تأثیر غلظت‌های مختلف اسید ایندول بوتیریک بر کالوس‌زایی نسترن وحشی

وحید روحی1، محبوبه رحیمی2*، عبدالرحمان محمدخانی 3 و علی اکبر فدایی تهرانی4
استادیار گروه علوم باغبانی دانشگاه شهرکرد، شهرکرد. 2-دانشجوی کارشناسی ارشد علوم باغبانی دانشگاه شهرکرد، شهرکرد. 3- استادیار گروه علوم باغبانی دانشگاه شهرکرد، شهرکرد. 4- استادیار گروه گیاه‌پزشکی دانشگاه شهرکرد، شهرکرد.
*نویسنده مسئول

چکیده

نسترن وحشی (Rosa canina L.) یکی از مهم‌ترین گیاهان دارویی است که از کشت کالوس آن می‌توان برای بررسی وقایع فیزیولوژیکی و تولید ترکیبات ثانویه نظیر روغن‌های ضروری و ترکیبات دارویی مانند اسیدآسکوربیک استفاده نمود. تحقیق حاضر در راستای دست‌یابی به کالوس‌های جنین زا که بهترین ریزنمونه‌ی قابل استفاده برای انتقال ژن و باززایی گیاه معرّفی شده‌اند صورت پذیرفت. این آزمایشی در قالب طرح پایه‌ی کاملاً تصادفی با به‌کارگیری غلظت‌های مختلف اسید ایندول بوتیریک (1، 2/5، 4 و 5/5 میلی‌گرم بر لیتر) در ترکیب با 5/5 میلی‌گرم بر لیتر توفوردی، در 4 تکرار انجام گرفت. ابتدا قطعاتی از شاخه‌های فرعی نسترن وحشی در اواخر آبان‌ماه 1391 تهیه گردید. قطعات1/5 سانتی‌متری توسط محلول‌های اتانول 70 درصد به‌مدّت 1 دقیقه و هیپوکلریت‌سدیم10 درصد به‌مدّت 15 دقیقه ضدعفونی شدند. سپس ریزنمونه‌ها به‌صورت افقی روی محیط‌کشت جامد MS قرارداده‌شدند و پس از گذشت 3 ماه وزن تر و خشک کالوس‌ها اندازه‌گیری گردید. کالوس بدست آمده دارای بافتی با سفتی متوسط و ناصاف به رنگ سفید برفکی آمیخته به سبز بسیار کمرنگ بود. در ضمن گاهی به دلیل داشتن رنگدانه‌های قرمز (آنتوسیانین) لکه‌های صورتی نیز روی کالوس مشاهده شد. نتایج نشان داد بین غلظت‌های مختلف اسید ایندول بوتیریک بر روی کالوس‌زایی اختلاف معنی‌داری وجود دارد. بیش‌ترین وزن تر و خشک کالوس در غلظت4 میلی‌گرم بر لیتر اسید ایندول بوتیریک مشاهده شد. کم‌ترین وزن تر و خشک مربوط به پایین‌ترین غلظت اسید ایندول بوتیریک(1 میلی‌گرم بر لیتر) بود.

کلمات کلیدی: Rosa canina L.، اسید ایندول بوتیریک، توفوردی، کالوس Alpha، فرهنگ لغت

مقدمه

نسترن یا رز وحشی با نام علمی (Rosa canina L.) متعلق به تیره Rosaceae می‌باشد، غالباً به عنوان پایه برای بسیاری از رزهای مدرن به ویژه رزهای هیبرید استفاده می‌شود (شریفی و باقری، 1389). همچنین یکی از مهم‌ترین گیاهان دارویی است که میوه‌های آن حاوی ترکیب‌های دارویی و غذایی ارزش‌مندی نظیر ترکیب‌های فنولیکی، کربوهیدرات‌های محلول، کارتنوئیدها و مواد معدنی می‌باشد (سعیدی و امیدبیگی، 1387). از کشت کالوس رزها برای بررسی وقایع فیزیولوژیکی و تولید ترکیبات ثانویه نظیر روغن‌های ضروری و ترکیبات دارویی مانند آسکوربیک اسید استفاده‌شده‌است. برخی تشکیل جوانه‌های آغازین شاخه را در کشت‌های طولانی مدّت کالوس از هیبریدهای رز گزارش کرده‌اند (شریفی و باقری، 1389). تولید متابولیتهای ثانویه و نادر در گیاهان از طریق کشت سلولی وسوسپانسیون یکی از زمینه‌هایی است که در سال‌های اخیر به دلیل دارا بودن ارزش اقتصادی بالای این ترکیبات و یا هزینه بالای فراوری ترکیبات به صورت گسترده مورد استفاده قرارگرفته‌است (ساتو و همکاران، 2001).

