اثر متیل جاسمونات بر تولید تاکسول در کشت درون شیشه‌ای گیاه فندق (*Corylus avellana* L.)

چیمن ابراهیمی[۱]، محمود سلوکی[۱]، منصور امیدی[۲]، مسیح فروتن[۱]، امیررضا زارع کاریزی[۳]، علی مهرآفرین[۳]، اردشیر قادری[۳*]

۱- گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زابل، زابل، ایران
۲- گروه زراعت و اصلاح نباتات، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران، تهران، ایران
۳- مرکز تحقیقات گیاهان دارویی، پژوهشکده گیاهان دارویی جهاددانشگاهی، کرج، ایران
*آدرس مکاتبه: مرکز تحقیقات گیاهان دارویی، پژوهشکده گیاهان دارویی جهاددانشگاهی، کرج، ایران
صندوق‌پستی: ۱۳۶۹ – ۳۱۳۷۵، تلفن: ۳٤۷٦٤۰۱۰ (۰۲٦) ، نمابر: ۳٤۷٦٤۰۲۱ (۰۲٦)
پست الکترونیک: Ardeshir582008@gmail.com

تاریخ دریافت: ۹۳/۵/۱۳ **تاریخ تصویب:** ۹٤/۳/۲۰

چکیده

مقدمه: فندق ***Corylus avellana*** یکی از گونه‌های متعلق به جنس **Corylus** است. قسمت‌های مختلف این گیاه حاوی انواع مهمی از متابولیت‌های دارویی با اثرات ضدسرطانی و ضدمیکروبی بسیار ارزشمند می‌باشد.

هدف: تحقیق حاضر با هدف ارزیابی توانایی تولید تاکسول و همچنین بهینه‌سازی کالزایی و باززایی فندق از ریزنمونه‌های کوتیلدونی بذر انجام شد.

روش بررسی: قطعات کوتیلدون برای القای کالوس در محیط کشت موراشیگ و اسکوک **(MS)** حاوی هورمون‌های ۲ و ٤- دی کلرو فنوکسی استیک اسید **(2, 4 – D)** در غلظت‌های ۰، ۰/۵ و ۱ میلی‌گرم در لیتر. به تنهایی و یا در ترکیب با غلظت‌های ۰، ۰/۵ و ۱ میلی‌گرم در لیترهورمون بنزیل آدنین **(BA)** کشت شدند. به منظور باززایی کالوس‌های به دست آمده در همان محیط کالزایی واکشت و یا به محیط **MS** حاوی هورمون **BA** در غلظت‌های ۰، ۰/۲۵، ۰/۵، ۱، ۲ و ۳ میلی‌گرم در لیتر منتقل شدند. همچنین به منظور ارزیابی توان تولید متابولیت تاکسول در محیط‌های کشت کالوس از الیسیتور متیل جاسمونات در غلظت‌های ۰، ۱۰، ٤۰، ۷۰، ۱۰۰، ۱۳۰ و ۱٦۰ میکرو مولار استفاده شد.

نتایج: در همه تیمارهای هورمونی کالوس تشکیل شد. در تیمار هورمونی حاوی ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر **2. 4 - D** باززایی مشاهده شد. در تیمارهای باززایی بیشترین تعداد ساقه‌چه در غلظت ۱ **BA** میلی‌گرم در لیتر باززا شد. بیشترین و کمترین میزان تولید تاکسول به ترتیب در تیمار حاوی ۱۳۰ میکرو مولار متیل جاسمونات (۱٦/۷ **mg/KgDW**) و تیمار شاهد (٤/۳ **mg/KgDW**) مشاهده شد. ساقه‌های باززا شده در محیط کشت **MS** حاوی ۲ میلی‌گرم در لیتر نفتالین استیک اسید **(NAA)** هورمون در ترکیب با ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر **BA** ریشه‌دار شدند. پس از ریشه‌زایی گیاهچه‌هایی که به خوبی رشد کرده بودند به منظور سازگاری در مخلوط پرلیت، پیت موس و کوکوپیت به نسبت ۱:۲:۱ کشت، در محفظه‌ای درپوش‌دار که دارای رطوبت ۹۰ درصد بود، قرار داده شد. پس از ٤ هفته گیاهان سازگار شده از محفظه خارج شده و به گلخانه انتقال یافتند.

نتیجه‌گیری: از نتایج این تحقیق می‌توان در بهینه‌سازی تولید متابولیت تاکسول در شرایط کشت درون شیشه‌ای بویژه کشت سوسپانسیون سلولی و همچنین باززایی کالوس‌های تراریخت فندق استفاده نمود.

گل‌واژگان: ***Corylus avellana***، باززایی، تولید تاکسول، کالزایی

مقدمه

فندق (*Corylus avellana*) یکی از گونه‌های متعلق به جنس Corylus است که در مناطقی از اروپا و آسیای میانه با زمستان‌های معتدل و مرطوب و تابستان‌های خنک به صورت خودرو رشد می‌کند [۱]. قسمت‌های مختلف این گیاه حاوی متابولیت‌های ثانویه متعددی با خواص دارویی و ضدمیکروبی بسیار با ارزش است. همچنین مواد دارویی با اثرات ضدسرطانی که مهم‌ترین آنها تاکسول است، در این گیاه وجود دارد [۲].

تاکسول یک عامل آنتی‌نئوپلاستیک است که در ابتدا با عملکرد پایین از پوست درخت سرخدار استخراج می‌شده است و در درمان عمومی سرطان کاربرد فراوان دارد و اگرچه به طور کلی یک متابولیت مختص سرخدار در نظر گرفته می‌شود، اما اکنون در درخت فندق نیز یافت شده است و اهمیت فندق نه تنها به عنوان یک خشکبار بلکه به عنوان یک گیاه دارویی نیز افزایش یافته است [۵ – ۲]. افزایش تقاضا برای فندق تنها می‌تواند به وسیله توزیع سریع رقم‌های استاندارد یا جدید که از برنامه‌های اصلاحی انتخاب شده‌اند، برآورده شود. تکثیر فندق به طور عمده از طریق جداسازی شاخه‌های جانبی از ریشه است. اگرچه خوابانیدن و قلمه زدن نیز استفاده می‌شود [٦]. اما روش‌های سنتی تکثیر فندق پرزحمت، دارای هزینه فراوان و وقت‌گیر است [۷].

