اثرات تنظیم‌کننده رشد و نوع ریز نمونه بر کال‌زایی گیاه گزنه

عبدالکریم زارعی[1*]، فاطمه سلاجقه[2]

[1*]استادیار و [2] دانش‌آموخته گروه بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه جهرم، جهرم

[*]نویسنده مسئول: zarei@jahrom.ac.ir

چکیده

در پژوهش حاضر اثر تیمارهای مختلف هورمونی، شرایط نگهداری محیط و نوع ریزنمونه بر میزان کالزایی گیاه داروئی گزنه مورد بررسی قرار گرفت. به این منظور آزمایشی به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۳ تکرار طراحی گردید و ریزنمونه‌های مختلف شامل برگ پیر و جوان، گره و بذر این گیاه در محیط کشت MS جامد حاوی ۳۰ گرم بر لیتر ساکارز و غلظت‌های متفاوت ۲ هورمون توفوردی (۱، ۲ و ۳ میلی‌گرم در لیتر) و BA (۱، ۰/۵ و ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر) کشت شدند و صفاتی از قبیل درصد کال‌زائی، زمان کالوس‌دهی، بافت و رنگ کالوس‌های القایی مورد ارزیابی قرار گرفت. داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SAS نسخه ۹,۳,۱ مورد تجزیه واریانس قرار گرفتند و مقایسه میانگین به روش دانکن صورت گرفت. بر اساس نتایج حاصله، ریزنمونه‌های مورد استفاده تفاوت معنی‌داری از نظر کال‌زایی نشان دادند، به‌طوری‌که ریزنمونه‌های برگ پیر، برگ جوان و گره قادر به تولید کالوس بودند. پاسخ ریزنمونه‌ها برای کال‌زائی با قرار گرفتن در شرایط نوری مختلف متفاوت بود به‌نحوی‌که شرایط تاریکی تأثیر بیشتری در القای کالوس و میزان رشد آن داشت. همچنین اثر تیمارهای مختلف تنظیم‌کننده رشد بر کال‌زایی ریزنمونه‌های مختلف در سطح یک درصد معنی‌دار بود، به‌طوری‌که بیشترین میزان کال‌زایی در ریزنمونه‌های برگ‌های جوان و ریزنمونه‌های گره در محیط دارای یک میلی‌گرم توفوردی و یک میلی‌گرم بنزیل آدنین ولی در مورد برگ پیر یک میلی‌گرم توفوردی و ۰/۱ میلی‌گرم بنزیل آدنین در شرایط تاریکی حاصل شد. در بین ریزنمونه‌های مورد استفاده، ریزنمونه برگ جوان در شرایط تاریکی بیشترین درصد کال‌زایی (۹۸/۳۹ درصد) و رشد کالوس بهتری داشتند.

کلمات کلیدی: **کالزایی، گزنه، محیط کشت، ریزنمونه، توفوردی، بنزیل آدنین.**

مقدمه

روش‌های نوین و کاربردی کشت سلول و بافت در بهنژادی و ازدیاد گیاهان داروئی این فرصت را فراهم می‌کند که بتوان از گیاهان داروئی بهره‌برداری بیشتری کرد و به مقدار بیشتری از ترکیبات ثانویه ارزشمند دست یافت. تکنیک کشت بافت و سلول یک فرصت کمیاب برای دخالت در پروفایل شیمیایی و افزایش تولیدات فیتو شیمیایی در اختیار انسان قرار می‌دهد. امروزه گیاهان داروئی مهمی با موفقیت از طریق کشت بافت تکثیر و مورد بهره‌برداری قرارگرفته‌اند. استفاده از شرایط کشت بافت گیاهی یکی از راه‌های اصلی تولید متابولیت‌های مفید گیاهان داروئی می‌باشد و تحقیقات فراوانی در زمینه استفاده از تکنولوژی کشت سلول و بافت‌های گیاهی در شرایط درون شیشه، به‌عنوان سیستم جایگزین برای تولید مواد مؤثره با ارزش صورت گرفته است (Sumner *et al.*, 2003). کشت کالوس از جمله روش‌های مؤثر کشت بافت گیاهی است. کالوس در شرایط درون شیشه، در محیط غذایی و تحت تأثیر کاربرد خارجی مواد تنظیم‌کننده رشد گیاهی شکل می‌گیرد (Craker *et al.*, 2007).