اکسین‌ها در تشدید تقسیمات سلولی دخالت دارد، توفوردی (2 و4- دی کلرو فنوکسی اسید استیک) غالباً به‌عنوان یک اکسین قوی تلقی می‌شود ولی این ویژگی فقط مربوط به تشکیل کالوس و رویان‌های بدنی می‌باشد. اگر بافت‌های گیاهی روی محیط کشت غذایی که دارای غلظت زیادی از تنظیم‌کننده‌های رشد (اکسین و سیتوکینین) هستند، قرار داده‌شوند، سلول‌ها غیرمتمایز شده و کالوس تشکیل می‌شود. آثار اکسین و اتیلن اغلب متقابل است، تیمار نسوج با اکسین‌ها به تولید مقادیر زیادی اتیلن منجر شده که سبب جلوگیری از انتقال اکسین می‌شود. به‌طور کلی هیچ واکنشی را نمی‌توان به‌تنهایی نتیجه اثر یک هورمون منحصر به فرد

دانست. در واکنش‌های هورمونی ممکن است یک هورمون، اثر هورمون دیگر را تشدید یا خنثی کند. بسیاری از پدیده‌های فیزیولوژیک گیاه که به رشد و تمایز منجر می‌شوند، دارای الگوی هورمونی در سیستم متابولیسمی‌اند که این الگوها تحت کنترل سیستم ژنتیکی گیاه قرار دارند (سید طباطبایی و امیدی،1390). ویلنگ و لیکنگ (2004) موفق شدند از بافت های برگ و ساقه گیاه Orthosiphon stamineus در محیط کشت حاوی دو نوع اکسین توفوردی و اسید نفتالیک استیک کالوس تولید کنند. استیکن و ارکیسلی (2001) اثرات هورمون‌های NAA و BA را بر کالوس‌زایی نسترن وحشی بررسی نمودند.

لذا ازآنجا که برای تولید انبوه کالوس و بهینه سازی سوسپانسیون سلولی جهت استخراج متابولیت های ثانویه مطالعات اندکی صورت گرفته است، با توجه به ارزش دارویی، غذایی، زینتی و تجاری گل رز (اسمارانداا، 2011 و ویشلقی و همکاران، 1389)، پژوهش در زمینه ریزازدیادی نسترن وحشی به عنوان مهم‌ترین پایه گل رز از اهمیت ویژه‌ای برخوردار می‌باشد. به‌این منظور این آزمایش جهت بهینه سازی کالوس زایی گیاه‌دارویی نسترن وحشی صورت پذیرفت.