تکثیر گیاهان در شرایط آزمایشگاهی روشی بسیار مفید جهت تولید داروهای گیاهی با کیفیت است. تولید و توسعه مؤثر جنین‌های سوماتیکی، پیش‌نیازی برای تولید گیاهان در سطح تجاری است. همچنین تکنیک‌های *in vitro* به عنوان ابزار نیرومندی برای حفاظت ژرم پلاسم و تولید انبوه بسیاری از گونه‌های گیاهی در معرض تهدید ارائه شده‌اند [۸]. علاوه‌بر این بهبود ژنتیکی روش دیگری برای افزودن ظرفیت عملکرد دارویی گیاه است [۹]. برای تحقیقات بیشتر روی ترکیبات بیوشیمیایی و ارزش‌های دارویی بالقوه، سیستم باززایی درون شیشه‌ای برای تولید گیاهان مورد نیاز است زیرا گیاهانی که در مزرعه رشد می‌کنند در معرض هجوم فصلی باکتری‌ها و قارچ‌ها و همچنین آلودگی‌های محیطی هستند که می‌تواند ارزش دارویی بافت‌های برداشت شده را تحت تأثیر قرار دهد [۱۰]. همچنین وجود ماده ضدسرطانی تاکسول در فندق توجه به کشت کالوس و تولید سوسپانسیون سلولی را باعث شده است. تحریک سنتز تاکسول توسط مواد بیولوژیک و یا غیر بیولوژیک در کشت سلول های گیاهی در شرایط درون شیشه‌ای انجام می‌شود. محرک‌های به کار رفته بسیار متنوع‌اند و روی مسیرهای مختلفی از بیوسنتز تاکسول دخالت می‌کنند. در این راستا استفاده از نیترات نقره، سیترات آمونیوم، متیل جاسمونات، اسید سالیسیلیک و اسید آراشیدونیک برای تحریک تولید تاکسول گزارش شده است. در این میان اسید جاسمونیک و مشتقات آن نظیر متیل جاسمونات به عنوان سیگنال‌های حد واسط مشخص شده‌اند و سنتز سریع آنها چه در گیاه و چه در کشت سلولی تأیید شده است [۱۱].

کشت دورن شیشه‌ای همراه با القای الیسیتور متیل جاسمونات به منظور تولید کالوس و باززایی درون شیشه‌ای گیاه فندق ابزاری بسیار کارآمد جهت برآورده شدن نیازهای مذکور است. بنابراین به منظور دست‌ورزی‌های ژنتیکی مطلوب و مطالعه کشت سلولی در راستای افزایش تولید متابولیت‌های ثانویه ارزشمندی چون تاکسول و همچنین تکثیر انبوه این گیاه، بهینه‌سازی شرایط کشت درون شیشه‌ای شامل کالزایی و باززایی ضروری است.

در تحقیقی که با هدف کشت سوسپانسیون سلولی فندق و بررسی تولید تاکسول و تاکسان‌ها انجام شد، از ریزنمونه‌های مختلف فندق برای بهینه کردن پروتکل القای کالوس و کشت سوسپانسیون سلول استفاده شد. محیط‌هایی که از کشت سوسپانسیون سلول بازیافت شدند محتوی تاکسول و تاکسان‌های وابسته بودند و فعالیت ضدتقسیم سلول را بر روی سلول‌های تومور انسان نشان دادند [٤]. مطالعه بر روی کشت بافت و باززایی فندق پیش از این نیز انجام شده است. پتانسیل کالوس‌دهی و جنین‌زایی سوماتیکی کوتیلدون فندق توسط آیگون (Aygun) و همکاران در سال ۲۰۰۹ بررسی شد. نتایج نشان داد که درصد کوتیلدون‌های جنین‌زا زمانی که ترکیبی از هورمون‌های نفتالین استیک اسید (NAA) و BA به ترتیب با مقادیر ۰/۵ و ۱ میلی‌گرم در لیتر استفاده شود، بیشترین مقدار است و همچنین در غیاب BA القاء جنین سوماتیکی خیلی کم

است [۱۲]. بررسی اثر ممانعت کننده‌های سنتز پوتریسین بر روی جنین‌زایی فندق در کشت برگ لپه‌ای نشان داد که در فندق زمانی که پوتریسین و اسپرمیدین همزمان کاهش یابد، جنین‌زایی سوماتیکی کاهش پیدا می‌کند، اما به وسیله سطوح پایین پوتریسین به تنهایی متأثر نمی‌شود. در زمینه ریزازدیادی نیز مطالعاتی روی فندق انجام شده است [۱٦– ۱٤].

در این تحقیق به منظور بهینه‌سازی شرایط کالزایی و باززایی فندق از کوتیلدون‌های این گیاه به عنوان ریزنمونه استفاده شد. همچنین به منظور بررسی تولید تاکسول در مرحله کالوس‌دهی از غلظت‌های مختلف متیل جاسمونات به عنوان الیسیتور استفاده شد.

مواد و روش‌ها

تهیه نمونه‌های گیاهی و ضدعفونی آنها

بذرهای گیاه فندق در تابستان سال ۱۳۹۱ از درختان مزرعه تحقیقاتی پژوهشکده گیاهان دارویی (با کد هرباریومی 750MPIH) جمع‌آوری و به آزمایشگاه منتقل شدند. در آزمایشگاه پوسته رویی بذر جدا شد و بذرهای سالم در زیر آب جاری همراه با چند قطره محلول توین ۲۰ به مدت ۲ ساعت غوطه‌ور شدند. پس از آن بذرها در زیر لامینار ایرفلو ابتدا به مدت ۳۰ ثانیه با الکل اتانول ۷۰ درصد ضدعفونی سطحی شدند. سپس ۳ – ۲ بار با آب مقطر استریل شستشو شدند. سپس با کلرید جیوه ۰/۱ درصد به مدت ٤ دقیقه استریل و در نهایت ۳ – ۲ بار با آب مقطر استریل شستشو داده شدند.

کالزایی

پس از ضدعفونی، ابتدا پوسته سخت بذرهاشکسته شده و پوسته رویی قهوه‌ای شکل روی لپه (مزوکارپ) جدا شده و پس از آن لپه‌ها بوسیله اسکالپل قطعه قطعه و به منظور کالزایی بر روی محیط کشت MS حاوی هورمون‌های 2,4-D و BA در غلظت‌های ۰، ۰/۵ و ۱ میلی‌گرم در لیتر هر یک به تنهایی و یا در ترکیب با یکدیگر کشت شدند. به تمامی محیط‌ها ۳۰ گرم در لیتر شکر و ۷ گرم در لیترآگار افزوده شد. pH تمامی محیط‌های کشت ۵/۸ در نظر گرفته شد. تمام محیط‌ها در اتاق رشد در دمای ۲ ± ۲۳ درجه سانتی‌گراد و در تاریکی قرار گرفته شد. یک ماه پس از کشت درصد کالزایی، وزن تر و خشک کالوس‌ها بررسی شد.

القای الیسیتور

کالوس‌های به دست آمده در بهترین تیمار کالزایی ۳ بار با فاصله ۲۱ روز یک‌بار در همان محیط واکشت شدند و سپس به محیط کشت MS حاوی متیل جاسمونات در غلظت‌های ۰، ۱۰، ٤۰، ۷۰، ۱۰۰، ۱۳۰ و ۱٦۰ میکرو مولار انتقال یافتد. ۷۲ ساعت پس از القاء میزان تولید تاکسول در کالوس‌ها با استفاده از روش کروماتوگرافی (HPLC) بررسی شد.

باززایی

به منظور باززایی کالوس‌ها به محیط MS حاوی هورمون BA در غلظت‌های ۰، ۰/۲۵، ۰/۵، ۱، ۲ و ۳ میلی‌گرم در لیتر منتقل شدند. تمام محیط‌ها در دمای ۲ ± ۲۳ درجه سانتی‌گراد و در شدت نور ٦۰۰۰ لوکس و با فتوپریود ۱٦ ساعت نور و ۸ ساعت تاریکی قرار گرفتند. یک ماه پس از کشت درصد و تعداد گیاهان گیاهان باززا شده بررسی شد.