گیاه گزنه *Urtica dioica* L متعلق به راسته رزالس و خانواده گزنه‌ایان[1] گیاهی، علفی، دو پایه، چندساله با ارتفاع ۱۰۰-۵۰ سانتی‌متر و دارای کرک‌های گزنده می‌باشد. در ایران در مناطق مختلفی از کشور به‌صورت خودرو وجود دارد. با توجه به اینکه تاکنون در زمینه کشت بافت این گیاه تحقیقی صورت نگرفته است، سعی بر آن شد تا فاکتورهای مختلف برای القاء کالوس در شرایط محیط کشت بافت در مورد این گیاه مورد بررسی قرار گیرد. لذا به‌منظور انجام بررسی‌های بیشتر در مورد شرایط کشت بافت این گیاه در این پژوهش سعی شد اثر تیمارهای مختلف هورمونی، شرایط نگهداری محیط و نوع ریزنمونه بر میزان کالزایی این گیاه بررسی گردد.

مواد و روش‌ها

گیاهان گزنه مورد آزمایش از سطح باغات شهرستان جهرم جمع‌آوری و به آزمایشگاه منتقل شدند و قطعاتی از ریزنمونه برگ‌های تازه رشد کرده، همچنین برگ‌های کاملاً توسعه یافته و گره ساقه جدا و پس از شستشوی سطحی به‌سرعت توسط اتانول ۷۰ درصد به مدت یک دقیقه و محلول هیپوکلریت ۱/۲ درصد به مدت ۱۰ دقیقه و سه نوبت شستشو با آب مقطر استریل، ضدعفونی سطحی شده و مورد کشت قرار گرفتند. همچنین به‌منظور مقابله با آلودگی باکتریایی، پس از اتوکلاو کردن محیط کشت و قبل از توزیع محیط به ظروف کشت، آنتی‌بیوتیک کلرامفنیکل به میزان ۵۰ میلی‌گرم بر لیتر به محیط افزوده شد. در این تحقیق از محیط کشت پایه MS به همراه منبع اکسین توفوردی با غلظت‌های ۱، ۲ و ۳ میلی‌گرم در لیتر و همچنین منبع سیتوکنین BA با غلظت‌های ۱، ۰/۵ و ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر استفاده گردید. به‌عنوان منبع کربوهیدراتی ۳۰ گرم در لیتر ساکارز و به‌عنوان عامل ژله‌ای کننده، ۷/۵ گرم در لیتر آگار به محیط افزوده شد. با استفاده از دستگاه پی اچ سنج دیجیتالی، پی اچ محیط‌های تهیه شده قبل از افزودن عامل ژله ای کننده در محدوده ۵/۹-۵/۷ تنظیم گردید.

سه تکرار از ریزنمونه‌های مختلف با ۷ مشاهده در هر پتری دیش در نه غلظت مختلف تنظیم‌کننده رشد گیاهی و به‌صورت آزمایش فاکتوریل در قالب طرح پایه کاملاً تصادفی مورد ارزیابی قرار گرفتند. نمونه‌های تاریکی در جعبه تیره سربسته قرار گرفته و انواع روشنایی در شرایط نوری اتاق (۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی) قرار گرفتند. پس از ثبت داده‌ها، از نرم‌افزار SAS نسخه ۹,۱,۳ برای تجزیه و تحلیل داده‌ها و آزمون معنی‌داری تیمارها در سطح یک درصد استفاده شد و مقایسه میانگین داده‌ها توسط آزمون چند دامنه‌ای دانکن انجام گرفت. به‌منظور نرمال کردن داده‌های درصد کالوس‌زایی، از Arcsin داده‌ها استفاده گردید.

