بررسی هورمون‌های استروئیدی (پروژسترون، استرادیول) در غده و کالوس سیب زمینی شیرین در محیط کشت B5

علی اردمه [*۱]، کامبیز مشایخی[۲]، سید جواد موسوی زاده[۳]

[۱] دانشجوی کارشناسی ارشد علوم باغبانی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران.

[۲] دانشیار گروه علوم باغبانی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران.

[۳] استادیار گروه علوم باغبانی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران.

*مسئول مکاتبه: Ali.ardameh96@gmail.com

چکیده

سیب زمینی شیرین (*Ipomoea batatas*) یکی از گونه‌های با ارزش خانواده نیلوفر صحرایی (Convolvulaceae) است. بدلیل خواص بی‌نظیر آن، امروزه تحقیقات گسترده‌ای جهت آشنایی بیشتر با پتانسیل‌های این گیاه در حال انجام است. این گیاه به روش غده و یا کشت بافت تکثیر می‌شود. وجود هورمون‌های استروئیدی در پیکره این گیاه باعث شده تا زمینه بهره‌برداری بیشتر آن فراهم شود. لذا در تحقیق حاضر میزان هورمون‌های استروئیدی (استرادیول و پروژسترون) در دو بافت غده و کالوس تولید شده در محیط کشت B5 مورد ارزیابی قرار گرفته است. در ابتدا ریزنمونه‌ها از ساقه‌های رونده و دمبرگ سیب زمینی شیرین تهیه شدند. سپس به منظور ضدعفونی ریزنمونه‌ها از هیپوکلریدسدیم ۷۰ درصد (۵ دقیقه) و الکل ۷۰ درصد (۶۰ ثانیه) استفاده شد. استقرار ریزنمونه‌ها در محیط‌کشت B5 صورت گرفت. در نهایت به منظور تشخیص میزان هورمون‌های استروئیدی، از دو بافت کالوس و غده به صورت جداگانه عصاره تهیه شد و هر یک از عصاره‌ها در دمای منفی ۵ درجه سانتیگراد به آزمایشگاه تشخیص طبی منتقل شد. نتایج حاصل از تجزیه عصاره‌ها بیانگر وجود هر دو هورمون استرادیول و پروژسترون در دو نمونه غده و کالوس بود. اگر چه میزان هورمون‌های استروئیدی بررسی شده در نمونه کالوس (استرادیول ۴۴/۳۴ pg/ml و پروژسترون ۰/۲۶۴ ng/ml) بیشتر از غده (استرادیول ۲۸/۷۲ pg/ml و پروژسترون ۰/۲۰ ng/ml>) بود. پویایی بیشتر بافت کالوس در تکثیر مداوم نسبت به غده می‌تواند علت حضور بیشتر هورمون‌های استروئیدی در کالوس باشد. همچنین میزان هورمون استرادیول در هر دو بافت غده و کالوس بیشتر از پروژسترون مشاهده شد.

کلمات کلیدی: بافت، تکثیر، ریزنمونه، عصاره، ضدعفونی.

مقدمه

سیب زمینی شیرین (*Ipomoea batatas*) یکی از گونه‌های با ارزش خانواده نیلوفر صحرایی (Convolvulaceae) است که بومی مناطق گرمسیری آمریکا واندونزی می‌باشد (Struik, 2007). این گیاه چند ساله معمولا به صورت یک ساله نگهداری می‌شود. این گیاه در اکثر مناطق دنیا از جمله چین، هندوستان و سایر مناطق آسیا وآفریقای شمالی و اروپا کاشته شده (Aloufa, 2002) و بصورت وحشی در شیلی و آرژانتین می‌روید . در قرن شانزدهم بوسیله اسپانیولی‌ها به اروپا برده شد و اکنون در اروپا و آمریکا اولین سبزی از نظر مصرف است (Panta *et al.*, 2006) نام علمی آن Lamk. *Ipomoea batatas* (k) و نام‌های مترادف آن L *Convolvulus batatas*. و *Convolvulus indicus Moris* و *Convolvulus eulis Thund*. و *Ipomoea batatas Lamk*. می باشد (Sarkar, 2001a and b).