ریشه‌زایی

گیاهان باززاشده به منظور ریشه‌زایی به محیط کشت MS حاوی غلظت‌های ۰/۵، ۱ و ۲ میلی‌گرم در لیتر NAA و ایندول بوتیریک اسید (IBA) در ترکیب با ۰/۱ و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BA منتقل شدند. یک ماه پس از کشت درصد گیاهان ریشه‌دار شده و تعداد ریشه‌ها بررسی شد.

سازگاری

پس ریشه‌زایی گیاهچه‌هایی که به خوبی رشد کرده بودند به منظور سازگاری از شیشه‌های کشت خارج شده ابتدا برای جداسازی آگار در زیر آب ولرم ریشه‌ها کاملاً شسته شده و سپس در مخلوط پرلیت، پیت موس و کوکوپیت به نسبت ۱:۲:۱ کشت شد. سپس در محفظه‌ای درپوش‌دار که دارای

رطوبت ۹۰ درصد بود، قرار داده شد. پس از ٤ هفته گیاهان سازگار شده از محفظه خارج و به گلخانه منتقل شدند.

آزمون طیف سنجی HPLC (High Pressure Liquid Chromatography)

به منظور سنجش تولید متابولیت تاکسول در کالوس‌های تیمار شده عصاره متانولی به شرح زیر تهیه و توسط دستگاه HPLC مورد آنالیز قرار گرفت. بعد از گذشت ٢٤ ساعت بافت‌های تراریخت در ازت مایع پودر و توسط ۱۰ میلی‌لیتر متانول محلول شد. سپس در دستگاه سونیکاتور قرار داده شد. در این مرحله محلول فیلتر شده و حلال در دمای اتاق خشک شد. مجدد در ۱۰ میلی‌لیتر حلال دی‌کلرومتان: آب با نسبت (حجمی/حجمی) ۱:۱ حل شد. محلول حاصل با ۵۰۰۰ rpm سانتریفیوژ شد. روشناور حاصل در دمای اتاق خشک شد و مجدد در ۱۰۰ میکرلیتر متانول با گرید HPLC حل شد و بعد از عبور دادن از فیلتر ۰/۲ میکرومتر به دستگاه HPLC با مشخصات زیر تزریق شد [۱۷].

- HPLC system (Knauer, Germany).
- C-18 column (Perfectsil Target, ODS3, 5 µm, 250 × 4.6 mm, Teknokrome, Germany).
- Taxol was eluted with a linear gradient of acetonitrile and water (45:55) at a flow rate of 1 mL min-1.
- Taxol detected at 227 nm using a UV detector (K-250, Knauer, Germany).

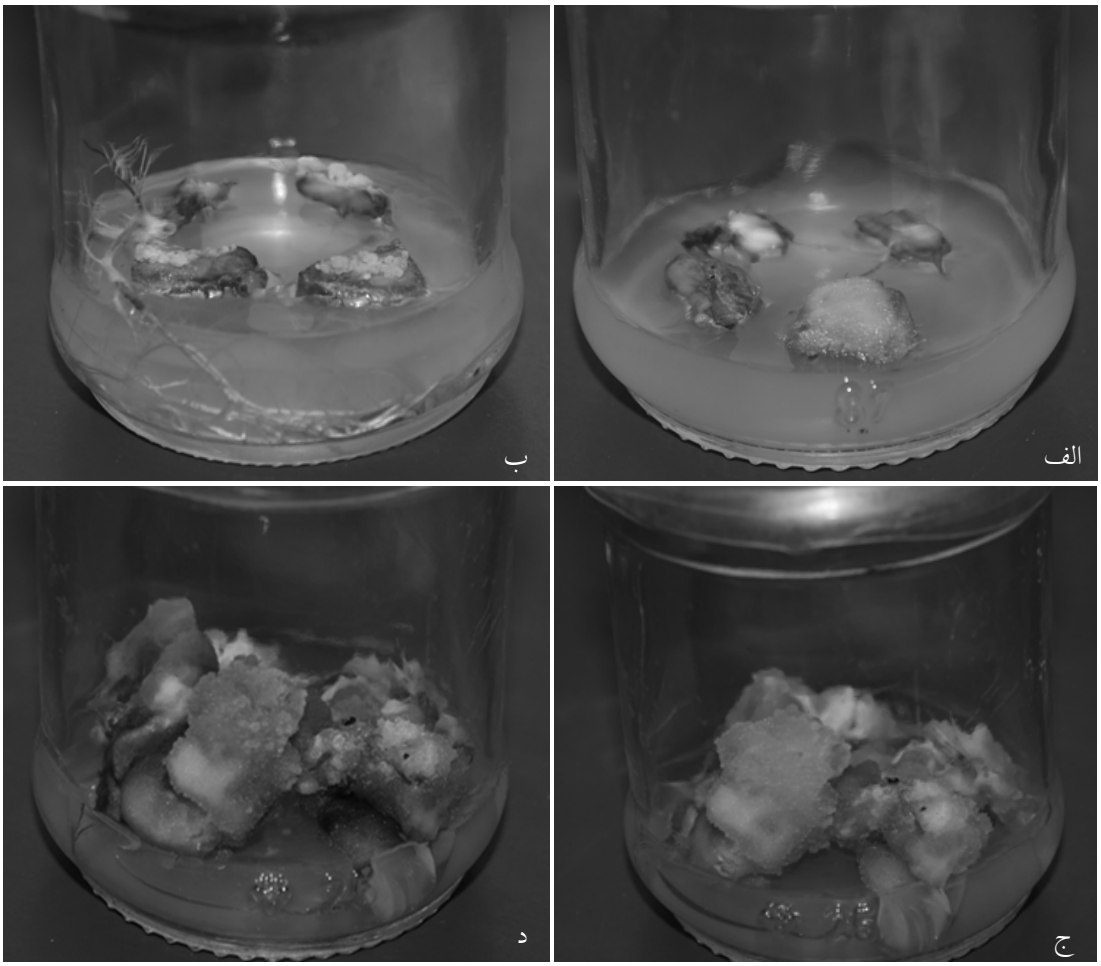
آنالیز آماری

آزمایش به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار که در هر تکرار ۱۰ ریزنمونه قرار داشت انجام شد. به منظور آنالیز آماری داده‌ها از نرم‌افزار MSTATCVersion 2.10 و از آزمون مقایسه میانگین چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ۵ درصد استفاده شد.

نتایج

حدود یک هفته پس از کشت کوتیلدون فندق، ریزنمونه‌ها شروع به متورم شدن کردند و تشکیل کالوس تقریباً بعد از ۱۰ تا ۱۵ روز از کشت بر روی ریزنمونه‌ها مشاهده شد. در محیط کشت MS بدون تنظیم کننده‌های رشد گیاهی و همچنین در محیط حاوی BA رشد کالوس‌ها کندتر بود (شکل شماره ۱- الف). در این تیمارها کالوس‌ها به رنگ سبز و کاملاً فشرده بودند. در تیمارهای حاوی ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BA، بعضی از ریزنمونه‌ها علاوه بر کالوس ریشه نابجا تولید کردند (شکل شماره ۱- ب). در محیط‌های حاوی فقط 2,4-D و 2,4-D همراه با BA کالوس‌ها سریع‌تر رشد کردند. رنگ کالوس کرم روشن و در مناطقی سفید و کالوس‌ها کاملاً نرم بوده (شکل شماره ۱- ج) و با گذشت زمان شروع به قهوه‌ای شدن کردند (شکل شماره ۱- د).

