تولید سوسپانسیون سلولی از ارقام توتون شرقی (*Nicotiana tabacum*) به منظور تولید لاین سلولی

Production of Cell Suspensions from Oriental Tobacco (*Nicotiana tabacum*) Cultivars for Cell Line Development

سعید سالاری‌پور[۱]، قاسم کریم‌زاده[۲*]، احمد معینی[۲] و سعید ترکش اصفهانی[۳]

تاریخ دریافت: ۹۲/۰۳/۱۵ تاریخ پذیرش: ۹۳/۰۶/۲۴

چکیده

کشت سوسپانسیون سلولی، تعلیقی از سلول‌های در حال رشد و تقسیم سریع می‌باشد که در محیط مایع کشت می‌شوند. سلول‌ها در سوسپانسیون سلولی از قدرت تقسیم بسیار بالاتری نسبت به کالوس‌ها برخوردار می‌باشند. این قابلیت سلول‌ها برای اهداف متنوعی مانند تولید لاین‌های سلولی، تولید متابولیت‌های ثانویه، بررسی مراحل چرخه سلولی، افزایش راندمان انتقال ژن و مطالعات تنش‌های زیستی و غیرزیستی مورد استفاده قرار می‌گیرد. در این بررسی، کالوس از بذور نه رقم از توتون‌های شرقی (*Nicotiana tabacum* L.) در محیط MS حاوی هورمون‌های NAA ۱ $mg.l^{-1}$ و Kinetin ۱ $mg.l^{-1}$ تهیه گردید. سپس میزان و کیفیت رشد در محیط‌های مختلف مورد آزمون قرار گرفت. بهترین میزان و کیفیت رشد برای ارقام OR-209، OR-205 و PDB 328 در محیط‌کشت LS با تیمارهای هورمونی IAA ۳ $mg.l^{-1}$، NAA ۳ $mg.l^{-1}$ و Kinetin ۰/۱ $mg.l^{-1}$ به‌دست آمد. اثر انواع محیط‌های کشت و ترکیبات مختلف هورمونی بر روی سوسپانسیون سلولی حاصل نیز آزمون گردید. بهترین رشد مربوط به رقم OR-209 در محیط‌کشت LS مایع با همان تیمار هورمونی بود. در آخر، سوسپانسیون سلولی تولید شده از نظر سرعت رشد با لاین سلولی TBY-2 مقایسه گردید که مشابهت بسیار بالایی نشان داد. این نتیجه بیانگر امیدبخش بودن ارقام توتون شرقی برای تولید لاین‌های سلولی و بهره‌برداری از آن‌ها برای اهداف پژوهشی و کاربردی می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: کشت بافت، توتون شرقی (*Nicotiana tabacum*)، لاین سلولی، همزمان‌سازی رشد

---

۱. دانشجوی کارشناسی‌ارشد گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران

۲. دانشیاران گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران

۳. دانشجوی دکتری گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران

*: نویسنده مسوول Email: karimzadeh_g@modares.ac.ir

قسمتی از پایان‌نامه کارشناسی‌ارشد با عنوان القای همزمان‌سازی سلولی در توتون شرقی (*Nicotiana tabacum*)، دانشکده کشاورزی دانشگاه تربیت مدرس

مقدمه

کشت سوسپانسیون سلولی، تعلیقی از سلول‌های در حال رشد و تقسیم سریع می‌باشد که در محیط مایع کشت می‌شوند و از انعطاف‌پذیری بیشتری در پاسخ به دستورزی‌های آزمایشگاهی برخوردارند. کشت سوسپانسیونی مطلوب که به‌طور کامل از سلول‌های منفرد تشکیل شده باشد، به‌ندرت حاصل می‌شود. بیشتر سوسپانسیون‌های سلولی از مخلوطی از توده‌های سلولی و نیز سلول‌های منفرد پراکنده تشکیل شده‌اند. با وجود این از طریق چندین نسل گزینش و واکشت کردن می‌توان یک کشت سوسپانسیون سلولی متشکل از تک‌سلول‌ها و توده‌های سلولی کوچک را ایجاد و نگهداری کرد (خسروشاهلی و بهنامیان، ۱۳۸۶). اولین بار کشت سوسپانسیون موفق بر روی چند نوع سلول گیاهی توسط *کاپلین و استوارد* (Caplin and Steward, 1949) انجام شد و در پی آن *مویر* و همکاران (Muir *et al*., 1954) و *نیکل* (Nickell, 1956) نشان دادند که این روش تقریباً در تمام موجودات دیگر می‌تواند کاربرد داشته باشد. *تولک و نیکل* (Tulecke and Nickell, 1959) متوجه شدند که علاوه‌بر این که در این سیستم امکان تولید مقدار زیادی بافت سلولی گیاهی وجود دارد، بیوسنتز متابولیت‌های ثانویه‌ای مثل آلکالوئیدها و استروئیدها نیز در این سیستم امکان‌پذیر است. کشت سوسپانسیون سلولی یکی از راهکارهای جدید برای تولید پروتئین‌های نوترکیب و متابولیت‌های ثانویه و دارویی و مطالعات سیتوژنتیکی در عصر حاضر می‌باشد *شیه و دوران*؛ *براندسما* و همکاران (Shih and Doran, 2009; Brandsma *et al*., 2010). در مقایسه با بسیاری از سیستم‌های گیاهی کشت سوسپانسیون سلولی مزایای بسیاری دارد که به‌عنوان مثال می‌توان به چرخه سلولی کوتاه، عدم وابستگی به شرایط محیطی مثل آب و هوا، کیفیت خاک، فصل، طول روز و ایمنی زیستی بالا مثل عدم فرار ژن توسط دانه گرده و عدم امکان آلودگی باکتریایی از گیاهان موجود در محیط اشاره کرد *زو* و همکاران (Xu *et al*., 2011). شرایط کنترل شده و استریل محیط‌کشت مایع سیستم کشت سوسپانسیون گیاهی را به شیوه مناسبی از تولید تبدیل کرده است *هوانگ و مک‌دونالد* (Huang and McDonald, 2009). به‌علاوه اگر پروتئین‌ها و یا متابولیت‌های تولید شده توسط سوسپانسیون سلولی به داخل محیط‌کشت ترشح شوند، تخلیص آن بسیار ساده‌تر انجام می‌گیرد. زیرا دیگر نیازی به جمع‌آوری و تخریب و یکنواخت کردن سلول‌ها نمی‌باشد (*شیه و دوران*، 2009). لاین سلولی TBY-2 یکی از معروف‌ترین لاین‌های سلولی می‌باشد که در دنیا تحقیقات گسترده‌ای روی آن انجام شده و یا در حال انجام است *هوانگ* و همکاران؛ *سوئن* و همکاران (Huang *et al*., 2009; Suen *et al*., 2010). کشت سوسپانسیون سلولی در گونه‌های مختلف گیاهی به یک ابزار مناسب برای تحلیل فیزیولوژی سلول‌های گیاهی، باز تولید پروتوپلاست، تولید سلول‌های تراریخت و ریخت‌شناسی سلولی تبدیل شده است *لوهرس و لورز* (Lührs and Lörz, 1988). کشت کالوس جهت استفاده در مطالعه الگوهای رشدی و تولید، به‌دلیل محدودیت‌هایی که از نظر یکنواختی تولید سلول و نیز دسترسی یکنواخت تک‌تک سلول‌ها به اکسیژن و مواد غذایی دارد، در مقایسه با سوسپانسیون سلولی از قابلیت کمتری برخوردار است *لوکمانول حکیم* و همکاران (Lukmanul Hakkim *et al*., 2011).