نتایج و بحث

ریزنمونه‌ها از هفته دوم بعد از کشت در محیط القای کالوس، شروع به کالوس‌زایی کردند. در آزمایش اول ریزنمونه‌های برگ جوان در دو شرایط مختلف تاریکی و روشنایی قرار گرفتند. بر اساس نتایج میزان کالزایی برگ‌های جوان در شرایط تاریکی بیشتر از شرایط روشنایی بود. بنابراین ریزنمونه‌های مختلف مورد آزمایش در شرایط تاریکی نگهداری شدند. بر اساس نتایج حاصل از این پژوهش هر سه ریزنمونه رویشی استفاده شده قادر به تولید کالوس بودند و کالوس‌ها پس از چند مرتبه واکشت هم سالم و بدون تغییر باقی ماندند که بیانگر قابلیت استفاده از این کالوس‌ها چه به‌صورت کالوس و چه در شرایط کشت سلولی برای تولید متابولیت‌های ارزشمند از این گیاه می‌باشد. نتایج نشان داد که اثر نوع ریز نمونه روی درصد کالوس زایی در سطح احتمال ۱ معنی‌دار بود (جدول ۱). بدون در نظر گرفتن تیمار تنظیم‌کننده رشد گیاهی نمونه‌های برگ جوان بیشترین درصد تولید کالوس را دارا بودند و بعد از آن ریزنمونه‌های گره و سپس ریزنمونه‌های برگ پیر در رتبه‌های بعدی قرار داشتند (تصویر ۱). همچنین اثر متقابل نوع ریزنمونه و غلظت

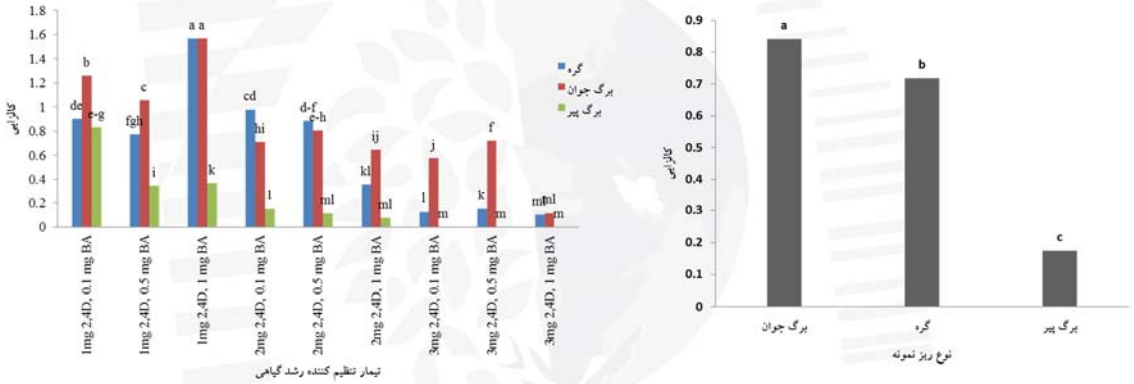
[1] Urticaceae

تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی بر میزان کالوس‌زایی گیاه گزنه معنی‌دار بود (تصویر ۱). به عبارتی بیشترین میزان کالزایی (۱۰۰ در صد) در تیمارهای ۱ میلی‌گرم در لیتر توفوردی و ۱ میلی‌گرم در لیتر بنزیل آدنین از ریز نمونه برگ جوان و گره حاصل شد. برگ‌های پیر در غلظت ۱ میلی‌گرم در لیتر توفوردی و ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر بنزیل آدنین بیشترین (۷۳/۹ درصد) کالزایی را از خود نشان دادند.

جدول ۱. بررسی اثر غلظت‌های مختلف تنظیم‌کننده رشد گیاهی و نوع ریزنمونه بر درصد کالوس زایی گیاه گزنه در شرایط تاریکی.