محیط کشت MS و تمام تیمارهای هورمونی در القای کالوس از کوتیلدون فندق مؤثر بودند اما هورمون 2,4-D زمانی که به تنهایی یا در ترکیب با BA استفاده شد نسبت به محیط MS و هورمون BA برتری داشت (جدول شماره ۱). با افزایش هورمون BA در غلظت‌های ۰/۵ و ۱ میلی‌گرم در لیتر به محیط کشت درصد کالزایی افزایش یافت. هورمون 2,4-D هم در غلظت ۰/۵ و هم در غلظت ۱ میلی‌گرم در لیتردر ترکیب با سطوح BA مورد آزمایش (۰، ۰/۵ و ۱ میلی‌گرم در لیتر) حداکثر درصد کالزایی (۱۰۰ درصد) را داشت. مشابه با نتایج ما در مطالعه انجام شده توسط بِستوسو (Bestoso) و همکاران (۲۰۰٦) بر روی کالزایی فندق بیشترین درصد کالزایی به میزان ۷۵ درصد در بذر و ساقه و در تیمارهای حاوی فقط 2,4-D و در ترکیب با BA گزارش شد و BA به تنهایی درصد کالوس پایینی را تولید کرد [٤]. با این حال نتایج بهتری در تیمارهای حاوی BA به تنهایی و هم در محیط های حاوی 2,4-D به حاصل شد. البته در تیمارهای حاوی ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر 2.4-D افزایش BA از ۰ به ۱ میلی‌گرم در لیتر باعث کاهش تدریجی وزن تر شده است. برای رشد بهتر کالوس وجود هورمون‌های اکسین و سیتوکینین لازم است. بیشترین وزن خشک در تیمار هورمونی ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D به تنهایی به دست آمد. در تیمارهای حاوی ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر 2.4-D همراه با ۰، ۰/۵ و ۱ میلی‌گرم در لیتر BA وزن خشک نیز همانند وزن تر کاهش پیدا کرده است ولی این سه تیمار در مجموع تفاوت معنی‌داری با هم نداشتند. محیط کشت‌های حاوی ۱ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D علی‌رغم اینکه بالاترین وزن



شکل شماره ۱- الف: تشکیل کالوس در محیط کشت MS پایه بدون تنظیم کننده‌های رشد گیاهی. ب: تشکیل کالوس در محیط کشت MS حاوی ۰/۵ BA میلی‌گرم در لیتر. ج: تشکیل کالوس در محیط کشت MS حاوی ۱ میلی‌گرم در لیتر 2,4- D. د: شروع به قهوه‌ای شدن کالوس با گذشت زمان

جدول شماره ۱- اثر غلظت‌های مختلف 2,4-D و BA بر درصد کالوس‌دهی، وزن تر و وزن خشک کوتیلدون فندق

ترکیبات هورمونی		کالزایی (درصد)	وزن تر (میلی‌گرم)	وزن خشک (میلی‌گرم)
2,4-D	BA			
۰	۰	۵۵/۶۶۷^{D}	۲۱۸۲/۵۵۰^{D}	۴۳۵/۷۵۰^{F}
۰	۰/۵	۶۴/۳۳۳^{C}	۳۰۷۳/۹۰۰^{D}	۶۵۰/۲۶۷$^{B-D}$
۰	۱	۷۴/۶۶۷^{B}	۲۴۴۲/۷۰۰^{D}	۵۴۴/۵۵۰^{E}
۰/۵	۰	۱۰۰/۰۰۰^{A}	۱۳۰۰۵/۷۰۰^{AB}	۷۵۶/۰۳۳^{A}
۰/۵	۰/۵	۱۰۰/۰۰۰^{A}	۱۱۹۱۰/۱۳۳^{B}	۷۱۹/۳۳۳^{AB}
۰/۵	۱	۱۰۰/۰۰۰^{A}	۱۰۴۶۴/۳۶۷^{C}	۷۰۳/۶۵۰$^{A-C}$
۱	۰	۱۰۰/۰۰۰^{A}	۱۳۷۳۵/۴۵۰^{A}	۵۵۴/۸۵۰^{DE}
۱	۰/۵	۱۰۰/۰۰۰^{A}	۱۴۰۸۸/۷۰۰^{A}	۶۰۶/۱۶۷$^{C-E}$
۱	۱	۱۰۰/۰۰۰^{A}	۱۴۴۷۷/۸۳۳^{A}	۵۹۸/۰۰۰^{DE}

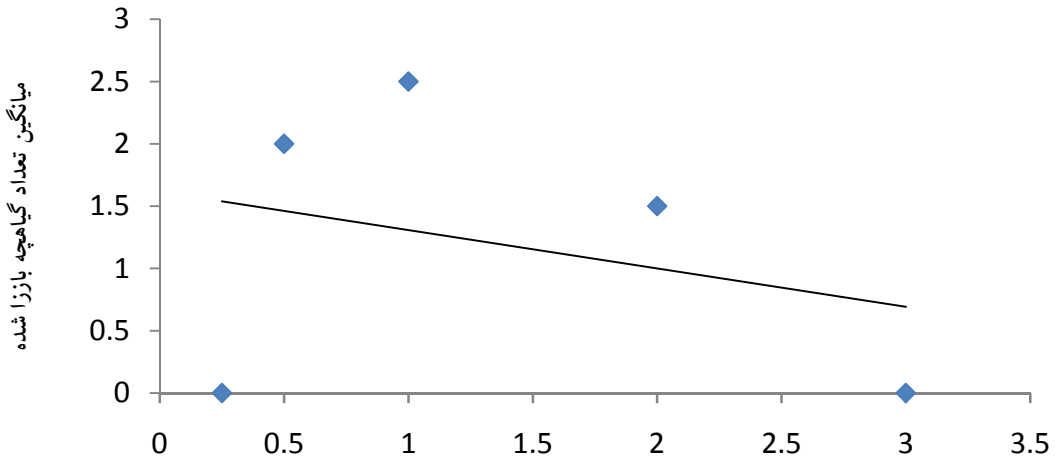
تر را به دست دادند ولی وزن خشک پایین‌تری نسبت به ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D دارند که می‌تواند حاکی از تشکیل کالوس‌های آبکی تر در حضور اکسین زیاد باشد که با خشک شدن آب بیشتری از دست داده و وزن خشک کمتری خواهند داشت. در مجموع با توجه به جدول مقایسه میانگین بر اساس آزمون چند دامنه‌ای دانکن در مورد درصد کالوس‌دهی، وزن تر و وزن خشک کالوس کوتیلدون فندق می‌توان گفت محیط کشت حاوی ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D نتایج مطلوبی در همه موارد نشان داد.

