تولید متابولیت ثانویه آلیسین از طریق القای کالوس‌زایی در موسیر ایرانی

نسرین فرهادی[۱]، فرشاد کاکاوند[۲*]، فاطمه زاهدزاده[۱]، جابر پناهنده[۱]

[۱] گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز، تبریز

[۲] دانشگاه آزاد اسلامی، واحد قزوین، باشگاه پژوهشگران جوان و نخبگان، قزوین، ایران

*نویسنده مسئول: kakavand.f@gmail.com

چکیده

موسیر ایرانی با نام علمی *Allium hirtifolium* Boiss گیاهی چندساله از خانواده Alliaceae است که به صورت وحشی در مراتع و دامنه رشته‌کوه زاگرس می‌روید. این پژوهش با هدف بررسی باززایی غیرمستقیم پیازچه از طریق تولید کالوس و مقایسه مقدار آلیسین کالوس و پیازچه‌های باززایی شده موسیر ایرانی انجام گردید. برای این منظور ریز نمونه‌های دارای صفحه پایگاهی در محیط کشت MS دارای غلظت‌های مختلف تنظیم‌کننده‌های رشد کشت گردیدند، قطعات کالوس حاصل به محیط‌های کشت دارای سیتوکینین‌های مختلف (تیدیازرون، کینیتین، بنزیل‌آمینو پورین) به‌منظور پیازچه‌زایی انتقال داده شدند. مقدار آلیسین کالوس و پیازچه‌های باززایی شده با استفاده از روش اسپکتروفتومتری اندازه‌گیری شد. در این بررسی اضافه نمودن بنزیل‌آمینوپورین همراه با هر دو اکسین 2,4-D و نفتالین استیک اسید به‌طور معنی‌داری کالوس‌زایی را افزایش داد و کارایی القای کالوس‌زایی در محیط کشت دارای نفتالین استیک اسید پایین‌تر از 2,4-D بود. بیشترین درصد کالوس‌زایی در ریزنمونه‌های کشت شده در محیط کشت دارای ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر بنزیل‌آمینو پورین حاصل شد. بالاترین درصد پیازچه‌زایی، در غلظت یک میلی‌گرم در لیتر از هر یک سیتوکینین‌ها در ترکیب با ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر نفتالین استیک اسید حاصل شد و بالاترین درصد در محیط کشت دارای تیدیازرون و سپس به‌ترتیب در محیط‌های کشت دارای کینیتین و بنزیل‌آمینو پورین مشاهده شد. بررسی مقدار آلیسین در کالوس و پیازچه‌های موسیر نشان داد که میزان آلیسین در کالوس موسیر ۱۸ درصد بیشتر از پیازچه‌های باززایی شده آن می‌باشد.

کلمات کلیدی: **موسیر ایرانی، کالوس‌زایی، باززایی غیرمستقیم، سیتوکینین، آلیسین**

مقدمه

موسیر با نام علمی *Allium hirtifolium* Boiss گیاهی چندساله از خانواده Alliaceae است که ازجمله گیاهان بومی و با ارزش ایران می‌باشد و به‌صورت وحشی در مراتع و دامنه رشته‌کوه زاگرس می‌روید (Rechinger, 1984). موسیر دارای ارزش غذایی بالایی است که قسمت‌های خوراکی آن برگ‌ها و سوخ است که مهم‌ترین ماده مؤثره آن آلیسین می‌باشد. در حال حاضر متأسفانه به دلیل بهره‌برداری‌های بی‌رویه و برداشت نادرست در بسیاری از مراتع، تراکم گیاه موسیر در واحد سطح به‌شدت پایین آمده است و جزء گونه‌های در خطر انقراض قرار دارد (Ghahremani-Majd *et al.*, 2012). ازاین‌رو انجام تحقیقاتی در راستای حفظ و گسترش کشت این گیاه ارزشمند ضروری است. موسیر به‌طورمعمول با پیازچه تکثیر می‌شود اما سرعت تکثیر از این طریق بسیار پایین بوده و مقرون‌به‌صرفه نیست. از طرف دیگر تولید پیاز از طریق بذر با مشکل عدم جوانه‌زنی و جوانه‌زنی غیریکنواخت مواجه می‌باشد. از طرف دیگر بذر موسیر در صورت جوانه‌زنی به ۳-۲ سال نیاز دارد تا از نظر اقتصادی سوخ قابل برداشت تولید کند (Asadian *et al.*, 2001). وجود مشکلات مزبور در تکثیر این گیاه انجام مطالعات اصلاحی و ژنتیکی در مورد موسیر را با محدودیت

