تاثیر غلظت‌های تنظیم‌کننده‌های رشد بر کالوس‌زایی ریزنمونه‌های مختلف گیاه ریحان

رقیه حلقومی*[۱]، سیاوش حسینی سرقین[۱]، جلیل خارا[۱]، بهمن حسینی[۲]
[۱]گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، ارومیه
[۲]گروه باغبانی، دانشکده کشاورزی، ارومیه
*نویسنده مسئول: rogy.holghoomi@gmail.com

چکیده

ریحان یک گیاه دارویی مهم و با ارزش از خانواده‌ی نعناعیان است که حاوی چندین ترکیب آنتی‌اکسیدانی می‌باشد و اسانس آن با دارا بودن ترکیبات ترپنوئیدی و فنولی، خواص ضدمیکروبی و حشره‌کشی دارد. در این پژوهش به منظور بهینه-سازی کالوس‌زایی، تاثیر غلظت‌های (۰، ۰/۵ و ۱ میلی‌گرم بر لیتر) از تنظیم‌کننده‌های رشد BAP و NAA بر ریزنمونه‌های هیپوکوتیل و کوتیلدون به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملا تصادفی با سه تکرار مورد آزمایش قرار گرفت. فاکتورهایی نظیر درصد کالوس‌زایی، درصد ریشه‌زایی، وزن تر کالوس و تعداد ساقه‌های نو مورد بررسی قرار گرفت. تنظیم‌کننده‌های رشد نفتالین‌استیک‌اسید و بنزیل‌آمینوپورین بر القای کالوس و تداوم رشد آن موثر بودند. در همه‌ی ترکیب‌های تنظیم‌کننده‌های رشد، در هر دو نوع ریزنمونه، کالوس‌زایی مشاهده شد. در تیمار یک میلی‌گرم بر لیتر از بنزیل‌آمینوپورین ریشه‌زایی به کمترین میزان خود در ریزنمونه‌های هیپوکوتیل رسید. بالاترین میزان وزن تر کالوس در حضور هر دو تنظیم‌کننده‌ی رشد با غلظت یک میلی‌گرم بر لیتر مشاهده شد. همچنین حضور ساقه‌های نو نیز در غلظت‌های ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر از بنزیل‌آمینوپورین و صفر میلی‌گرم بر لیتر از نفتالین‌استیک‌اسید در هر دو ریزنمونه مشاهده گردید.

کلمات کلیدی: بنزیل‌آمینوپورین، ریحان، کوتیلدون، نفتالین‌استیک‌اسید، هیپوکوتیل.

مقدمه

گیاه ریحان با نام علمی *Ocimum basilicum* یکی از گیاهان دارویی مربوط به خانواده‌ی نعناعیان می‌باشد؛ این گیاه یکساله بوده و بومی آفریقا، آسیا و جزایر اقیانوس آرام است. ریحان گیاه دارویی مهم و با ارزشی است که حاوی چندین ترکیب آنتی‌اکسیدانی است و نقش مهمی در سطوح سلولی ایفا می‌کند (Daniel and Daniang, 2011). اسانس این گیاه خواص ضدمیکروبی (Elgayyar, 2001) و حشره‌کشی (Bowers, 1980) دارد. ترکیبات اصلی گیاه ریحان شامل لینالول، متیل-کاویکول، کامفور و متیل‌اوژنول می‌باشد (Gill, 1996). بیشتر گونه‌های گیاهی مربوط به خانواده‌ی نعناعیان مانند ریحان، دارای محتوای بالایی از مواد فنولی مانند (Dragland, 2003) رزمارینیک اسید، شیکوریک و کفتاریک‌اسید است (Kwee, 2011). با توجه به اینکه تولید سریع و انبوه متابولیت‌های ثانویه با ارزش دارویی در مقیاس وسیع، از طریق روش‌های شیمیایی عمدتا مشکل و یا غیر ممکن است و نیز بدلیل اهمیت اقتصادی این مواد پیچیده و تولید اندک آنها در گیاهان دارویی، استفاده از راهکارهایی مثل کشت‌بافت و استفاده از محرک‌های زیستی و غیرزیستی می‌تواند تولید این متابولیت‌ها را بهبود بخشد. دگرگشنی ریحان و تکثیر آن به‌وسیله‌ی بذر باعث ایجاد تنوع می‌شود لذا جهت بدست آوردن گیاهان یکنواخت برای مصارف صنعتی و دارویی کشت‌بافت یکی از بهترین روش‌هاست. همچنین روش‌های معمول اصلاح و تولید متابولیت‌های ثانویه در گیاهان دارویی شامل کاشت آن در مزرعه و سپس برداشت آنها و استخراج این مواد همراه با مشکلات متعددی می‌باشد که مزیت استفاده از روش‌های کشت بافت را روشن‌تر می نماید.