با افزایش غلظت BA از ۰/۲۵ تا ۱ میلی‌گرم در لیتر تشکیل ساقه افزایش پیدا کرده به طوری که بیشترین تعداد ساقه‌چه باززایی شده در غلظت ۱ میلی‌گرم در لیتر BA به دست آمده است (شکل شماره ۲، شکل شماره ۳- الف) و با افزایش بیشتر غلظت BA به تدریج از تعداد ساقه‌چه‌های باززا شده کاسته شده است به طوری که در غلظت ۳ میلی‌گرم در لیتر BA هیچ ساقه‌ای از کالوس‌ها تشکیل نشده است. به علاوه در تیمار هورمونی حاوی ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D ساقه‌چه باززا شده مشاهده شد.

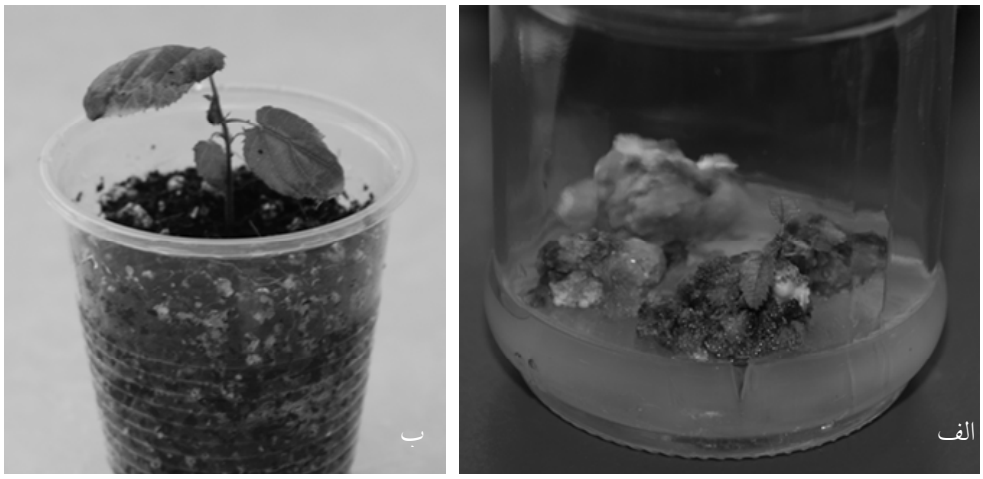
گیاهچه‌های باززا شده با طول ۵ سانتی‌متر تحت تأثیر تیمارهای مختلف هورمونی NAA و IBA در ترکیب با BA به منظور ریشه‌زایی قرار داده شدند. از بین تیمارهای هورمونی استفاده شده تنها در غلظت ۲ میلی‌گرم در لیتر NAA در ترکیب با ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BA ریشه‌زایی مشاهده شد.

به منظور سازگاری گیاهچه‌های تولید شده بعد از خروج از شرایط درون شیشه‌ای با آب ولرم بقایای محیط کشت از ریشه‌های آنها جدا و در مخلوطی از پرلیت، پیت موس و کوکوپیت به نسبت ۱:۲:۱ کشت شده (شکل شماره ۳- ب) و به محفظه‌ای درپوش‌دار با رطوبت نسبی ۹۰ درصد انتقال داده شدند. پس از ٤ هفته گیاهان سازگار شده از محفظه خارج و در گلخانه استقرار داده شدند.

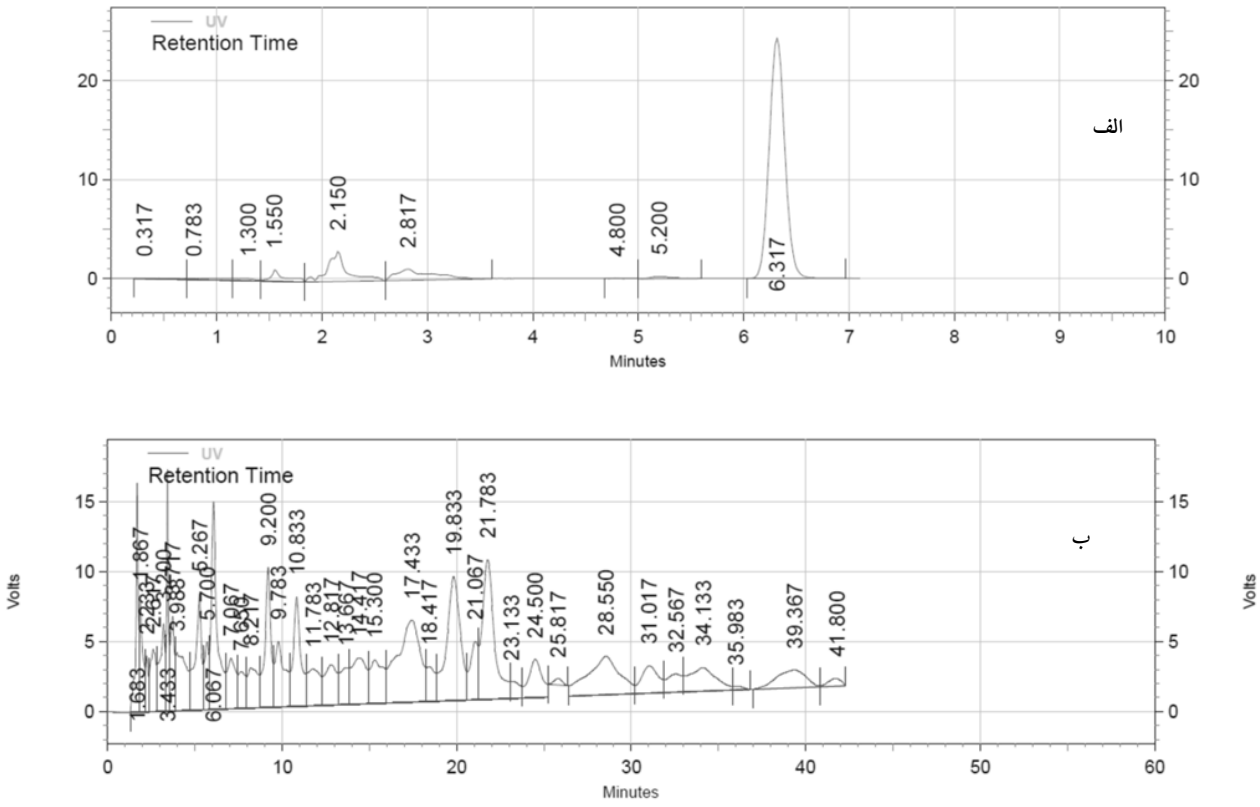
در آزمایش دیگر کالوس‌های به دست آمده در تیمار هورمونی حاوی ۱ میلی‌گرم در لیتر هورمون‌های BAP و 2,4-D که بیشترین وزن تر کالوس را داشتند به منظور القای الیسیتور انتخاب شدند و پس از ۳ بار واکشت به محیط کشت MS حاوی غلظت‌های مختلف متیل جاسمونات انتقال یافتند. آنالیز فیتوشیمیایی کالوس‌های تیمار شده حاکی از تولید تاکسول بود (شکل شماره ٤). مقایسه میانگین غلظت‌های مختلف متیل جاسمونات نشان داد که افزایش غلظت متیل جاسمونات باعث افزایش معنی‌داری در میزان تولید تاکسول شد. به طوری که بیشترین میزان تاکسول ۱٦/۷ در تیمار حاوی ۱۳۰ میکرو مولار متیل جاسمونات مشاهده شد (شکل شماره ۵).