گیاهان ازجمله موجوداتی هستند که پتانسیل تولید تعدادی زیادی از مواد شیمیایی را دارند. فیتوهورمون‌ها اجزاء گیاهی هستند که ساختاری مانند هورمون‌ها دارند .این ترکیبات با واژه عمومی فیتواستروژن‌ها نیز شناخته می‌شوند که به گیرنده‌های استروژنی متصل می‌شوند (سالاری و همکاران ۱۳۹۵). گیاهان متعدی تولید کننده این دسته از

IrHC2019

هورمون‌های گیاهی هستند که از مهم ترین آنها می‌توان به سویا *Pueraria lobata* (Avis et al., 2015) شبدر قرمز *Trifolium pretense* (McAllister et al., 1987) مریم گلی *Salvia officinalis* (Hsieh et al., 2001) گل پنج انگشت *Vitex agmus castus* (Liu et al., 2001) سیب زمینی وحشی *Dioscorea villosa* (Au et al., 2004) مارچوبه *Asparagus racemosus* (Parihar et al., 2004) اشاره نمود. علیرغم وجود این اطلاعات، گزارشات معدودی در راستای بررسی هورمون‌های ذکر شده در گیاه سیب زمینی شیرین موجود می‌باشد. لذا هدف از این تحقیق ارزیابی میزان هورمون استروئیدی در غده و کالوس سیب زمینی شیرین بود.

مواد و روش‌ها

۱. آماده سازی ریزنمونه

در ابتدا کشت غده سیب زمینی شیرین درگلدان با عمق ۱۰ سانتیمتری صورت گرفت. بعد از رشد گیاه، جداکشت‌ها از ساقه‌های رونده جدا شده وبه آزمایشگاه منتقل شد. قطعات جداکشت تهیه شده از ساقه‌های رونده و دمبرگ گیاه به مدت یک دقیقه با آب شستشو داده شد و در مرحله بعد با الکل ۷۰ درصد به مدت ۶۰ ثانیه و هیپوکلرید سدیم ۷۰ درصد به مدت ۵ دقیقه ضدعفونی گردید. سپس قطعات جداکشت ۵ بار با آب مقطر استریل در زیر هود لامینار شستشو شد.

۲. استقرار ریز نمونه:

شرایط اتاق کشت با دمای۲± ۲۵ درجه سانتی‌گراد و دوره نوری ۱۶ ساعت نور و ۸ ساعت تاریکی در نظر گرفته شد.محیط کشت B5 در ۵ پتری‌دیش توزیع گردید و در هر ظرف ۵ قطعه جداکشت قرار داده شد. عملیات واکشت هر ۲۰ روز یکبار صورت گرفت و بعد از ۸۰ روز کالوس‌ها برداشت شد.

۳. عصاره‌گیری کالوس و غده سیب زمینی شیرین:

در این روش ۱ گرم از نمونه (کالوس و غده به صورت جداگانه) با استفاده از ازت مایع در هاون خرد گردید و بعد از پودر شدن نمونه با اضافه کردن ۲ میلی‌لیتر متانول ۹۶ درصد به مدت ۲۰ دقیقه شیکر شد. سپس با افزودن ۱۰ میلی‌لیتر آب مقطر در دمای اتاق به مدت ۲۴ ساعت روی شیکر قرار گرفت. و بعد در ۱۵۰۰ دور در دمای ۴درجه به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ شد . در نهایت عصاره با فیلتر (۰/۴۵ میکرون) صاف شد و نمونه‌ها به آزمایشگاه تشخیص طبی جهت تعیین هورمون‌های استروئیدی انتقال داده شد. لازم به ذکر است، مراحل عصاره گیری در اتاق نسبتا تاریک انجام شد و بعد ازسانتریفیوژ عصاره تهیه شده در دمای منفی ۴۰ درجه سانتی گراد برای ۵ ساعت نگهداری گردید. سپس نمونه‌ها در دمای منفی ۵ درجه سانتیگراد به آزمایشگاه تشخیص طبی منتقل شد.