IrHC2019

مواد و روش‌ها

بذور ریحان(*Ocimum basilicum*) رقم کشکنی لولو از پروفسور عباس حسنی در دانشگاه ارومیه تهیه گردید. بذرها در زیر هود لامینار به مدت یک دقیقه در اتانول ۷۰ درصد و پس از شستشو با آب مقطر استریل به مدت ده دقیقه در محلول هیپوکلریت‌سدیم ۵ درصد کاملا غوطه‌ور شدند و دوباره با استفاده از آب مقطر استریل سه مرتبه شستشو شدند. تعداد ۲۰ بذر ضدعفونی شده درون هر شیشه مربای حاوی محیط کشت موراشیگ و اسکوگ (MS)، (Murashige and Skoog , 1962) کشت شدند. جهت جوانه‌زنی، نمونه‌ها تا جوانه زدن بذرها در تاریکی قرار گرفتند و پس از آن به اتاقک رشد با دمای ۲±۲۵ و تناوب نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی منتقل شدند. یک هفته بعد از کشت بذور، با ظهور کوتیلدون‌های گیاه ریحان، ریزنمونه‌های هیپوکوتیل و کوتیلدون از گیاهچه‌های استریل تهیه و در محیط‌های کشت حاوی غلظت‌های (۰، ۰/۵ و ۱ میلی‌گرم بر لیتر) از نفتالین‌استیک‌اسید و بنزیل‌آمینوپورین کشت داده شدند و به اتاقک رشد با دمای ۲±۲۵ و تناوب نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی منتقل شدند. این آزمایش به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملا تصادفی با سه تکرار در آزمایشگاه کشت بافت گروه باغبانی دانشکده کشاورزی دانشگاه ارومیه انجام گرفت. محیط کشت MS در این آزمایش حاوی ۹ ترکیب غلظت‌های مختلف از تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی (BAP و NAA) در سه تکرار و در هر تکرار ده ریزنمونه انجام شد (جدول ۱)

جدول ۱- غلظت‌های مختلف NAA و BAP در محیط‌های کشت برای القای کالوس در ریزنمونه‌های هیپوکوتیل و کوتیلدون گیاه ریحان