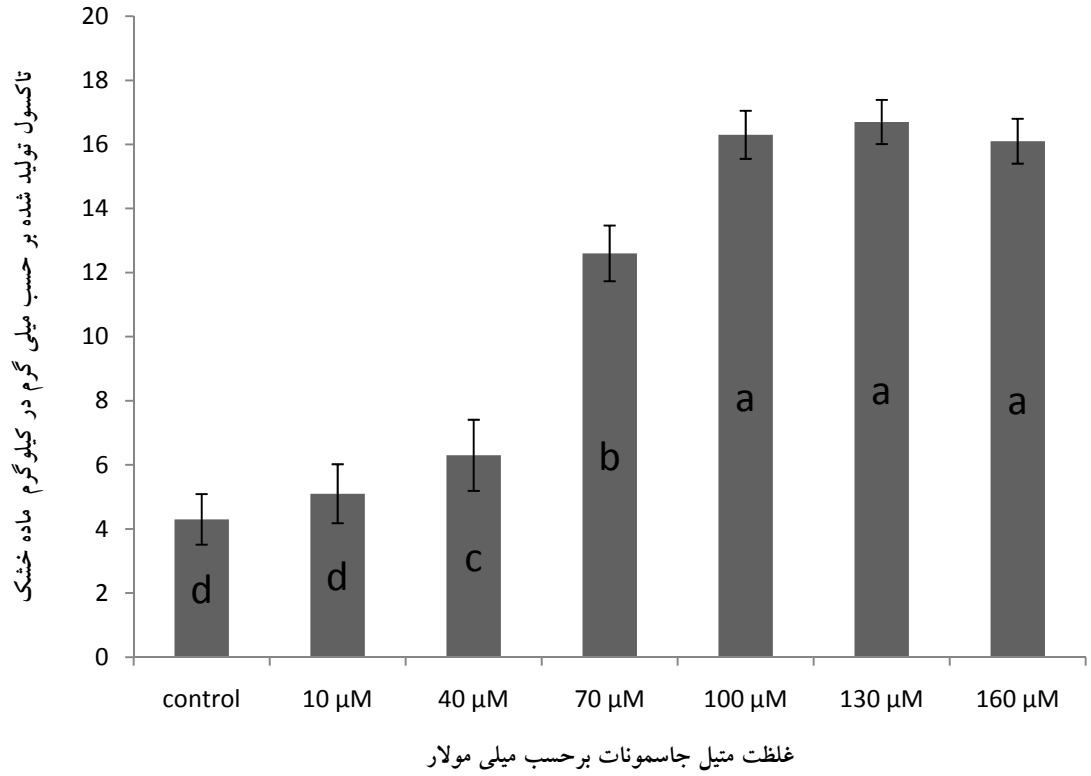
شکل شماره ۲- نمودار اثر غلظت‌های مختلف هورمون BA بر باززایی گیاه فندق



شکل شماره ۳- الف: باززایی ساقه‌چه از کالوس در محیط کشت MS حاوی ۱ میلی‌گرم در لیتر BA. ب: سازگاری گیاهچه ریشه‌دار شده



شکل شماره ٤- استاندارد تاکسول RT=6.317 (الف)، آنالیز فیتوشیمیایی کالوس تیمار شده با متیل‌جاسمونات ۱۳۰ میکرمولار RT=6.2 (ب)



شکل شماره ۵- اثر غلظت‌های مختلف متیل جاسمونات بر تولید تاکسول

بحث

این نتایج نشان می‌دهد که کوتیلدون فندق در محیط بدون هورمون نیز مقدار کالوس کمی تشکیل می‌دهد ولی برای کالوس‌دهی مطلوب وجود هورمون‌های 2,4-D و BA ضروری است. برای القا کالوس‌هایی با قابلیت باززایی وجود هر دو هورمون اکسین و سیتوکینین ضروری است [۱۸]. فعال‌سازی سلول‌های بدنی و آغاز فاز چرخه سلولی برای القای کالزایی نیازمند هورمون‌های برون‌زا به ویژه اکسین‌ها و ستیوکینین‌ها می‌باشد [۱۹]. گپی (Gopi) و پونموروگان (Ponmurugan) (۲۰۰۶) بالاترین مقدار کالزایی از برگ ریحان را در محیط کشت MS حاوی ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D و ۱ میلی‌گرم در لیتر BAP گزارش کردند [۲۰]. همچنین ترکیب مشابهی از اکسین و سیتوکینین برای القای کالوس به وسیله دُده (Dode) و همکاران (۲۰۰۳) و یاسمین (Yasmin) و همکاران (۲۰۰۱) گزارش شده است و نشان می‌دهد که ترکیبات 2,4-D و BAP برای القای کالوس‌های فشرده برای جنین‌زایی ضروری است [۲۲، ۲۱]. افزایش 2,4-D به محیط کشت باعث افزایش وزن تر شد. افزایش 2,4-D از ۰/۵ به ۱ باعث رشد بهتر کالوس و وزن تر بیشتری شد به طوری که بیشترین وزن تر کالوس در تیمارهای محتوی ۱ میلی‌گرم در لیتر 2.4-D به دست آمد.

سیتوکینین‌ها مستقیماً در دامنه وسیعی از فعالیت‌های بیوشیمیایی از عملکردهای فیزیولوژیکی درگیر هستند که منجر به نتایج مورفولوژیکی و هیستولوژیکی بسیار ناهمگن می‌شود. آنها همچنین نقش مهمی در القای تشکیل کلروفیل و القای شاخساره در کشت بافت گیاهی بازی می‌کنند [۲۳]. سیتوکینین BA به طور معمول برای القای اندام‌زایی در بسیاری از گیاهان استفاده شده است [۲٤]. یک مقایسه‌ای از اثر بخشی نسبی

سیتوکینین‌های مختلف برای تشکیل ساقه چندگانه به ترتیب اثر بخشی BA > Kn >Zeatin> Adenine را نشان داد [۲۵]. در مطالعه انجام شده توسط سوجادا (Sujatha) و رانجیداکوماری (RanjithaKumari) در سال ۲۰۰۷ روی ریزازدیادی *Artemisia vulgaris* انجام شد، نتایج نشان داد که BA نسبت به کینیتین (Kn) برتری دارد و غلظت‌های بالای آن تعداد ساقه و درصد پاسخ‌دهی را کاهش می‌دهد [۲٤]. هو (Hu) و وانگ (Wang) (۱۹۸۳) گزارش کردند که غلظت‌های بالاتر سیتوکینین تعداد ساقه‌های تکثیر شده را کاهش می‌دهد [۲٦]. نتایج مشابهی نیز به وسیله ایندهرا (Indhra) و دهار (Dhar) (۲۰۰۰) مشاهده شد [۲۷]. در اینجا نیز القای ساقه را در غلظت‌های ۰/۵، ۱ و ۲ میلی‌گرم در لیتر BA مشاهده شد و در غلظت‌های کمتر از ۰/۵ و بیشتر از ۲ میلی‌گرم در لیتر هیچ ساقه‌ای تشکیل نشد.