مواجه نموده است. در بیشتر گونه‌های متعلق به جنس آلیوم تکثیر از طریق کشت بافت می‌تواند مواد گیاهی کافی جهت انجام اهلی سازی و برنامه‌های اصلاحی و تولید انبوه متابولیت‌های ثانویه این گیاهان را فراهم آورد (Mukhopadhyay *et al.*, 2005).

در این راستا، اثرات ترکیبی غلظت‌های مختلف تنظیم‌کننده‌های رشد سیتوکینین و اکسین بر کالوس‌زایی، پیازچه زائی غیرمستقیم موسیر مورد بررسی قرار گرفت و همچنین میزان تولید آلیسین در کالوس و پیازچه‌های باززایی شده نیز بررسی شد.

مواد و روش‌ها

پس از ضدعفونی پیازها، زیر هود لامینار پیازها به‌صورت عمودی به قطعات واجد ۲ میلی‌متر طبق پیاز تقسیم و در محیط کشت MS (Murashige and Skoog, 1962) کشت شدند. محیط کشت MS مورد استفاده در این مطالعه، دارای ۳ درصد ساکارز، ۰/۸ درصد آگار و ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر میواینوزیتول به همراه ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر دی کلروفنوکسی استیک اسید[1]و یا ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر نفتالین استیک اسید[2]در ترکیب با ۰/۵ و ۱ میلی‌گرم در لیتر بنزیل آمینو پورین برای القای کالوس استفاده گردید. نمونه‌های کشت شده به ژرمیناتور تحت شرایط تاریکی و درجه حرارت ۲±۲۵ درجه سانتی‌گراد منتقل گردیدند. برای باززایی پیازچه از کالوس، کالوس‌های حاصل در محیط کشت MS دارای نسبت‌های مختلف بنزیل آمینو پورین[3](۰/۵ و ۱ میلی‌گرم در لیتر)، کینیتین[4](۰/۵ و ۱ میلی‌گرم در لیتر) و تیدیازرون[5](۰/۵ و ۱ میلی‌گرم در لیتر) همراه با ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر نفتالین استیک اسید کشت گردیدند. محیط‌های کشت مورد استفاده دارای ۳ درصد ساکارز، ۰/۸ درصد آگار و ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر میواینوزیتول بودند. نمونه‌های کشت شده به ژرمیناتور تحت شرایط ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی و درجه حرارت ۲±۲۵ درجه سانتی‌گراد منتقل گردیدند.

مقدار آلیسین کالوس و پیازچه‌های باززایی شده موسیر بر اساس روش اسپکتروفتومتری با استفاده از ترکیب ۴-مرکاپتوپریدین تعیین گردید (Miron *et al.*, 2002).

این آزمایش به‌صورت طرح کاملاً تصادفی با ۴ تکرار و ۴ مشاهده در هر تکرار انجام شد. تجزیه داده‌ها با نرم‌افزار آماری SPSS Ver. 16 انجام گرفت و مقایسه میانگین داده‌ها با استفاده از آزمون دانکن انجام شد.