نتایج و بحث

طی آزمایش صورت گرفته مبنی بر بررسی میزان هورمون استروئیدی در غده و کالوس سیب زمینی شیرین، نتایج حاکی از آن است که دو هورمون اندازه‌گیری شده در هر دو نمونه وجود دارد. این در حالی است که میزان هورمون‌های استروئیدی کالوس (استرادیول ۴۴/۳۴ pg/ml و پروژسترون ۰/۲۶۴ ng/ml) بیشتر از میزان هورمون‌های استروئیدی در غده (استرادیول ۲۸/۷۲ pg/ml و پروژسترون ۰/۲۰ ng/ml>) می‌باشد (جدول ۱ و ۲). نکته قابل توجه تفاوت میزان هورمون‌های ذکر شده نسبت به یکدیگر در هر دو نمونه است و میزان هورمون استرادیول از هورمون پروژسترون بیشتر بود. طبق یک پژوهش صورت گرفته برای درمان یائسگی در زنان، 240 گرم سیب زمینی شیرین را در مدت ۴۱ روز تغذیه کردند. سطوح سرمی استرون، استرادیول و SHBG برای این گروه مورد بررسی قرار گرفت. پس از خوردن سیب زمینی شیرین، میزان غلظت سرمی غلظت اترن (۲۶٪)، هورمون متصل به گلوبولین (SHBG) (۹/۵ ٪) و افزایش قابل توجهی در میزان استرادیول (۲۷٪) مشاهده شد (Wu *et al.*, 2005). نتایج این پژوهش بیانگر وجود هورمون مذکور در گیاه سیب زمینی شیرین می‌باشد و با نتایج تحقیق حاضر مطابقت می‌کند. از طرفی هورمون‌های استروئیدی به عنوان

IrHC2019

هورمون‌های جنسی شناسایی شده‌اند و در رشد و تکثیر گیاه نقش اساسی دارند (Lindemann, 2015). پویایی بیشتر بافت کالوس در تکثیر مداوم نسبت به غده می‌تواند علت حضور بیشتر هورمون‌های استروئیدی در کالوس باشد.

جدول ۱. نتایج حاصل از تجزیه عصاره غده.

آزمایش	واحد	نتیجه	دامنه منابع
استرادویول (ELFA)	pg/ml	۲۸/۷۲	Method: ELFA M: <62 F; Follicular phase; 18-147 Pre Ovular peak; 93-573 Luteal phase; 43-214 Meno pussal; <58 Females; Follicular phase; 0.33-1.2 Luteal phase; 0.72-17.8 Post menopausal; >1.0 Oral contraceptive; 0.34-0.92 Males; 0.27-0.90
پروژسترون	ng/ml	<۰,۲۰	

جدول ۲. نتایج حاصل از تجزیه عصاره کالوس.

آزمایش	واحد	نتیجه	دامنه منابع
استرادویول (ELFA)	pg/ml	۴۴/۳۴	Method: ELFA M: <62 F; Follicular phase; 18-147 Pre Ovular peak; 93-573 Luteal phase; 43-214 Meno pussal; <58 Females; Follicular phase; 0.33-1.2 Luteal phase; 0.72-17.8 Post menopausal; >1.0 Oral contraceptive; 0.34-0.92 Males; 0.27-0.90
پروژسترون	ng/ml	۰/۲۶۴	

منابع

سالاری، ر.، یوسفی، م.، قربانزاده، ح. و جعفری نژاد بجستانی، م. ۱۳۹۵. مروری بر گیاهان دارویی با خواص استروژنی، پروژسترونی و تستوسترونی. مجله زنان، مامائی و نازایی ایران. ۳۶ :۱۹-۳۰.

Aloufa, M.A. 2002. Some factors affecting the callus induction and shoot formation in two Ciênc. Agrotec. 26(5): 964–969.

IrHC2019

Au, A.L., Kwok, C.C., Lee, A.T., Kwan, Y.W., Lee, M.M., and Zhang, R.Z. 2004. Activation of iberiotoxin-sensitive, Ca2+-activated K+ channels of porcine isolated left anterior descending coronary artery by diosgenin. Eur J Pharmacol. 502(1-2): 123-33.

Avis, N.E., Crawford, S.L., Greendale, G., Bromberger, J.T., Everson-Rose, S.A., and Gold, E.B. 2015. Duration of menopausal vasomotor symptoms over the menopause transition. JAMA Intern Med. 175(4): 531-9.