در مطالعه‌ای که توسط سوبایها (Subbaiah) و مینوچا (Minocha) (۱۹۹۰) روی باززایی ساقه در اکالیپتوس گونه tereticornis انجام شد. بیشترین القای ساقه در غلظت ۰/۵ BA میلی‌گرم در لیتر به دست آمد و در غلظت‌های کمتر از ۰/۵ و بیشتر از ۳ میلی‌گرم در لیتر هیچ ساقه‌ای تشکیل نشد [۲۸]. مورالیدهاران (Muralidharan) و ماسکارنهاس (Mascarenhas) (۱۹۷۸) نیز نتایج مشابهی را در *Eucalyptus. camaldulensis* به دست آوردند [۲۹]. دیالو (Diallo) و دوهوکس (Duhoux) (۱۹۸٤) القای ساقه از کالوس کوتیلدونی *E. Camaldulensis* را با ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BA گزارش کردند [۳۰].

در تحقیقی که روی ریزازدیادی فندق توسط گاأ (Gao) و همکاران (۲۰۰۸) انجام شد، ریشه‌زایی در محیط کشت MS ½ حاوی ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر NAA گزارش شد [۱٦]. ناس (Nas) و رِد (Read) (۲۰۰٤) ریشه‌زایی فندق را به وسیله فرو بردن ساقه‌ها به مدت ۵ و ۱۰ ثانیه در محلول ppm ۱۰۰۰، IBA و سپس کشت در محیط NRM بدون هورمون گزارش کردند [۳۱]. گیاهان چوبی نه تنها برای کشت با سختی مواجه‌اند بلکه مشکلات ریشه‌زایی و سازگاری گیاهچه‌های تولید شده در شیشه، برداشت از کشت و تجاری‌سازی بعدی آن را پیچیده کرده است. ریشه‌زایی یک مرحله بسیار سخت در ریزازدیادی گیاهان چوبی است، اما درصدهای ریشه‌زایی مناسب و مطمئن برای ایجاد یک برنامه ریزازدیادی اقتصادی همیشه امکان‌پذیر نیست [۳۲].

افزایش تولید تاکسول با افزایش میزان غلظت متیل جاسمونات پاسخ زیستی سلول‌های گیاه فندق به این محرک زیستی است. مشابه با نتایج به دست آمده رضایی و همکاران ۱۳۹۰ نشان دادند که متیل جاسمونات به تنهایی و یا در ترکیب با سایر الیسیتورها باعث افزایش تولید تاکسول در گیاهان می‌شود. همچنین تولید تاکسان‌ها، از جمله تاکسول در کشت‌های تعلیقی فندق تحت اثر محرک‌های متیل جاسمونات و کیتوزان پس از ٦۰ روز افزایش نشان داد [۳۳].

نتیجه‌گیری

در این پژوهش اثر تیمارهای هورمونی مختلف بر کالزایی و باززایی گیاه فندق بررسی شد و با توجه به نتایج به دست آمده تیمار حاوی ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر هورمون 2,4-D بهترین تیمار برای القای کالوس در گیاه بود. همچنین محیط MS حاوی ۱ میلی‌گرم در لیتر BAP بیشترین تأثیر را بر افزایش تولید کالوس داشت. ریشه‌زایی نیز تنها در محیط MS با ۲ میلی‌گرم در لیتر هورمون NAA و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BA رخ داد. همچنین از نتایج به دست آمده می‌توان به عنوان روشی کاربردی در بهینه‌سازی کشت‌های سوسپانسیون سلولی فندق برای افزایش تولید متابولیت ثانویه تاکسول و همچنین باززایی کالوس‌های تراریخت استفاده نمود. از سوی دیگر با توجه به مشکلات موجود در ریشه‌زایی گیاهچه‌های باززا شده از طریق کالوس، پژوهش‌های بیشتری در فرآیند ریشه‌زایی، سازگاری و انتقال این گیاه ضروری است.

منابع

1. Olsen J. Growing hazelnuts in the pacific northwest. Published by Oregon state university, Extension service. USA. 2003, pp: 1 - 45.

2. Hoffman A, Khan W, Worapong J, Strobel G, Griffin D, Arbogast B, Barofsky B, Boone D, Ning RB, Zheng P and Daley L. Bioprospecting for taxel in angiosperm plant extracts: Using high performance chromatography- themospray mass spectrometry to detect the anticancer agent and its related metabolites in filbert trees. *Spectroscopy* 1998; 13: 22 - 32.

3. Ottaggio L, Bestoso F, Armiroti A, Balbi A, Damonte G, Mazzei M, Sancandi M and Miele M. Taxanes from Shells and Leaves of Corylusavellana*. J. Natural Product*. 2008; 71 (1): 58 - 60.

4. Bestoso F, Ottaggio L, Armirotti A, Balbi A, Damonte G, Degan P, Mazzei M, Cavalli F, Ledda B and Miele M. In vitro cell cultures obtained from different explants of Corylusavellana produce Taxol and taxanes. *Biomedcentral Biotechnol*. 2006; 6: 1 - 11.

5. Hoffman A and Shahidi F. Paclitaxel and other taxanes in hazelnut. *J. Functional Food* 2008; 1: 33 - 7.

6. Andres H, Fernandez B, Rodriguez R and Rodrigues A. Phytohormone contents in corylusavelana and their relationship to age and other developmental processes*. Plant Cell, Tissue and Organ Cultur*. 2002; 70: 173 - 80.

7. Nas NN and Read PE. A hypothesis for the development of defined tissue culture medium of higher plants and micropropagation of hazelnuts. *Scientia Horticulturae* 2004; 101: 189 - 200.

8. Murch SJ, KrishnaRaj S and Saxena PK. Phytomaceuticals:Mass production, standardization and conservation. *Sci. Rev. Alternative Med*. 2000; 4: 39 - 43.

9. Tejavathi DH and Shailaja KS. Regeneration of plants fromthe cultures of Bacopamonnieri (L.) Pennell. *Phytomorphol*. 1999; 49 (4): 447 - 52.

10. Geng S, Ma M, Ye HC, Liu BY, Li GF and Cong K. Effect of ipt gene expression on the physiological and chemicalcharacteristics of *Artemisia annua* L. *Plant Sci*. 2001; 160: 691 - 8.

11. Rezaei A, Ghanati F and Behmanesh M. Increased taxol production and release by methyl jasmonate, ultrasound, and dibutyl phthalate in hazelnut (*Corylus avellana* L.) cell culture. *I.J.P.B*. 2011; 3 (7): 55 - 72.

12. Aygun A, San B and Erdogan V. Induction of somatic embryogenesis from immature cotyledons in Tambul Hazelnut. *Tarim Bilimleri Dergisi* 2009; 15 (2): 113 - 18.

13. Berros B, Alvarez B and Rodriguez R. Effect of putrescine- synthesis inhibitors on somatic embryogenesis in hazelnut. *Angewandte Botanik* 1997; 71 (3): 90 - 3.