منبع	میانگین مربعات		
	درجه آزادی	درصد کالزایی	بافت کالوس
تنظیم‌کننده	۸	**۱/۱۳	**۱۴/۵۰
ریزنمونه	۲	**۲/۸۵	**۲۷/۴۴
ریز نمونه ×	۱۶	**۰/۲۱	**۵/۷۱
خطا	۵۴	۰/۰۰۱۶	۰/۲۵۹
CV%	-	۷/۵۲	۲۳/۳۰

** معنی‌داری در سطح احتمال ۱



تصویر ۱. اثرات غلظت تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی (سمت چپ) و نوع ریزنمونه (سمت راست) بر کالزایی گیاه گزنه.

با افزایش غلظت تنظیم‌کننده‌های رشد میزان کالزایی از برگ‌های پیر به‌شدت کاهش یافت. همچنین در تیمارهای ۲ میلی‌گرم در لیتر توفوردی و ۰/۱ و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر بنزیل آدنین، میزان کالزایی در ریزنمونه گره بیشتر از برگ جوان بود که ممکن است بیانگر این مطلب باشد که برای القاء کالوس از ریزنمونه‌های گره نیاز به غلظت های بیشتر توفوردی می‌باشد. این مشاهدات ممکن است ناشی از غلظت متفاوت هورمون‌های درون‌زاد در ریزنمونه‌های مختلف باشد. تأثیر متفاوت ریزنمونه‌ها و غلظت تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی در گیاهان مختلفی گزارش شده است (Ebrahimzadeh *et al.*, 2006; Sharafi *et al.*, 2014). به عبارتی این احتمال وجود دارد که گره برای القاء کالوس به غلظت‌های بیشتری از تنظیم‌کننده رشد اکسین نیاز داشته و یا در غلظت‌های بیشتری از تنظیم‌کننده رشد تولید کالوس را در سطح بالایی حفظ می‌کند. معمولاً بافت‌های جوان میزان بیشتری از هورمون‌های درون‌زا دارند. به عبارتی این امکان وجود دارد که میزان بیشتری از هورمون‌های اکسین در بافت‌های جوان باعث شوند که این بافت‌ها در غلظت های پایین‌تر اکسین کالزایی مناسب داشته باشند و با افزایش میزان اکسین در محیط کشت و افزایش غلظت اکسین به سطح مسموم کننده، اثر بازدارندگی تنظیم‌کننده رشد به وجود آید. بهترین تیمار تنظیم‌کننده رشد و شرایط نگهداری کشت در این پژوهش مشابه با گزارش کارولینا و همکاران[2] (2001) در مورد گل راعی می‌باشد. این محققین گزارش کردند که بیشترین تولید کالوس در گل راعی از ریزنمونه‌های کشت شده در حضور یک میلی‌گرم بر لیتر بنزیل

[2] Carolina

آدنین و یک میلی‌گرم بر لیتر توفوردی و در شرایط تاریکی حاصل شد (Carolina *et al.*, 2001). همچنین گزارش شده که بیشترین میزان کالوس از این گیاه در تیمار یک میلی‌گرم بر لیتر توفوردی و کینیتین حاصل شد (Ayan *et al.*, 2005).

امیدی و همکاران (2011) گزارش کردند که تنظیم‌کننده رشد توفوردی نسبت به نفتالین استیک اسید تأثیر بیشتری بر درصد تشکیل کالوس در گیاه سرخدار دارا می‌باشد. همچنین پس از بررسی غلظت‌های ۰/۵، ۱، ۲ و ۴ میلی‌گرم در لیتر توفوردی به همراه ۰/۲، ۰/۴ و ۱ میلی‌گرم در لیتر کینیتین، این محققین مشاهده کردند که بیشترین درصد تشکیل کالوس در غلظت یک میلی‌گرم در لیتر توفوردی و یک میلی‌گرم در لیتر کینتین و از ریز نمونه ساقه حاصل شد. بعلاوه این محققین گزارش کردند که کالوس‌های حاصل از ساقه نرم، انعطاف‌پذیر و به رنگ کرم بودند درحالی‌که کالوس‌های حاصل از برگ بیشتر حالت فشرده، سفت و قهوه‌ای داشتند.