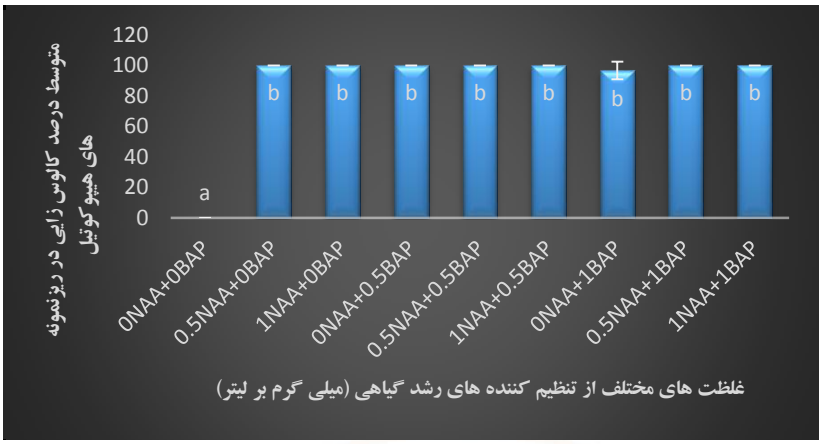
محیط کشت	ترکیبات تیماری ($mg\ l^{-1}$)
A	0 NAA + 0 BAP
B	0.5 NAA + 0 BAP
C	1 NAA + 0 BAP
D	0 NAA + 0 BAP
E	0.5 NAA + 0.5 BAP
F	1 NAA + 0.5 BAP
G	0 NAA + 1 BAP
H	0.5 NAA + 1 BAP
I	1 NAA + 1 BAP

نتایج و بحث

غلظت‌های مختلف از تنظیم‌کننده‌های رشد NAA و BAP باعث القای کالوس در محیط‌های کشت حاوی قطعات جداکشت شدند. جهت کالوس‌زایی حضور تنظیم‌کننده‌های رشد ضروری است. بهترین تیمار برای افزایش وزن تر کالوس در کشت‌بافت ریزنمونه‌های هیپوکوتیل ریحان، در محیط کشت حاوی ترکیب ۱ و ۱ میلی‌گرم بر لیتر از NAA و BAP می‌باشد. با کاهش غلظت تنظیم‌کننده‌های رشد در محیط کشت، میزان وزن تر کالوس نیز کاهش می‌یابد. در غلظت ۰/۵و ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر از NAA و BAP نیز وزن تر مناسبی در ریزنمونه‌های هیپوکوتیل بدست آمد. بالاترین وزن کالوس تر در نمونه‌های کوتیلدون در حضور ۰/۵ و ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر از NAA و BAP حاصل شد و در تیمار ۰/۵ و ۱ از NAA و BAP نیز وزن تر کالوس قابل توجهی مشاهده شد. در ریزنمونه‌های هیپوکوتیل تیمار ۱ میلی‌گرم بر لیتر از BAP اثر منفی بر روی ریشه‌زایی داشت؛ در بعضی موارد حتی به صفر نیز رسید. در مقایسه‌ی تیمارها بیشترین ظهور ساقه‌های نو در غلظت‌های ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر از NAA و صفر در هر دو ریزنمونه مشاهده شد. حضور همزمان هر دو تنظیم‌کننده‌ی رشد، ساقه‌زایی را مهار کرده است. احتمالا تنظیم‌کننده‌های رشد آندوژن مابیش به ساقه‌زایی کمک کرده است. علاوه بر این می‌توان علت حضور ساقه‌های نو در نمونه‌ی کنترل را نیز به علت وجود احتمالی مریستم انتهایی بر روی ریزنمونه نسبت داد. در نمونه‌های شاهد، کمترین وزن تر کالوس در کوتیلدون مشاهده شد. در هیپوکوتیل کالوس‌زایی در شاهد صفر ولی در کوتیلدون کالوس‌زایی در نمونه‌های شاهد نیز مشاهده شد. بهترین ظهور ساقه‌های نو در حضور تیمار ۱ و صفر از BAP و NAA مشاهده شد. در غیاب تنظیم-