14. Sanchez-Olate M, Saez P, Cartes P, Alvarez C and Rios D. Comparison of root induction in mature filbert (*Corylusavellana*) explants by Agrobacterium rhizogenesis and indolbutiric acid. *Chilean Journal of Agricultural Res*. 2009; 69 (1): 107 - 11.

15. Bacchetta L, Bernardini C, Di Stefano G, Pelliccia O, Cavicchioni G and Bonito R. Molecular characterization by RAPDS and micropropagation of Italian hazelnut cultivars. Proceedings ofthe VIth International Congress on Hazelnut. 2005, pp: 99 - 104.

16. Gao XH, Liu JN and Ling Q. Tissue culture and rapid propagation of hybrid hazelnut (*Corylusheterophylla* C. avellana).* Acta Horticulturae 2008, pp: 207 - 11.

17. Bemani E, Ghanati F, Broujeni LY and Khatami F. Antioxidant Activity, Total Phenolics

and Taxol Contents Response of Hazel (*Corylus avellana* L.) Cells to Benzoic Acid and Cinnamic Acid. *Not Bot Horti Agrobo* 2012; 40 (1): 69 - 73.

18. Skoog F and Miller CO. Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured *in vitro. Symp. Soc. Exp. Biol.* 1957; 11: 118 - 30.

19. Pola SR and Sarada MN. Somatic embryogenesis and plantlet regeneration in *Sorgum bicolor* (L.) Moench, from leaf segments. *J. Cell Molecular Biol*. 2006; 5: 99 - 107.

20. Gopi C and Ponmurugan P. Somatic embryogenesis and plant regeneration from leaf callus of Ocimumbasilicum L. *Journal of Biotechnol*. 2006; 126: 260 - 4**.**

21. Dode LC, Bobrowski VL, Brage, EJB, Seixas FK and Schunch W. In vitro propagation of *Ocimum basilicum* L*. Maringa*. 2003; 25: 435 - 7.

22. Yasmin R, Javid F and Arfan M. Somatic embryogenesis in callus culture of wheat *Triticumae stivum* L. *International Journal of Agriculture and Biology*. 2001; 3: 163 - 6.

23. Sarin R and Bansal N. Impact of growth regulators on Callus production of two medicinal plants viz. *Adhatodavasica* and *Ageratum conyzoides*., *International Journal of Research in Plant Sci*. 2011; 1 (1): 1 - 8.

24. Sujatha G and Ranjitha Kumari BD. Effect of phytohormones on micropropagation of *Artemisia vulgaris* L. *Acta Physiol. Plant*. 2007; 29: 189 -95.

25. Shiva PN, Deepak P and Neera BS. Regeneration of pigeon pea (Cajanuscajan) from cotyledonary node via multiple shoot formation. *Plant Cell Rep*. 1994; 13: 623 - 7.

26. Hu CY and Wang PJ. Meristem shoot tip and bud culture. In:Evans DA, Sharp WR, Ammirato PV, Yamada Y (eds) Handbook of plant cell culture. Macmillan, New York. 1983, pp: 177 - 227.

27. Indhra DB and Dhar U. Micropropagation of Indian wildstrawberry. *Plant Cell Tiss Org Cult*. 2000; 60: 83 - 8.

28. Subbaiah MM and Minocha SC. shoot regeneration from stem and leaf callus of Eucalyptus tereticornis. *Plant Cell Report* 1990; 9: 370 - 3.

29. Muralidharan EM and Mascarenhas AF. In vitro plantlet formation by organogenesis in E. camaldulensis and by somatic embryogenesis in Eucalyptus citiodora. *Plant Cell Reports* 1987; 6: 256 - 9.

30. Diallo N and Duhoux E. Organogenesis and Multiplication (*in vitro*) of *Eucalyptus camaldulensis*. *J. Plant Physiol*. 1984; 115: 177 - 82.

31. Nas MN and Read PE. Improved rooting and accilimatization of micropropagated hazelnut shoots. *Hortscience* 2004; 39 (7): 1688 - 90.

32. Gonzalez A, Casares A, Sanchez TR and Rodriguez R. Adventitious root induction in *corylus avellana* L. cotyledon slices., *In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant*. 1991; 27(3): 125 - 31.

33. Rezaei A, Ghanati F, Behmanesh M. Methyl jasmonate-induced biosynthesis of taxol and expression of certain related genes by Hazelnut (*Corylus avellana* L.) cells. *Planta Med*. 2011; 77 - PI14.

The Methyl Jasmonat Elicitaion and Taxol Production in *Corylus avellana* L., under *Invitro* Culture Condition

Ebrahimi Ch (M.Sc.)[1], Solouki M (Ph.D.)[1], Omidi M (Ph.D.)[2], Forootan M (Ph.D)[1], Zare AR (M.Sc.)[3], Mehrafarin A (Ph.D.)[3], Qaderi A (Ph.D.)[3*]

1- Department of Plant Breeding and Biotechnology, Faculty of Agriculture, University of Zabol, Zabol, Iran
2- Department of Agronomy and Plant Breeding, Faculty of Agriculture, University of Tehran, Karaj, Iran
3- Medicinal Plants Research Center, Institute of Medicinal Plants, ACECR, Karaj, Iran
*Corresponding author: Medicinal Plants Research Center, Institute of Medicinal Plants, ACECR, P.O.Box: 31375-1369, Karaj, Iran
Tel: +98-26-34764010-18, Fax: +98-26-34764021
E-mail: Ardeshir582008@gmail.com

Abstract

Background: Hazelnut (*Corylus avellana*) is a species belonging to the genus *Corylus*. Its various segments contain different metabolites with very valuable medicinal, anti-microbial and anti-cancer properties.

Objective: The present study was done to investigation the optimal conditions for hazelnut plants regenerated from cotyledon as explants and invitrotaxol production.

Methods: Cotyledon segments were cultured on MS medium containing 2,4-D concentrations of 0, 0.5 and 1 mgl^{-1} alone or in combination with concentrations of 0, 0.5 and mgl^{-1} BA for callus induction. For regeneration, Calli were sub-cultured to the same medium and or transferred to the MS medium containing BA at concentrations of 0, 0.25, 0.5, 1, 2 and 3 mgl^{-1} Callus was formed in all hormonal treatments. The ability of taxol production in calli was evaluated by adding methyl jasmonat in 0, 10, 40, 70, 100, 130 and 160 µM concentrations.

Results: In hormonal treatment including 0.5 mgl^{-1} 2.4-D regeneration was observed. The highest Taxol content (16.7 mg/KgDW) was obtained by adding 130 µM methyl jasmoante against of 4.3 mg/KgDW in control condition. In regenerative treatments maximum number of regenerated shoot (2.5) was in 1 mgl^{-1} BA. The regenerated shoots were rooted in MS medium containing 2 mg NAA in combination with 0.5 mgl^{-1} BA. After rooting process, the plantlets with suitable growth (10 cm length) were planted in the mixture of perlite: peat: cocopit in a 1:2:1 ratio and than were placed in a box with a humidity of 90%. The adapted plants were transferred to greenhouse after 4 weeks.

Conclusion: This study can be applied as an effective method for callus induction in order to establishment of suspension culture to taxol production and also results can be useful for regeneration of transgenic calli.

Keywords: *Corylus avellana* L., Callus induction, Regeneration, Taxol production