سوسپاسیون سلولی معمولاً با انتقال قطعاتی از کالوس به یک محیط‌کشت مایع بوجود می‌آید. این محیط‌های کشت باید مرتباً توسط یک تکان‌دهنده حرکت داده شوند تا سلول‌ها هوادهی شوند و از تجمع مواد سمی در یک نقطه جلوگیری شود. سلول‌های کالوس در نتیجه چرخش مداوم محیط‌کشت به تدریج از یکدیگر جدا می‌شوند. قابلیت تشکیل سوسپانسیون سلولی در گونه‌ها و جنس‌های مختلف گیاهان کاملاً متفاوت می‌باشد. زیرا ساختار دیواره سلولی به‌ویژه تیغه میانی سلول‌ها نقش مهمی در جدا شدن آن‌ها از یکدیگر دارد. برای جداسازی سلول‌های کالوس و تشکیل سوسپانسیون سلولی می‌توان مقداری آنزیم پکتیناز به محیط‌کشت افزود. همچنین برای افزایش شکنندگی و تردی کالوس و ایجاد یک سوسپانسیون خوب، از نسبت بالای اکسین به سیتوکینین در محیط‌کشت استفاده می‌شود *احسانپور و امینی* (Ehsanpour and Amini, 2003). سلول‌هایی که در محیط مایع از هم جدا شده و رشد کرده‌اند، توانایی ایجاد یک گیاه کامل را دارا می‌باشند *آلان* (Allan, 1991). سلول‌های واقع در سوسپاسیون سلولی از قدرت تقسیم بسیار بالاتری نسبت به کالوس‌ها برخوردارند، در واقع سرعت بالای تقسیم سلولی و همگنی و همشکلی بالای سلول‌ها از مشخصات یک سوسپانسیون سلولی مطلوب به‌شمار می‌روند *فیلیپس* و همکاران (Phillips *et al*., 1995).

رشد سریع و بافت خوب کشت‌های سلول گیاهی، می‌تواند یک جمعیت سلولی همشکل و مناسب برای مطالعات بیولوژیکی در گیاهان تولید کند. یکی از مهم‌ترین کاربردهای کشت سوسپانسیون سلولی، استفاده از آن در فرایند همزمان‌سازی سلولی و تولید لاین‌های سلولی است. همزمان‌سازی چرخه سلولی برای مطالعه خواص سلول‌ها، فرایندهای بیولوژیکی و شناسایی مکانیزم‌های ژنتیکی

تنظیم‌کننده هر یک از فازهای مختلف چرخه سلولی و تقسیم سلولی، اهمیت زیادی دارد *لی* و همکاران (Lee *et al*., 2011). به‌طور معمول، سلول‌ها از طریق جلوگیری از همانندسازی DNA در فاز S چرخه سلولی همزمان‌سازی می‌شوند. این کار با استفاده از روش‌های مختلفی از قبیل افزودن مواد شیمیایی مانند هیدروکسی‌اوره، متوترکسات و آفیدیکولین به محیط‌کشت سلول‌ها انجام می‌گیرد. روش همزمان‌سازی یک لاین سلولی گیاهی مانند لاین BY-2 در توتون، متکی بر یک استراتژی دستگیری و آزادسازی با استفاده از آفیدیکولین و یک ماده تخریب‌کننده میکروتوبول‌ها به نام پروپیزامید می‌باشد *کوماگای- سانو* و همکاران (Kumagai-Sano *et al*., 2007). با استفاده از یک فرایند یک‌مرحله‌ای که در آن فقط از آفیدیکولین استفاده شود، می‌توان یک جمعیت سلولی تولید کرد که ۷۰٪ از سلول‌های آن در مرحله میتوز قرار دارند. اما با روش دو مرحله‌ای که از هر دو ماده بازدارنده فوق به‌طور متوالی استفاده شود، این یکنواختی به بیش از ۹۰٪ می‌رسد.

مزیت مهم دیگر کشت‌های سلول گیاهی آن است که امکان اجرای مطالعات در شرایط کنترل‌شده را فراهم می‌سازند و می‌توانند در زمینه‌های مختلف تحقیقاتی ازجمله در بررسی بیان ژن‌ها و تحلیل بیوسنتز متابولیت‌های ثانویه مورد استفاده قرار گیرند *سزارینو* و همکاران (Cesarino *et al*., 2013). همچنین برخلاف سلول‌های پستانداران، خطر بروز جهش‌های ژنتیکی در کشت‌های سوسپانسیون سلولی در گیاهان وجود ندارد. مجموعه مزایا و قابلیت‌های مذکور باعث شده است که کشت سلولی گیاهی برای ساخت متابولیت‌های شیمیایی جدید، کنترل چرخه سلولی و دیگر پروسه‌های سلولی مورد استفاده قرار گیرد *لی* و همکاران (Lee *et al*., 2004).

