2002. Plant cell cultures: chemical factories of secondary metabolites. Biotechnology Advances, 20(2): 101-153.

Safari, M., Ghanati, F., Hajnoruzi, A., Rezaei, A., Abdolmaleki, P. and Mokhtari-Dizaji, M., 2012. Maintenance of membrane integrity and increase of taxanes production in hazel (Corylusavellana L.) cells induced by low-intensity ultrasound. Biotechnology letters, 34(6): 1137-1141.

IrHC2019

Optimization and establishment of callus and cell suspension culture of hazelnut (*Corylos avellana* L.)

Hamid Mohammadzadeh Motlagh[1]*, Morad Jafari[2]
[1*] MSc student of Biotechnology, Department of Plant Production and Genetics, Faculty of Agriculture, Urmia University, Urmia
[2] Associate Professor, Department of Plant Production and Genetics, Faculty of Agriculture, Urmia University, Urmia
[*]*Corresponding Author: Hakanmotlagh9@gmail.com*

Abstract

Hazelnut (*Corylus avellana* L.) has been reported to possess an anticancer compound taxol that is widely utilized as chemotherapeutic agent. It is possible to sustainably produce bioactive compounds using cell suspension culture systems. The aim of this study was to establish callus and cell suspension culture in hazelnut. Different basal media including MS, WPM, and MB5 supplemented with 2 mg/L NAA plus 0.25 mg/L BAP or 2 mg/L 2, 4-D plus 0.25 mgl^{-1} BAP for development of efficient protocol of callus induction and cell cultures was investigated. The maximum percentage of friable callus induction (58.61%) was obtained in MB5 medium supplemented with 2 mg/L 2, 4-D plus 0.25 mg/L BAP. Best cell suspension cultures with high yield of cell density (7.33×10^8/L culture medium) were established using the same medium determined for higher rate of callus production. The results of current study can be used for both studying and producing high-value secondary metabolites in suspension culture of hazelnut in the future.

***Keywords*:** Hazelnut (*Corylos avellana* L), Cell culture, Plant growth regulators, Basal medium

IrHC2019