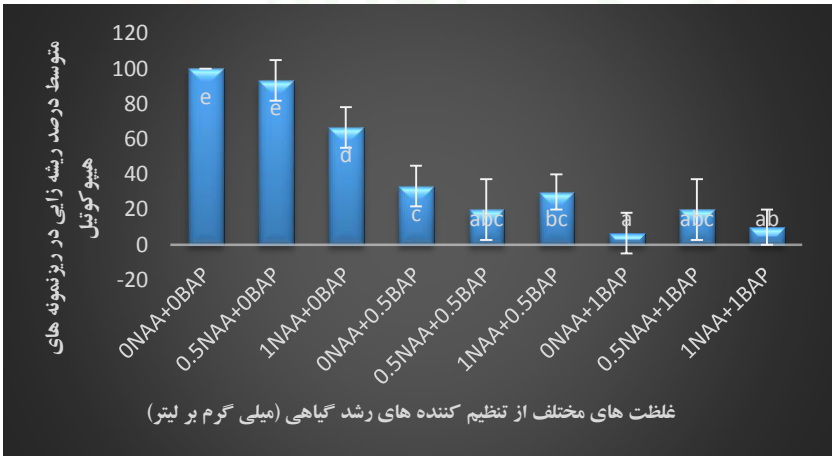
IrHC2019

کننده‌های رشد خارجی، ساقه‌زایی چندانی مشاهده نمی‌شود و ساقه‌زایی در حضور NAA در ریزنمونه‌های کوتیلدون اثر ممانعتی داشته و BAP طبق انتظار بهترین ساقه‌زایی را بروز داد.



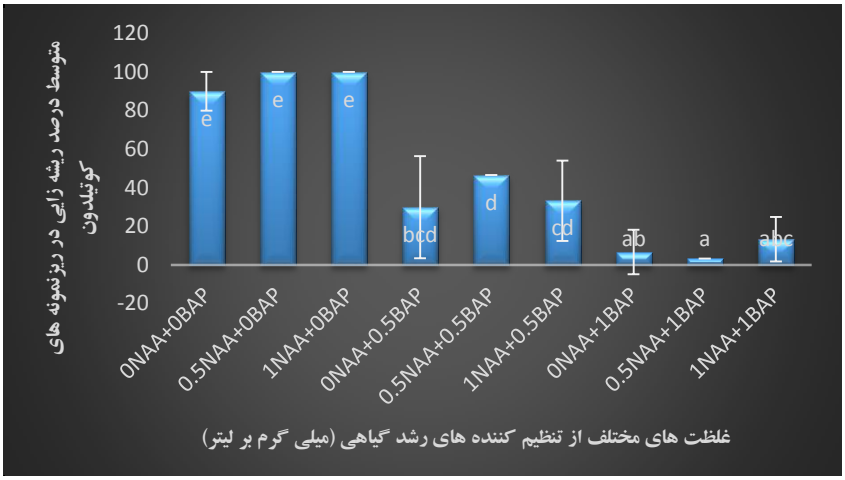
نمودار شماره ۱-متوسط درصد کالوس زایی در ریز نمونه های هیپوکوتیل