مواد و روش‌ها

تهیه مواد گیاهی، ضدعفونی و کشت بذور

بذرهای نه رقم توتون شرقی (*Nicotiana tabacum* L.) (جدول ۱) که از بانک ژن مرکز تحقیقات توتون ارومیه وابسته به وزارت صنایع تهیه شده بود، در آزمایشگاه گروه اصلاح نباتات دانشکده کشاورزی دانشگاه تربیت مدرس، مورد آزمایش قرار گرفتند. بذرها ابتدا در صافی چای قرار گرفته و به‌مدت ۱۰s در الکل خالص غوطه‌ور گردیدند. پس از آن بذرها به‌مدت ۱۰ min در محلول ۲/۵٪ هایپوکلریت‌سدیم حاوی چند قطره توین۲۰ قرار گرفته و در پایان سه مرتبه هر بار به‌مدت ۱۰ min با آب مقطر استریل شستشو شدند. سپس بذرها در شرایط استریل به محیط‌کشت MS (حاوی ۲٪ ساکاروز، ۰/۸٪ آگار، بدون هورمون) موجود در یک بطری شیشه‌ای منتقل شدند و برای جوانه‌زنی، به‌مدت ۷ تا ۱۰ روز در یک انکوباتور مناسب با چرخه نوری ۱۶/۸ h شب/روز و دمای ۲۵ ± ۱ °C قرار داده شدند. بعد از جوانه‌دار شدن، قطعاتی با سطح تقریبی ۱ mm^2 از برگ‌های اولیه جدا و برای کالوس‌زایی به پتری‌دیش‌های حاوی محیط MS (حاوی ۳٪ ساکاروز، ۰/۸٪ آگار، با دو تیمار هورمونی ۲,4-D ۱ $mg.l^{-1}$ و Kinetin ۱ $mg.l^{-1}$ و تیمار هورمونی NAA۱ $mg.l^{-1}$ و Kinetin ۱ $mg.l^{-1}$) منتقل گردیدند و به‌مدت سه هفته در یک انکوباتور مناسب با شرایط چرخه نوری و دمای فوق‌الذکر قرار گرفتند.

جدول ۱: نام‌گذاری ارقام توتون شرقی مورد استفاده در این تحقیق

Table 1: Nomination of oriental tobacco cultivars used in this study

ارقام توتون شرقی Oriental tobacco cultivars	کد ارقام Cultivars codes
B12-2	G1
B16-10	G2
B104-1	G3
OR-205	G4
OR-209	G5
SPT 406	G6
PDB 328	G7
Izmir	G8
BS 31	G9

بررسی سرعت و کیفیت رشد کالوس‌ها

کالوس‌های تولید شده در محیط‌های مختلف، بعد از گذشت سه هفته از واکشت، از نظر رنگ و کیفیت کالوس مورد بررسی قرار گرفتند. رنگ ایده‌آل برای کالوس‌ها به‌صورت طلایی روشن مایل به سبز و شاخص کیفیت کالوس نیز تردی و وضعیت ظاهری سالم و مناسب آن در نظر گرفته شد. سپس کالوس‌ها با استفاده از شاخص وزن تر، به‌صورت آزمایش فاکتوریل با طرح پایه کاملاً تصادفی در سه تکرار توسط دو نرم‌افزار آماری Minitab 16 و SPSS 18 مورد ارزیابی قرار گرفتند. فاکتورهای در نظر گرفته شده شامل رقم (۹ سطح)، تیمارهای

هورمونی و محیط‌کشت (۱۱ سطح) بود (جدول ۲). رقم و محیط‌کشت برتر براساس بالاترین سرعت رشد و بهترین کیفیت کالوس انتخاب گردیدند و برای تولید سوسپانسیون به مرحله بعد انتقال داده شدند (شکل ۶). قابل ذکر است که داده‌های وزن تر توسط روش Normal Score نرمال شده و سپس تجزیه واریانس بر روی آن‌ها انجام گرفت.

جدول ۲: تیمارهای هورمونی به‌کار رفته در کشت کالوس ارقام توتون

Table 2: Hormone treatments used for callus culture in tobacco cultivars

تیمارهای هورمونی جهت رشد کالوس Hormone treatment for callus growth	شماره تیمار Treatment Number
1.25 mg.l^{-1} NAA, 1.25 mg.l^{-1} Kinetin	1
2 mg.l^{-1} NAA, 2 mg.l^{-1} Kinetin	2
1.5 mg.l^{-1} NAA, 1.5 mg.l^{-1} Kinetin	3
1 mg.l^{-1} NAA, 1 mg.l^{-1} BAP	4
0.2 mg.l^{-1} 2,4-D	5
1 mg.l^{-1} NAA, 1 mg.l^{-1} Kinetin	6
1 mg.l^{-1} 2,4-D	7
1 mg.l^{-1} 2,4-D, 1 mg.l^{-1} BAP	8
2 mg.l^{-1} 2,4-D, 1 mg.l^{-1} BAP	9
1 mg.l^{-1} 2,4-D, 1 mg.l^{-1} Kinetin	10
LS 3 mg.l^{-1} NAA, 3 mg.l^{-1} IAA, 0.1 mg.l^{-1} Kinetin	11

جدول ۳: ویتامین‌های محیط‌کشت LS

Table 3: Vitamins of LS culture medium

غلظت (mg.l^{-1}) Concentration (mg.l^{-1})	ویتامین‌ها Vitamins
100	Myo-inositol
1.25	Nicotinic acid
0.625	Prydoxine HCl
0.625	Thiamine HCl

انتقال بهترین کالوس/رقم به محیط‌کشت مایع جهت تولید سوسپانسیون سلولی

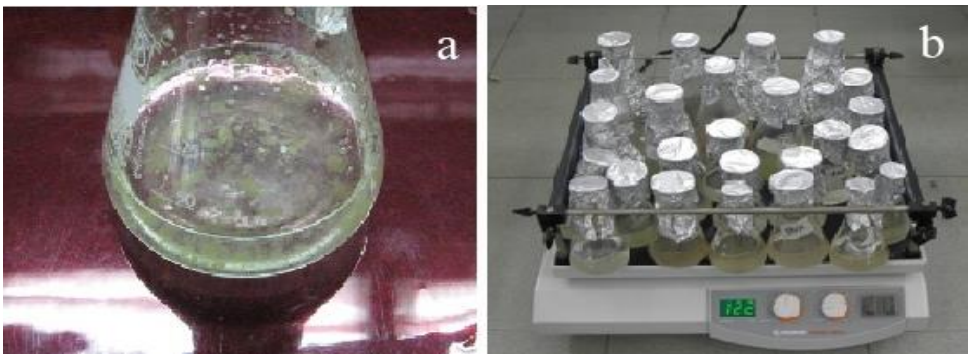
در این مرحله، مقدار g ۳ از کالوس به‌دست آمده از سه رقم توتون که دارای بهترین کیفیت و بالاترین سرعت رشد بودند به ارلن‌های ml ۲۵۰ حاوی ml ۱۰۰ محیط‌کشت مایع LS *لینزمایر و اسکوگ* (Linsmaier and Skoog, 1964) (دارای نمک‌های MS، ویتامین‌های جدول ۳، ترکیبات هورمونی جدول ۴، ۳٪ ساکاروز و بدون آگار) انتقال داده شدند. قسمت سر ارلن‌ها توسط دو لایه فویل آلومینیومی استریل بسته و به‌مدت ۳ هفته بر روی شیکر دورانی با سرعت rpm ۱۳۰ قرار داده شدند (شکل ۱). قابل ذکر است که برای آماده‌سازی محیط‌کشت ابتدا محیط‌کشت LS حاوی ترکیبات هورمونی و ساکاروز به درون ارلن‌ها منتقل و پس از تنظیم pH = ۵/۸، دهانه آن‌ها با فویل آلومینیومی بسته و پس از اتوکلاو و خنک شدن، کشت انجام گردید. در این مرحله پس از هر ۷ روز که غلظت سوسپانسیون‌ها زیاد شده و گرانروی پیدا کردند، واکشت‌های متوالی انجام گرفته و بهترین رقم و ترکیب هورمونی از نظر سرعت رشد، کیفیت ظاهری و یکنواختی سوسپانسیون در قالب آزمایش فاکتوریل بر پایه طرح کاملاً تصادفی انتخاب گردید.