Hsieh, M.T., Wu, C.R., Wang, W.H., and Lin, L.W. 2001. The ameliorating effect of the water layer of Fructus Schisandrae on cycloheximide-induced amnesia in rats: interaction with drugs acting at neurotransmitter receptors. Pharmacol Res. 43(1): 17-22.

Lindemann, P. 2015. Steroidogenesis in plants–Biosynthesis and conversions of progesterone and other pregnane derivatives. Steroids, *103*, 145-152.

Liu, J., Burdette, J.E., Xu, H., Gu, C., van Breemen, R.B., and Bhat K.P. 2001. Evaluation of estrogenic activity of plant extracts for the potential treatment of menopausal symptoms. J Agric Food Chem. 49(5): 2472-9.

McAllister, J.M., and Hornsby, P.J. 1987. TPA inhibits the synthesis of androgens and cortisol and enhances the synthesis non-17 alpha-hydroxylated steroids in cultured human adrenocortical cells. Endocrinology. 121(5): 1908-10.

Panta, A., Ynouye, C., Espinoza, C. and Roca, W. 2006. Protocol for virus elimination in potato, sweet potato and other Andean root and tuber crops (ARTCs). CIP, pp. 1–7.

Parihar, M.S., and Hemnani, T. 2004. Experimental excitotoxicity provokes oxidative damage in mice brain and attenuation by extract of *Asparagus racemosus*. J Neural Transm. 111(1): 1-12.

Sarkar, D. 2001a. About potato tissue culture. J. DSE- PGR and Biotechnol. 6: 1-5.

Sarkar, D. 2001b. About potato tissue culture. J. DSE- OGR and Biotechnol., 5: 1-15

Struik, P.C. 2007. The canon of potato science: 25, Minituber. Potato Res. 50: 305-308.

Wu, W.H., Liu, L.Y., Chung, C.J., Jou, H.J. and Wang, T.A. 2005. Estrogenic effect of yam ingestion in healthy postmenopausal women. Journal of the American College of Nutrition, 24(4); pp.235-243.

Study of steroid hormone (progesterone, estradiol) in tuber and callus of sweet potato in B5 medium

Ali Ardameh*[1], Kambiz Mashayekhi[2], Seyyed Javad Mousavizadeh[3]

1-MSc Student, Department of Horticultural Science, Gorgan university of agricultural science and natural resources, Gorgan, Iran. 2-Associated prof. Department of Horticultural Science, Gorgan university of agricultural science and natural resources, Gorgan, Iran. 3-Assistance Prof. Department of Horticultural Science, Gorgan university of agricultural science and natural resources, Gorgan, Iran.

**Corresponding authore: Ali.ardameh96@gmail.com*

Abstract

Sweet potatoes (*Ipomoea batatas*) is one of the most valuable species of Convolvulaceae. Today, due to its unique properties, many studies are under way to identify the potential of this plant. This plant is propagated by tuber or tissue culture. The presence of steroid hormones in this plant has increased its use. Therefore, in the present study, the level of steroid hormones (estradiol and progesterone) was evaluated in tuber and callus produced in B5 medium. Initially, explants were obtained from stolon and petioles of sweet potato. Then, 70% (5 minutes) sodium hypochlorite and 70% (60 seconds) alcohol were used to disinfect the extracts. Finally, in order to detect the amount of steroid hormones, two extracts of callus and tuber were extracted separately and each extract was transferred to a medical diagnostic laboratory at -5 °C. The results of the decomposition of the extracts indicated the presence of both estradiol and progesterone in tuber and callus. The level of steroid hormones in the callus sample (estradiol 44.34 pg/ml and progesterone 0.24 ng/ml) was greater than the tuber (estradiol 28.72 pg/ml and progesterone <0.20 ng/ml). The greater ability of the callus tissue to continuously proliferate in compare to tuber can be due to the presence of more steroid hormones in the callus. Also, the level of estradiol in both tuber and callus tissues was higher than progesterone.

Keywords: Tissue, reproduction, explant, extract, disinfectant.

IrHC2019