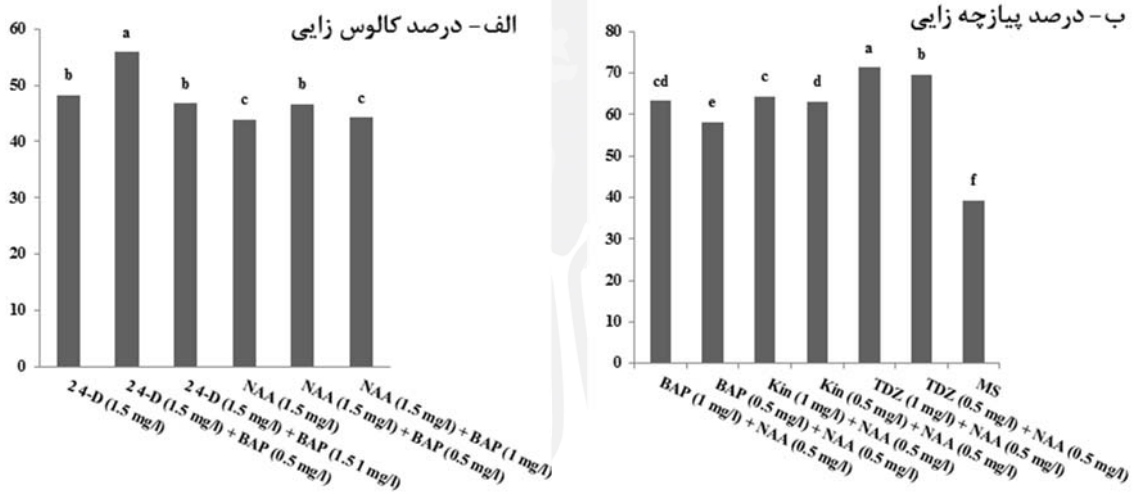
نتایج و بحث

بر اساس نتایج تجزیه واریانس تنظیم‌کننده‌های رشد اثر معنی‌داری برای کالوس‌زایی ریزنمونه‌های موسیر داشتند. درصد کالوس‌زایی در ریزنمونه‌های موسیر در تیمارهای مختلف از تنظیم‌کننده‌های رشد به‌طور معنی‌داری متفاوت بود. در این بررسی اضافه نمودن BAP همراه با هر دو اکسین 2,4-D و NAA به‌طور معنی‌داری کالوس‌زایی را افزایش داد و کارایی القای کالوس‌زایی در محیط کشت دارای NAA پایین‌تر از 2,4-D بود. بیشترین درصد کالوس‌زایی در ریزنمونه‌های کشت شده در محیط کشت دارای ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP حاصل شد (شکل ۱-الف). استفاده از 2,4-D و BAP در محیط کشت با درصد بالایی از کالوس‌زایی در ریزنمونه‌های دارای صفحه پایگاهی *Allium chinense* نیز همراه بود (Yan *et al.*, 2009). Luciani و همکاران (2006) نیز استفاده از 2,4-D و BAP برای کالوس‌زایی در ریزنمونه‌های مختلف سیر را گزارش کرده‌اند.

[1] 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D)
[2] 1-Naphthaleneacetic acid (NAA)
[3] 6- Benzyl Amino Purine (BAP)
[4] Kinetin (Kin)
[5] Thidiazuron (TDZ)