نمودار شماره ۲- متوسط درصد کالوس زایی در ریزنمونه های کوتیلدون

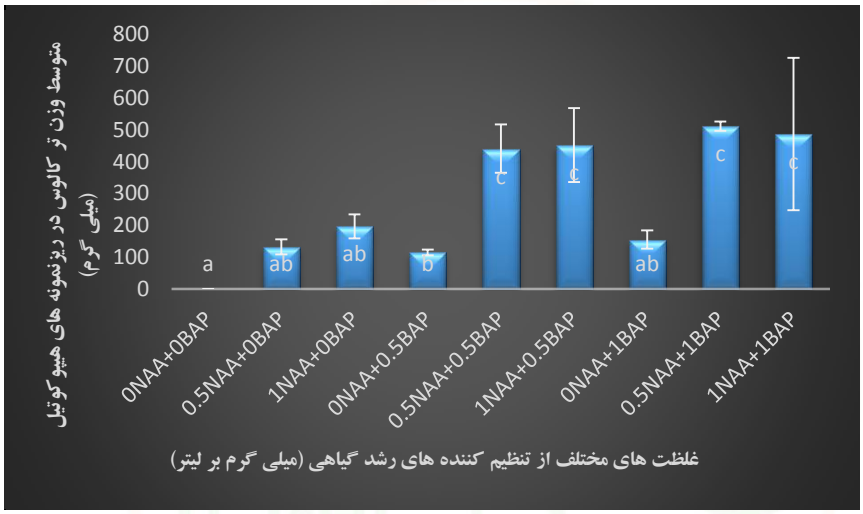


نمودار شماره ۳- متوسط درصد ریشه‌زایی در ریزنمونه های هیپوکوتیل

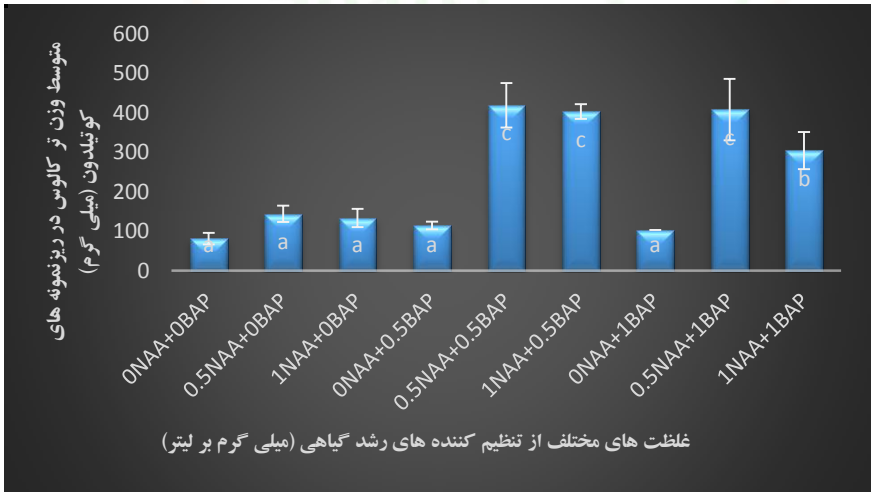
IrHC2019



نمودار شماره ۴- متوسط درصد ریشه‌زایی در ریزنمونه‌های کوتیلدون

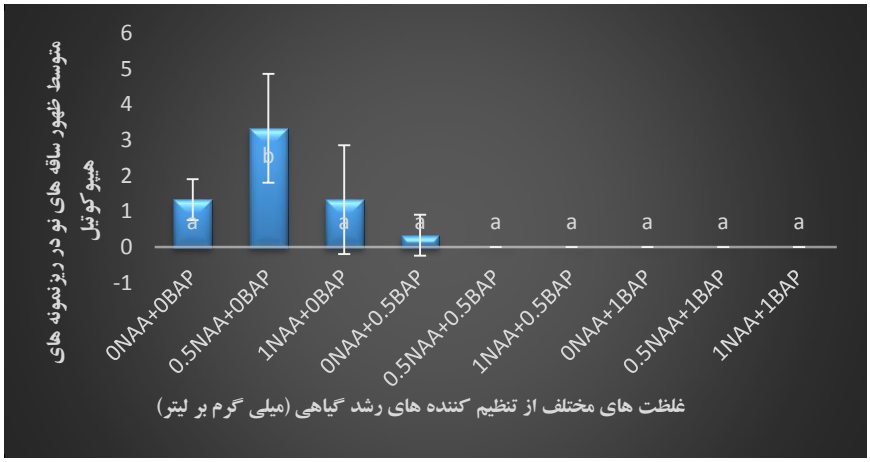


نمودار شماره ۵- متوسط وزن تر کالوس در ریزنمونه‌های هیپوکوتیل (میلی‌گرم)