در مورد کالوس‌هایی که از نظر وضعیت ظاهری دارای کیفیت مناسبی برای انتقال به محیط مایع و تولید سوسپانسیون سلولی نبودند، کالوس‌ها به محیط جامد حاوی ۷ و ۷/۵ g.l^{-1} آگار و نیز به محیط‌کشت مایعی که در آن پل

کاغذی جهت استقرار کالوس و جلوگیری از تماس مستقیم آن با محیط مایع تعبیه شده بود، منتقل شدند.

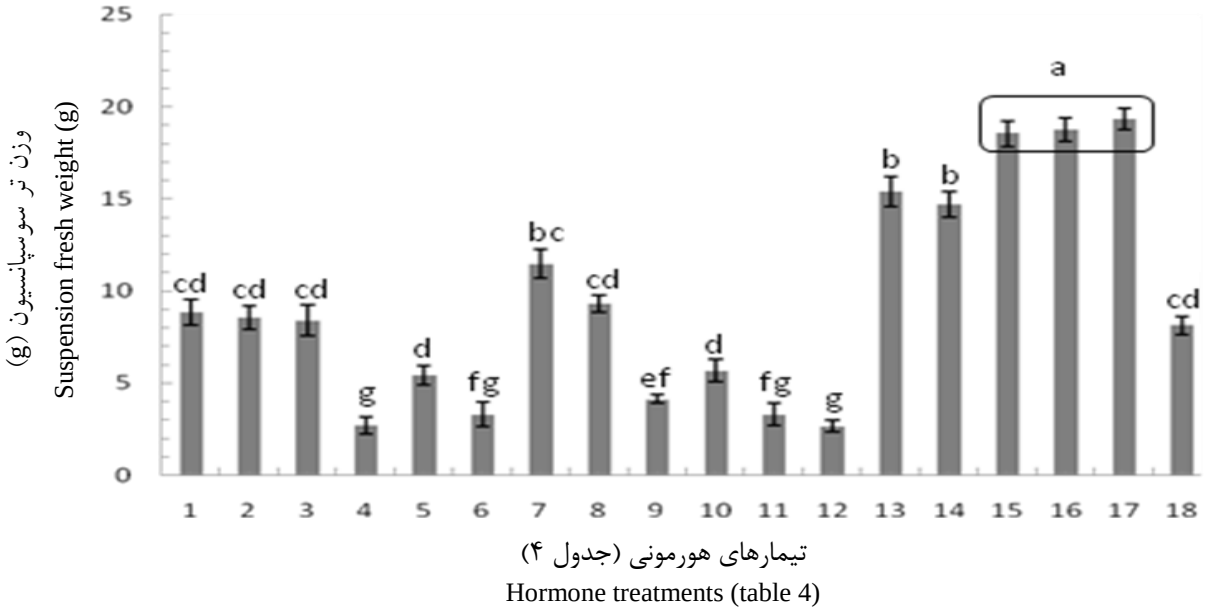
واکشت کردن سوسپانسیون سلولی

سوسپانسیون‌های رشد کرده و مطمئن از نظر کیفیت و عدم آلودگی باکتریایی و قارچی، انتخاب و به زیر هود لامینار منتقل شدند. سپس ارلن‌های حاوی سوسپانسیون درون یک قیف بوخنر دارای کاغذ صافی یا نایلون مش استریل ریخته شده و آب آن توسط پمپ خلاء تخلیه گردید. از توده سلولی موجود به میزان ۵ g برداشته و درون ارلن‌های حاوی ۵۰ ml محیط‌کشت تازه ریخته و درب ارلن‌ها با فویل آلومینیومی بسته شد. در نهایت ارلن‌ها بر روی شیکر انکوباتور با همان سرعت و دمای قبلی قرار گرفتند. در هر بار واکشت کردن، تا حد امکان از انتقال ذرات درشت کالوس ایجاد شده در سوسپانسیون قبلی به محیط جدید خودداری گردید.



شکل ۱: قطعات سوسپانسیون سلولی توتون منتقل شده به محیط مایع درون ارلن (a) و بر روی شیکر (b)

Fig. 1: Sample suspension cells transferred to liquid medium within erlen (a) and on the shaker (b)



شکل ۲: میزان رشد سوسپانسیون سلولی توتون شرقی OR-209 (۱۰ روز پس از واکشت)

Fig. 2: The growth rate of oriental tobacco OR-209 cell suspension (10 d after subculture)

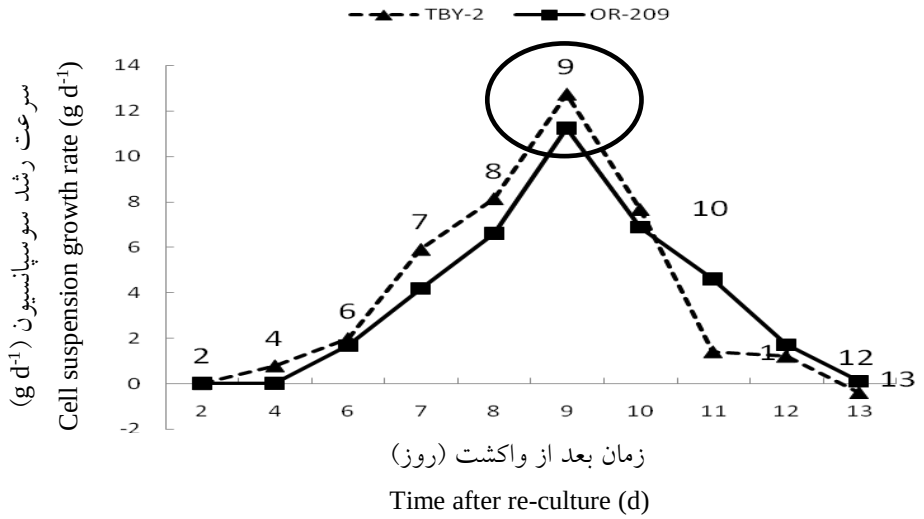
ارزیابی کیفیت و سرعت رشد سوسپانسیون سلولی توتون رقم OR-209 با تیمارهای هورمونی مختلف