بر اساس نتایج بدون در نظر گرفتن غلظت تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی، ریزنمونه‌های مختلف کالوس‌هایی با بافت متفاوتی تولید نمودند. رنگ کالوس‌های مختلف از سفید تا قهوه‌ای متفاوت بود. ریزنمونه‌های گره روشن‌ترین کالوس‌ها را تولید نمودند درحالی‌که برگ‌های جوان تیره‌ترین کالوس را در بین ریزنمونه‌های مختلف حاصل کردند. اثر متقابل ریزنمونه‌های مختلف و غلظت‌های تنظیم‌کننده رشد گیاهی نشان داد که هر دو فاکتور مورد مطالعه در رنگ و بافت کالوس مؤثر بودند. بر اساس این نتایج کالوس‌های حاصل از گره در تیمارهای مختلف تفاوت معنی‌داری نداشتند و همگی رنگ سفید داشتند. به عبارتی غلظت‌های مختلف تنظیم‌کننده رشد گیاهی هیچ‌گونه تأثیری در رنگ و بافت کالوس‌های حاصله نداشت. از طرفی کالوس‌های حاصل از برگ جوان و برگ پیر در غلظت‌های پایین تنظیم‌کننده رشد رنگ روشن داشتند ولی با افزایش غلظت تنظیم‌کننده رشد رنگ آن‌ها به سمت قهوه‌ای متمایل شد درحالی‌که تیمار ۲ میلی‌گرم در لیتر توفوردی تیره‌ترین نوع کالوس‌ها را حاصل نمود. در غلظت‌های ۳ میلی‌گرم در لیتر توفوردی برگ‌های پیر کالوسی تولید نکردند ولی برگ‌های جوانی که کالوس تولید نمودند هنوز رنگ تیره داشتند. بنابراین نتایج حاصل نشان داد که کالوس‌های روشن در تیمارهای پایین‌تر مربوط به ریزنمونه‌های برگ حاصل می‌شود درحالی‌که ریزنمونه گره کالوس قهوه‌ای تولید نکردند. نوع، مقدار و رنگ کالوس ایجاد شده در گیاهان مختلف به ژنوتیپ، میزان هورمون های درون‌زا و برون‌زا و ترکیب محیط کشت وابسته است (Kumari *et al.*, 2006). در میان این عوامل مؤثر، تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی به‌ویژه اکسین و سیتوکنین نقش بسیار حیاتی در فرایند القای کالوس دارند (Mungole *et al.*, 2011). نوع تنظیم‌کننده رشد و غلظت‌های آن به محیط و خصوصاً گونه گیاهی بستگی دارد. البته نوع ریزنمونه گیاهی مورد استفاده هم می‌تواند تأثیر زیادی در غلظت‌های مورد نیاز بگذارد. نتایج حاصل از بررسی القاء کالوس در گیاه سیب‌زمینی با ریزنمونه‌های برگ و گره و در غلظت‌های مختلف توفوردی نشان داده که ریزنمونه‌های گره نسبت به برگ به غلظت بالاتری از توفوردی برای القاء کالزایی نیاز دارند (۴ میلی‌گرم در برابر ۲ میلی‌گرم در لیتر) (Karamzad *et al.*, 2016). همچنین این محققین گزارش کردند که کالوس‌های تولید شده از ریزنمونه گره رنگ روشن‌تری از کالوس‌های حاصل شده از ریزنمونه برگ داشتند. به‌عبارتی‌دیگر می‌توان نتیجه گرفت که رابطه‌ای بین غلظت تنظیم‌کننده رشد و رنگ کالوس وجود داشته باشد و از آنجائی که گره نسبت به برگ غلظت بیشتری از تنظیم‌کننده رشد را تحمل می‌کند، ممکن است تولید کالوس‌های با رنگ روشن‌تری کنند.

منابع

Ayan, AK, Cirak, C., Kevserolu, K. and Sokmen, A. 2005. Effects of expellant types and different concentrations of sucrose and phytoharmones on plant regeneration and hypericin content in *Hypericum perforatum* L. Turkish Journal of Agriculture, 29: 197-204.

Carolina A., Astarita, L.V. and Santarem, E.R. 2001. Organogenese in *Hypericum perforatum* L. IV Encontro Latino-Americano de BiotechnologinVegetal, Goiania, Resumos, p 81.