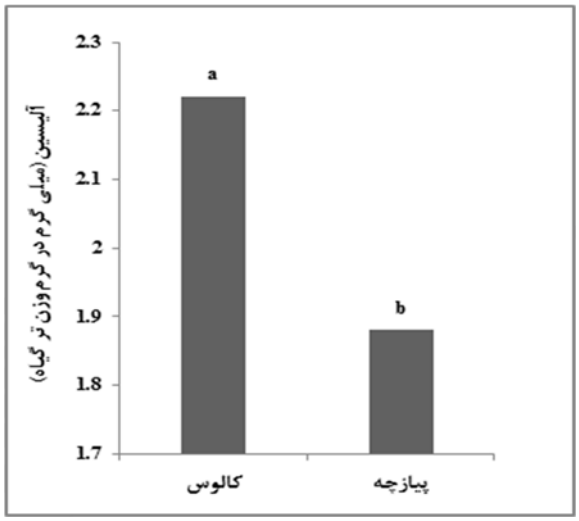
سیتوکینین‌ها نقش مهمی در باززایی پیازچه‌های درون شیشه‌ای دارند، در همین راستا جهت القای پیازچه‌زایی، کالوس‌های حاصل در محیط‌های کشت دارای غلظت‌های مختلف سیتوکینین‌های BAP، Kin و TDZ همراه با NAA کشت گردیدند. نتایج تجزیه واریانس نشان می‌دهد باززایی پیازچه در کالوس‌های موسیر به‌طور معنی‌داری تحت اثر تنظیم‌کننده‌های رشد قرار داشت. در همه محیط‌های کشت پیازچه‌زایی صورت گرفت ولی درصد پیازچه‌زایی در محیط‌های دارای سیتوکینین‌ها و NAA در مقایسه با محیط بدون تنظیم‌کننده رشد به‌طور معنی‌داری بالاتر بود. در مطالعه حاضر بالاترین درصد پیازچه‌زایی، در غلظت یک میلی‌گرم در لیتر از هر یک سیتوکینین‌ها در ترکیب با ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA حاصل شد و بالاترین درصد در محیط کشت دارای تیدیازرون و سپس به‌ترتیب در محیط‌های کشت دارای کینیتین و بنزیل‌آمینو پورین مشاهده شد (شکل ۱-ب). سیتوکینین‌های مختلف اثرات متفاوتی بر پیازچه‌زایی گونه‌های مختلف آلیوم دارند. Haider و همکاران (2015) بالاترین درصد پیازچه‌زایی (۶۳/۳۳ درصد) از کالوس سیر را در محیط کشت دارای ۱ میلی‌گرم در لیتر BAP و ۲ میلی‌گرم در لیتر NAA گزارش کرده‌اند. Tubic و همکاران (2011) بالاترین پیازچه‌زایی در ریزنمونه‌های پیاز کوهی[۶]را در محیط کشت دارای ۱/۱ میلی‌گرم در لیتر TDZ گزارش نموده‌اند و استفاده از همین مقدار BA تعداد پیازچه باززایی شده را به یک‌سوم کاهش داد.

بررسی مقدار آلیسین در کالوس و پیازچه‌های موسیر نشان داد که میان آلیسین در کالوس موسیر ۱۸ درصد بیشتر از پیازچه‌های موسیر می‌باشد (شکل ۲). بسیاری از محققین نیز تولید متابولیت‌های ثانوی از طریق القای کالوس در بسیاری از گونه‌های گیاهی گزارش کرده‌اند (Singh *et al.*, 2014).



شکل ۱- تأثیر تنظیم‌کننده‌های مختلف رشدی بر درصد کالوس‌زایی (الف) و باززایی غیرمستقیم پیازچه (ب) در موسیر ایرانی.

Allium schoenoprasum[۱]



شکل ۲- مقدار آلیسین در کالوس و پیازچه موسیر ایرانی.

منابع

Asadian, G., Jalili, H., Faramarzi, J. and Babakhanlo, P. 2001. Cultivation and domestication of mooseer (*Allium hirtifolium*) in Hamadan. Natural Resources Research Center of Hamadan. 15 p. (In Persian)

Ghahremani-majd, H., Dashti, F., Dastan, D., Mumivand, H., Hadian, J. and Esna-Ashari, M. 2012. Antioxidant and antimicrobial activities of Iranian mooseer (*Allium hirtifolium* Boiss) populations. Horticulture, Environment, and Biotechnology; 53: 116-122.

Haider, S.R., Hossain, M.R., Rahman, S., Sultana, S., Quddus, T., Chakraborti, M., Hoque, A., Shahriar, M.H. and Haque, M.A. 2015. In vitro plantlet regeneration of four local garlic (*Allium sativum*) accessions of Bangladesh. British Biotechnology Journal; 8(3): 1-12.