حدود ۱۰ روز پس از واکشت سوسپانسیون سلولی رقم OR-209 توتون شرقی در محیط‌های مختلف با پنج تکرار، ارزیابی‌های ظاهری صورت گرفت و نمونه‌های آلوده و نمونه‌هایی که سیاه شده و شکل نامناسبی داشتند، حذف شده و نمونه‌های مناسب با روش توزین ماده تر شناسایی و ثبت شدند. برای این کار سوسپانسیون موجود در ارلن‌ها بعد از گذراندن از صافی کاغذی و حذف محیط مایع وزن گردید و با توجه به داده‌های وزنی به‌دست آمده، بهترین رقم و محیط

کشت از نظر کیفیت و کمیت تولید سوسپانسیون انتخاب گردید (شکل ۲).

ارزیابی سرعت رشد سوسپانسیون سلولی رقم OR-209 و مقایسه آن با لاین سلولی TBY-2

به‌مدت ۱۲ روز پس از واکشت کردن سوسپانسیون سلولی توتون شرقی رقم OR-209 و لاین سلولی TBY-2 در بهترین محیط‌کشت، هر دو روز یک بار سوسپانسیون موجود در سه عدد ارلن را بعد از گذراندن از صافی کاغذی و حذف محیط مایع وزن نموده و از داده‌های وزنی به‌دست آمده نمودار سرعت رشد برای هر دو نوع سوسپانسیون رسم گردید (شکل ۳). آزمون نرمالیته بر روی داده‌های حاصل از وزن تر کالوس‌ها توسط نرم‌افزار Minitab 16 انجام گرفت و نتایج نشان داد که داده‌های به‌دست آمده نرمال نیستند. نرمال کردن داده‌ها با استفاده از تابع Normal Score انجام شد. سپس تجزیه واریانس بر روی داده‌ها براساس آزمایش فاکتوریل در قالب طرح پایه کاملاً تصادفی در سه تکرار انجام گرفت (جدول ۵).



شکل ۳: نمودار مقایسه سرعت رشد سوسپانسیون سلولی توتون شرقی رقم OR-209 (خط ممتد با علامت مثلث) با لاین سلولی TBY-2 (نقطه‌چین با علامت مستطیل)

Fig. 3: Diagram for comparing the growth rate of oriental tobacco OR-209 cell suspension (solid line with triangle symbol) with TBY-2 cell line (dotted line with rectangular symbol)

نتایج و بحث

اندازه‌گیری میزان کالوس‌زایی ژنوتیپ‌ها در محیط‌های کشت مختلف

بین تیمارهای هورمونی و رقم‌ها تفاوت بسیار معنی‌داری در سطح احتمال ۰/۱٪ از نظر میزان کالوس‌زایی مشاهده شد. همچنین به‌علت معنی‌دار بودن اثر متقابل هورمون در ژنوتیپ، مقایسه میانگین بین اثرات ساده انجام نشد. مقایسه میانگین بین اثرات متقابل انجام گرفت و نتایج آن در دو شکل ۴ و ۵ نشان داده شده است. براساس نتایج مقایسه میانگین‌ها که به روش دانکن بر روی داده‌های نرمال شده انجام پذیرفت، سه رقم توتون شرقی OR-205، OR-209 و PDB 328 در محیط شماره ۱۱ (جدول ۲) دارای بیشترین میزان و کیفیت رشد بودند، ولی از نظر ظاهری دارای کیفیت مناسبی جهت انتقال به محیط مایع برای تولید سوسپانسیون نبودند. به همین منظور، جهت تولید کالوس‌های با کیفیت مناسب‌تر، از محیط‌های جامد با میزان آگار ۷ و ۷/۵ $g.l^{-1}$ و نیز از محیط‌کشت مایع به‌همراه پل کاغذ صافی برای رقم‌های برتر استفاده گردید. نتایج حاصل از مقدار کم آگار (۷ $g.l^{-1}$) و پل کاغذ صافی هر دو از نظر ظاهری مناسب‌تر بوده ولی کالوس‌های تولید شده روی پل کاغذی دارای کیفیت بالاتری (رنگ سبز روشن و تردی) بودند و برای تولید سوسپانسیون مورد استفاده قرار گرفتند (شکل ۶). تنوع در میزان کالوس‌زایی در ارقام مورد استفاده را می‌توان ناشی از وابستگی پاسخ ارقام به ژنوتیپ گیاه اصلی و تأثیر ژنوتیپ گیاه در تعیین غلظت بهینه ترکیبات مورد استفاده در محیط‌کشت دانست. در مطالعات دیگری نیز گزارش شده است که غلظت بهینه هورمون‌ها و ترکیبات محیط‌کشت برای القای کالوس به عوامل متعددی ازجمله ژنوتیپ گیاه اصلی، منشأ تهیه ریزنمونه و ویژگی‌های رقم مورد استفاده بستگی دارد *ماتور* و همکاران (Mathur *et al.*, 2013).

جدول ۴: میزان و نوع هورمون‌های به‌کار رفته جهت بهبود رشد سوسپانسیون سلولی توتون شرقی OR-209

Table 4: Amount and kind of hormones used for improving the growth of oriental tobacco OR-209 suspension cell