Craker, E.L., Janick, J. and Whipkey, A. 2007. Medicinal and Aromatic Plants-Future Opportunities. Issues in new crops and new uses. ASHS Press, Alexandria, pp: 232.

Ebrahimzadeh, M., Shaker, H., Bernard, F. and Khavarinejad, R.A. 2006. Effect of hormones and explant in callus induction and plant regeneration in tissue culture of *Anthurium andreanum* Var. Tropical. Pajouhesh & Sazandegi. 73: 169-176. (In Persian)

Karamzad, Z.h., Farshadfar, M., Zebarjadi, A.R. and Zolnorian, H. 2016. Investigation of effect of different concentrations of 2,4- D and kinetin on callus induction in potato (*Solanum tuberosum* L.) variety of Agria. Journal of Plant Research. 28(2): 316-325. (In Persian)

Kumari, B.D.R., Setuu, A. and Sujatha, G.. 2006. Somatic embryogenesis and plant regeneration in soybean (*Glycine max*). Indian Journal of Biotechnology, 5(2): 243-245.

Mungole, A.J., Doifode, V.D., Kamble, R.B., Chaturvedi, A. and Zanware, P. 2011. *In vitro* callus induction and shoot regeneration in *Physalis minima* L., Annals of Biological Research, 2(2): 79-85.

Omidi, M., Behjat Sasan, B., Naghavi, M.R., Kalate Jari, S. and Etminan, A.R. 2011. Effect of growth regulators, medium and explant on callus induction in *Taxus baccata* L. Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants, 27 (2): 316-325. (In Persian)

Sharafi E., Khayymnkyy, S.M., Fotokian, M.H., Davoodi, D. and Hassanloo, T. 2014. Effect of different growth regulators levels and explants types of callogenesis and organogenesis *Hypericum perforatum* L. under in vitro condition. Journal of Agricultural Biotechnology, 5(3): 57-66. (In Persian)

Sumner, L.W., Mendes, P. and Dixon, R.A. 2003. Plant metabolomics: large-scale phytochemistry in the functional genomics era. Phytochemistry, 62: 817-836.

Effects of Plant Growth Regulators and Explant Types on Callus Induction of Nettle Plant

Abdolkarim Zarei[1]*, Fatemeh Salajeghe[2]
[1*] Assistant professor and [2]Graduate student, Department of Biotechnology, Agriculture College, Jahrom University, Jahrom
*Corresponding Author: zarei@jahrom.ac.ir

Abstract

This study was carried out to investigate the effect of different hormonal treatment, explant type and culture condition callus induction in nettle plant. A factorial experiment was carried out on the base of completely random design with three replications to find the best combination of explant, plant growth regulation and light condition. Different explants including young leaf, old leaf, node and seeds of this plant were cultured in solid MS medium containing 30 g L^{-1} sucrose and different concentrations of 2,4-D (1, 2 and 3 mgL^{-1}) and BA (0.1, 0.4 and 1 mg L^{-1}). Different characteristics including time of callus induction, callus percentage, as well as color and texture of callus were analyzed. Analysis of variance were carried out by SAS software ver. 9.3.1 and mean comparison was conducted using Duncan Multiple Range Test. According to results, callus induction was significantly different in various explants so that young leaves, node and old leaves were able to produce callus. Response of explants was significantly different in various light conditions so that dark treatment showed to be more effective for callus induction. In addition, effects of hormonal treatments were significantly different on callus induction at 1% probability. The highest percentage of callus induction was obtained from young leaf explants in the medium containing 1 mgL^{-1} 2,4-D and 1 mgL^{-1} BA in the dark condition and then nod explants in the same hormonal treatment, while medium containing 1 mgL^{-1} 2,4-D and 0.1 mgL^{-1} BA showed to be more effective for old leaf explants. Among different explants used in this experiment, young leaves showed the highest percentage of callus induction (98.39%) in dark condition.

***Keywords*: callus induction, culture media, explant, 2,4-D, benzyl adenine**