Luciani, G.F., Mary, A.K., Pellegrini, C. and Curvetto, N.R. 2006. Effects of explants and growth regulators in garlic callus formation and plant regeneration. Plant Cell, Tissue and Organ Culture; 87: 139-143.

Miron, T., Shin, I., Feigenblat, G., Weiner, L., Mirelman, D., Wilchek, M. and Rabinkov, A. 2002. A Spectrophotometric assay for allicin, alliin, and alliinase (alliin lyase) with a chromogenic thiol: reaction of 4-mercaptopyridine with thiosulfinates. Analytical Biochemistry; 307: 76-83.

Mukhopadhyay, M. J., Sengupta, P., Mukhopadhyay, S. and Sen, S. 2005. In vitro stable regeneration of onion and garlic from suspension mustard (*Brassica juncea* var. tsatsai). Plant Cell, Tissue and Organ Culture; 83: 123-127.

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

Rechinger, K.H. 1984. Flora Iranica, Alliaceae. Vol. 76. Akademische Druck, Univ. Verlagsanstalt Graz, Austria, 85 p.

Singh, C.R., Kathiresan, K., Anandhan, S. and Suganthi, K. 2014. Antioxidant and antibacterial activity of field grown and tissue cultured root callus of mangrove species. European Journal of Medicinal Plants; 4(6): 723-742.

Tubic, L., Zdravkovic-Korac, S., Mitic, N., Milojevic, M., Calic-Dragosavac, C. and Vinterhalter, B. 2011. Plant regeneration from transverse stalk sections of chive plants. Romanian Biotechnological Letters; 16(1): 55-59.

Yan, M.M., Xu, C., Kim, C.H., Um, Y.C., Apho Bah, A. and Guo, D.P. 2009. Effects of explant type, culture media and growth regulators on callus induction and plant regeneration of Chinese jiaotou (*Allium chinense*). Scientia Horticulturae; 123: 124-128.

The Allicin Production as a Secondary Metabolite via Callus Induction in Persian Shallot

Nasrin Farhadi[1], Farshad Kakavand[2*], Fatemeh Zahedzadeh[1], Jaber Panahandeh[1]
[1] Department of Horticultural Sciences, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz
[2] Young Researchers and Elite Club, Qazvin Branch, Islamic Azad University, Qazvin ,Iran
Corresponding Author: kakavand.f@gmail.com

Abstract

The Persian shallot (*Allium hirtifolium*) is an annual plant from Alliaceae family, which grows wild in the rangelands and hillsides of Zagros Mountains. The present study was aimed to investigate the indirect bulblet regeneration via callus induction and comparison the allicin content in callus and regenerated Persian shallot bulblets. The explants with basal plate were cultured in MS media supplemented with different concentrations of plant growth regulators. For bulblete induction the obtained calli were transferred to MS media with different cytokinins (6-benzylaminopurine, kinetin, thidiazuron). The allicin content of callus and regenerated bulblets was assayed spectrophotometric. In the present study 6-benzylaminopurine (BAP) with both auxins dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) and 1-naphthaleneacetic acid (NAA) significantly increased the callus induction and the NAA efficiency in callus induction was lower than 2,4-D. The highest callus induction was obtained in supplemented medium with 1.5 mg l^{-1} 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) and 0.5 mg l^{-1} 6-benzylaminopurine (BAP). The highest bulblet regeneration was obtained in 1 mg l^{-1} of each cytokinins in combination with 0.5 mg l^{-1} NAA and the highest percent was observed in supplemented media with thidiazuron followed by kinetin and BAP. The investigation of allicin content in callus and bulblet showed that the allicin content in callus 18 % is more than regenerated bulblets.

***Keywords*: Persian shallot, Callus Induction, Indirect Regeneration, Cytokinins, Allicin**