شماره محیط کشت Medium Number	تیمارهای هورمونی جهت رشد سوسپاسیون سلولی Hormone treatments for cell suspension growth
1	2 mg.l^{-1} NAA, 2 mg.l^{-1} IAA, 0.5 mg.l^{-1} Kinetin
2	1 mg.l^{-1} NAA, 1 mg.l^{-1} IAA, 0.5 mg.l^{-1} Kinetin
3	1 mg.l^{-1} NAA, 1 mg.l^{-1} IAA, 0.5 mg.l^{-1} BAP
4	1 mg.l^{-1} NAA, 1 mg.l^{-1} IAA, 1 mg.l^{-1} BAP
5	2 mg.l^{-1} NAA, 0.5 mg.l^{-1} Kinetin
6	1 mg.l^{-1} NAA, 0.5 mg.l^{-1} Kinetin
7	2 mg.l^{-1} NAA, 0.1 mg.l^{-1} Kinetin
8	1 mg.l^{-1} NAA, 0.1 mg.l^{-1} Kinetin
9	2 mg.l^{-1} 2,4-D, 0.5 mg.l^{-1} Kinetin
10	1 mg.l^{-1} 2,4-D, 0.5 mg.l^{-1} Kinetin
11	1 mg.l^{-1} 2,4-D, 0.5 mg.l^{-1} BAP
12	1 mg.l^{-1} 2,4-D, 1 mg.l^{-1} BAP
13	2 mg.l^{-1} IAA, 0.1 mg.l^{-1} Kinetin
14	1 mg.l^{-1} IAA, 0.1 mg.l^{-1} Kinetin
15	2 mg.l^{-1} NAA, 2 mg.l^{-1} IAA, 0.1 mg.l^{-1} Kinetin
16	1 mg.l^{-1} NAA, 1 mg.l^{-1} IAA, 0.1 mg.l^{-1} Kinetin
17	3 mg.l^{-1} NAA, 3 mg.l^{-1} IAA, 0.1 mg.l^{-1} Kinetin
18	0.1 mg.l^{-1} Kinetin

جدول ۵: تجزیه واریانس وزن تر کالوس‌های رقم‌های توتون شرقی

Table 5: Analysis of variance for the fresh weight of calli produced by the oriental tobacco cultivars

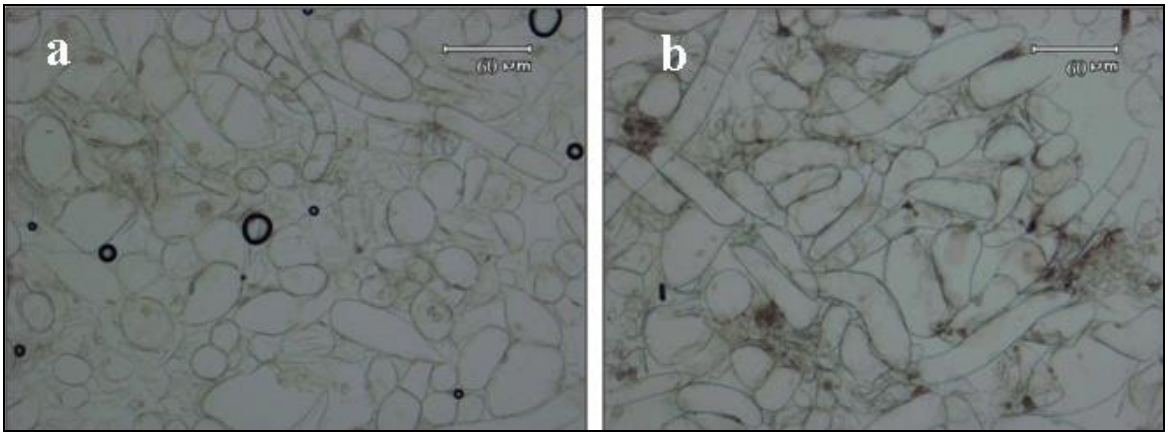
منابع تغییرات Source of variation	درجه آزادی Degree of freedom	میانگین مربعات Mean squares
هورمون Hormone	10	10.678***
رقم Cultivar	8	4.726***
رقم × هورمون Hormone × Cultivar	80	1.616***
خطا Error	198	0.053
ضریب تغییرات ٪ CV%		7.71

*** Highly significant at 0.1% probability level

***اختلاف بسیار معنی دار در سطح احتمال ۰/۱

اندازه‌گیری میزان رشد سوسپانسیون‌های منتخب در محیط‌های کشت مختلف

ده روز پس از انتقال ۳ رقم برتر توتون شرقی به محیط مایع، رقم OR-205 رشد نکرده و سیاه شد. ولی دو رقم OR-209 و PDB 328 سوسپانسیون تشکیل دادند. سرعت رشد رقم PDB 328 نسبتاً خوب بود، ولی یکنواختی و رنگ مناسبی نداشته و تیره می‌شد. تکه‌های کالوس نیز درون آن تشکیل شده و سوسپانسیون یکنواخت و مناسبی ایجاد نکرد. درحالی‌که رقم OR-209 سوسپانسیون یکنواخت‌تر و بهتری را ایجاد کرد. با این حال، از تیمارهای هورمونی مختلفی (جدول ۴) استفاده گردید تا اثر آنها بر کالوس‌زایی نیز بررسی گردد. تیمارهای شماره ۱۵، ۱۶ و ۱۷ (جدول ۴) موجب دستیابی به بیشترین میزان رشد شدند (شکل ۲). مشاهده سلول‌ها در زیر میکروسکوپ الیمپوس BX50 نشان داد که تفاوت بین سلول‌های تیمار شده با هورمون‌های مختلف از جهت ظاهری قابل توجه بود، به گونه‌ای که سلول‌های تیمار شده توسط 2,4-D غالباً به شکل کروی و کوچک، ولی سلول‌های تیمار شده توسط NAA و IAA غالباً به شکل کشیده بودند (شکل ۷).



شکل ۷: سلول‌های توتون OR-209 کروی شکل تحت تأثیر 2,4-D (a) و سلول‌های توتون کشیده تحت تأثیر NAA و IAA (b)، خطوط مقیاس= ۶۰ µm

Fig. 7: Spherical-shaped OR-209 tobacco cells as affected by 2,4-D (a) and oblong-shaped OR-209 tobacco cells as affected by IAA and NAA. Scale bars = 60 µm