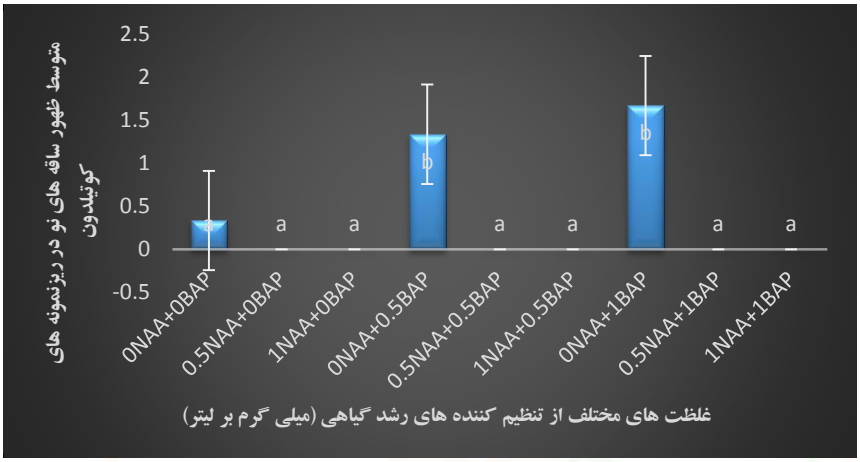


نمودار شماره ۶- متوسط وزن تر کالوس در ریزنمونه‌های کوتیلدون

IrHC2019



نمودار شماره ۷- متوسط ظهور ساقه‌های نو در ریزنمونه‌های هیپوکوتیل



نمودار شماره‌ی ۸- متوسط ظهور ساقه‌های نو در ریزنمونه‌های کوتیلدون

منابع

Bowers, W. S. 1980. Juvocimenes: Potent juvenile hormones mimics from sweet basil. Science, 29: 1030-1332.

Daniel, V. N., and Daniang, I. E. 2011. Phytochemical analysis and mineral elements composition of Ocimum basilicum obtained in JOS Metropolis, Plateau state, Nigeria. International Journal of Engineering & Technology, 11(6): 135-138.

Elgayyar, M. F. 2001. Antimicrobial activity of Essential oils from plants against selected pathogenic and saprophytic microorganisms. J. Food prroduction, 64(7): 1019-1024.

Gill, B. S. 1996. Effect of different transplanting dates and harvesting stages on the quality of French basil oil. Journal of herb Spice Medicinal plants, 4(3): 35-42.

Murashige T., and Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures.PhysiologiaPlantarum 15: 473-497.

Effect of different plant growth regulators concentration on callus inducton in different explants of Basil

Roghaieh Holghoomi[1]*, Siyavash Hosseini Sarghein[1], Jalil Khara[1], Bahman Hosseini[2]
[1]Department of Biology, Faculty of Science, University of Urmia, Urmia, Iran
[2] Department of Horticulture, Faculty of Agriculture, University of Urmia, Urmia, Iran
[*]*Corresponding Author: rogy.holghoomi@gmail.com*

Abstract

Basil is an important and valuable medicinal plant belongs to the family of Lamiaceae, which contains several antioxidant compounds and its essential oil has anti-bacterial and insecticidal properties with its terpenoid and phenolic compounds. In this study, in order to optimize callus induction in this plant, the effects of different concentrations (0, 0.5 and 1 mg / l) of BAP and NAA was investigated on hypocotyl and cotyledon explants in a factorial experiment based on completely randomized design with three replications. The percent of callus, fresh callus weight, percent of rooting and shooting were considered. Naphthaleneacetic acid and benzylaminopurine were effective on callus induction and its growth. Callus induction in all compounds and in both types of explants were observed. In treatment of one milligram per liter of benzylaminopurine, rooting reached its lowest level in hypocotyl explants. The highest fresh weight of callus was observed in the presence of both growth regulators at a concentration of 1 mg / l. Also, the presence of new shoots was observed in 0.5 (mg/l) of benzylaminopurine and 0 mg/l of naphthaleneacetic acid in the both of explants.

***Keywords*:** Basil, Benzylaminopurine, Cotyledon, Hypocotyl, Naphthaleneacetic acid.

IrHC2019