مقایسه سرعت رشد سوسپانسیون سلولی رقم OR-209 با لاین سلولی TBY-2

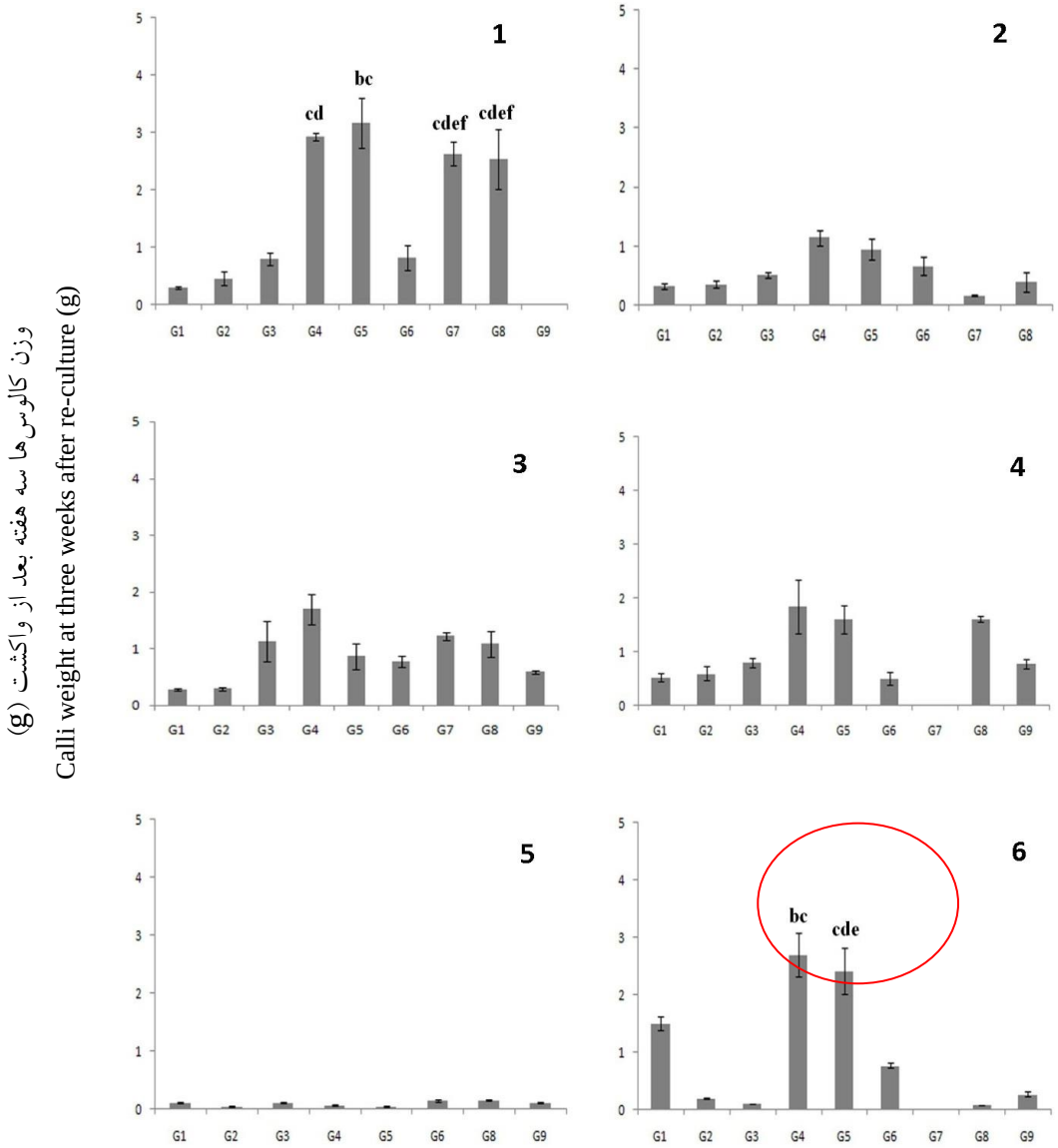
با بررسی‌هایی که به‌منظور مقایسه سرعت رشد سوسپانسیون سلولی رقم OR-209 با لاین سلولی TBY-2 انجام شد، مشخص گردید که سوسپانسیون تولید شده توسط توتون شرقی (رقم OR-209) دارای سرعت و الگوی رشدی مشابه با لاین سلولی TBY-2 بود. همچنین، هر دو سوسپانسیون در روز نهم دارای بیشترین سرعت رشد (اوج تقسیم) بودند. رشد لاین سلولی TBY-2 در روز دهم تقریباً متوقف شده و میزان سوسپانسیون ثابت می‌ماند، ولی رشد سوسپانسیون OR-209 در روز دوازدهم به ثبات رسید.

نتیجه‌گیری نهایی

کشت سوسپانسیون سلولی TBY-2 به‌عنوان یکی از مهم‌ترین ابزارهای تحقیقاتی در زمینه‌های مختلف ازجمله در شناسایی ساز و کار اثرگذاری ترکیبات مختلف سلولی به‌شمار می‌رود. در این تحقیق با تولید سوسپانسیون سلولی از رقم توتون شرقی OR-209، شباهت بالایی از نظر سرعت و الگوی رشد بین سوسپانسیون سلولی حاصل از این لاین با لاین TBY-2 مشاهده شد. نتایج به‌دست آمده، نشان‌دهنده قابلیت بالای لاین OR-209 جهت همزمان‌سازی سیکل سلولی و تولید لاین سلولی و بهره‌برداری از آن در تحقیقات می‌باشد. مسلماً تولید لاین سلولی با منشأ داخلی و جایگزینی آن در تحقیقات مرتبط به جای لاین‌های سلولی پرهزینه و کمیاب خارجی، می‌تواند نقش مهمی در کاهش هزینه‌های تحقیقات و توسعه فناوری‌های سلولی داشته باشد. همچنین با بهینه‌سازی و استانداردسازی لاین‌های سلولی که قابلیت آن‌ها در این تحقیق به اثبات رسید، امکان تجاری‌سازی، صدور و عرضه آن به‌عنوان لاین‌های سلولی باکیفیت جهت استفاده در مطالعات بین‌المللی نیز وجود خواهد داشت.

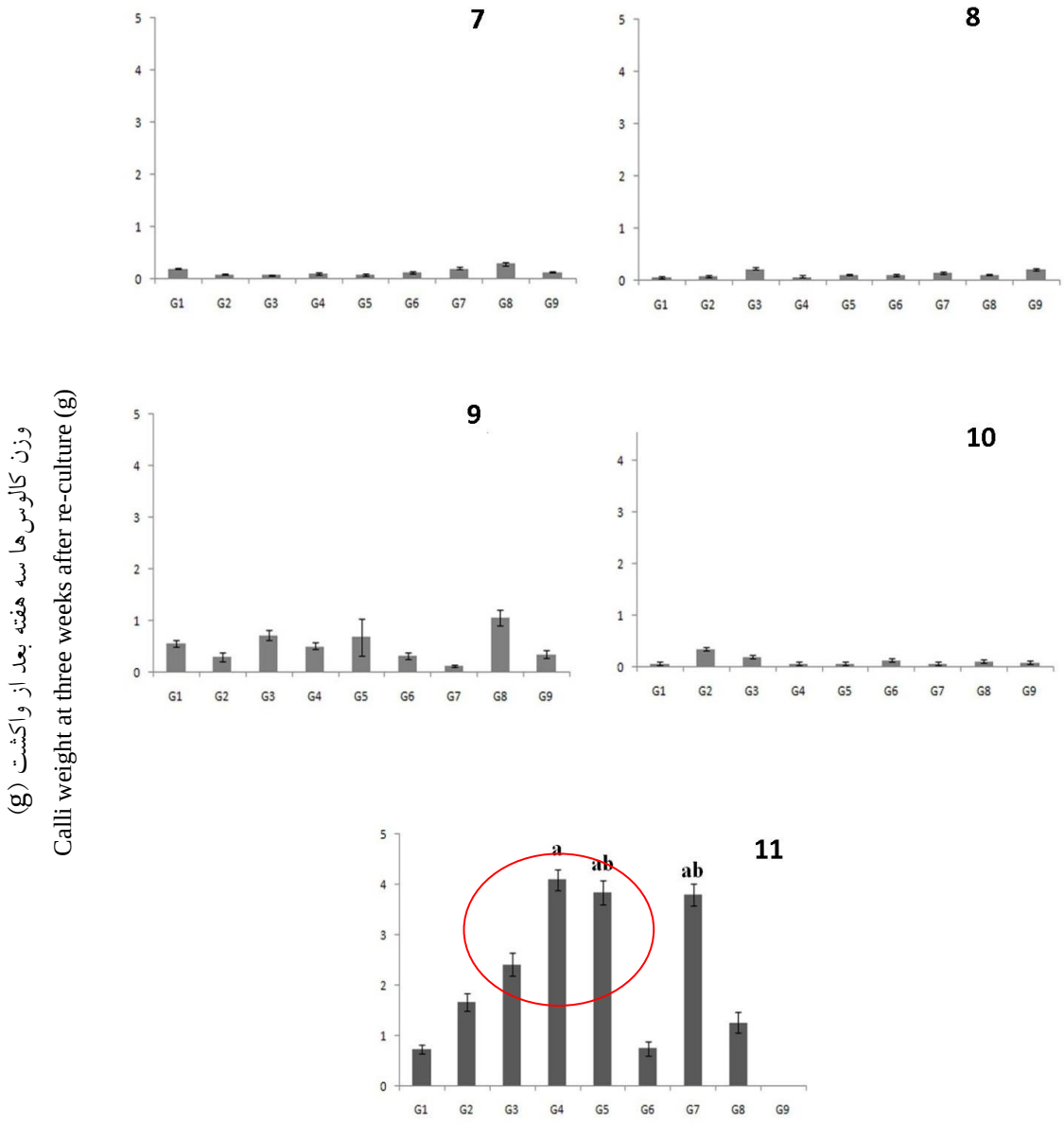
سپاسگزاری

نگارندگان مراتب تشکر و قدردانی خود را از دانشگاه تربیت مدرس به‌خاطر حمایت مالی از این پژوهش ابراز می‌دارند.



شکل ۴: میزان رشد کالوس نه رقم توتون شرقی (جدول ۱) در شش نوع محیط‌کشت هورمونی مختلف (جدول ۴)

Fig. 4: Growth rate of the calli produced by nine oriental tobacco cultivars (Table 1) in six different hormonal media (Table 4)

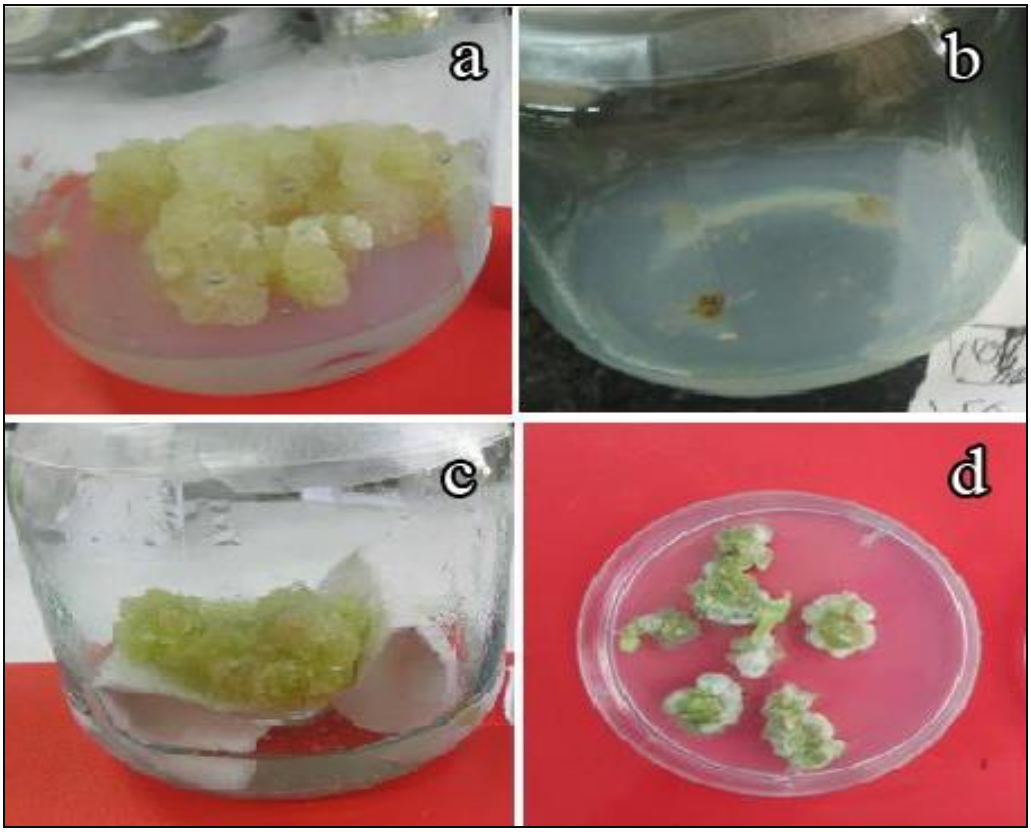


ارقام توتون شرقی کشت شده براساس جدول ۱

Oriental tobacco cultivars according to table 1

شکل ۵: میزان رشد کالوس نه رقم توتون شرقی (جدول ۱) در پنج نوع محیط‌کشت هورمونی مختلف (جدول ۴)

Fig. 5: Growth rate of the calli produced by nine oriental tobacco cultivars (Table 1) in five different hormonal media (Table 4)



شکل ۶: نمونه‌های کشت شده از توتون رقم OR-209 بعداز سه هفته (a)، نمونه از بین رفته (b)، کشت سه هفته‌ای از رقم OR-209 بر روی پل کاغذ صافی در محیط بدون آگار (c)، کشت‌های اولیه حاصل نمونه برگی در پتری‌دیش (d)

Fig. 6: Cultured samples of tobacco OR-209 cultivar after three weeks (a), off type samples (b), 3-week cultured OR-209 on paper bridge in agar-less medium (c) and the initial cultures from leaf explants (d)

منابع:

جهت مطالعه منابع به صفحه‌های ۱-۲ متن انگلیسی مراجعه شود.