مواد و روش‌ها

آزمایش در قالب طرح پایه‌ی کاملاً تصادفی در 4 سطح تیمار شامل غلظت‌های مختلف اسید ایندول بوتیریک (1، 2/5، 4 و 5/5 mg/l) و 4 تکرار (هر تکرار شامل 2 ریزنمونه) انجام شد. نمونه‌ها در اواسط فصل پاییز از قسمت وسط ساقه‌های فرعی درختچه‌ای در مرحله‌ی میوه‌دهی (قرمز پررنگ) واقع در محوطه‌ی مجموعه گلخانه‌های دانشگاه شهرکرد تهیّه شدند، قطعات گره‌دار 1/5 سانتی‌متری ساقه‌های فرعی ابتدا با آب جاری به مدّت 2 دقیقه شسته‌شدند، سپس توسط محلول‌های اتانول 70 % به مدّت 1 دقیقه وهیپوکلریت سدیم تجاری (حاوی 5/25 درصد ماده مؤثّره) به مدّت 15 دقیقه با حرکت مداوم ظرف در طول این مدّت ضدعفونی شدند و پس از آن 2 بار با آب مقطر استریل (هر بار به مدّت 5 دقیقه) آب‌شویی شدند. و پس از آن در محیط کشت MS $\frac{1}{2}$ حاوی 5/5 mg/l توفوردی، 20گرم ساکارز، 8 گرم آگار و pH 5/7-5/8 به‌صورت افقی قرارداده‌شدند. پس از گذشت 3 ماه از تاریخ کشت و بدون هیچ واکشتی، آزمایش متوقف‌شد. رشد کالوس با ارزیابی وزن تر یا خشک کالوس‌ها اندازه‌گیری شد. وزن تازه با انتقال کالوس به ورق آلومینیومی وزن شده اندازه‌گیری شد، بدین ترتیب که وزن باهم آن‌ها، بی درنگ پس از برداشتن کالوس‌ها از روی محیط‌کشت اندازه‌گیری شد، زیرا کالوس به سرعت آب خود را از دست می‌دهد، بنابراین به سرعت وزن شد. هنگامی‌که وزن تازه به‌دست‌آمد، کالوس‌های مورد نظر با ورق آلومینیومی بسته‌بندی شدند (به طوری که تبادل هوایی وجود داشته باشد) و در دمای 80 درجه سانتی‌گراد به مدّت 2روز قرارداده شدند. در نهایت کالوس و ورق آلومینیومی دوباره وزن شدند و وزن کالوس با کم‌کردن وزن ورق آلومینیوم به دست‌آمد. داده‌ها پس از نرمال‌سازی از طریق فرمول $X = \sqrt{Y + 0.5}$ (ولی زاده و همکاران، 1379)، توسط نرم افزار SAS 9.1 تجزیه گردید و مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون LSD 0/05 انجام پذیرفت.

نتایج و بحث

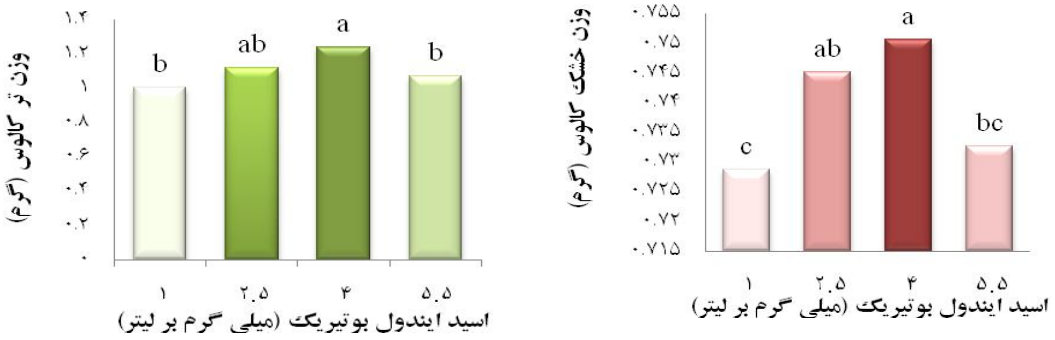
با توجه به نتایج حاصل از تجزیه واریانس (جدول شماره 1)، دو شاخص وزن تر و وزن خشک کالوس در سطح 5 درصد معنی‌دار شده است. مقایسه میانگین‌های اعداد نشان داد غلظت4 میلی‌گرم بر لیتر اسید ایندول بوتیریک بیشترین تاثیر را بر وزن تر وخشک کالوس داشته است (شکل 1). همچنین کم‌ترین وزن تر و خشک کالوس مربوط به پایین‌ترین غلظت اسید ایندول بوتیریک (1 میلی‌گرم بر لیتر) می‌باشد. این پدیده نشان دهنده تأثیر مثبت غلظت‌های مختلف اسید ایندول بوتیریک در ترکیب با توفوردی است. کالوس‌های بدست آمده دارای بافتی با سفتی متوسط و ناصاف به رنگ سفید برفکی آمیخته به سبز بسیار کمرنگ بودند. در ضمن گاهی به دلیل داشتن رنگدانه‌های قرمز (آنتوسیانین) لکه‌های صورتی نیز روی کالوس مشاهده شد .

اثر هورمون‌ها تنها به میزان‌جذب آنها از محیط‌کشت بستگی ندارد، بلکه به پایداری در محیط‌کشت، بافت‌های کشت‌شده و حساسیت بافت هدف نیز بستگی‌دارد. هورمون‌های اضافه‌شده به محیط‌کشت روی سنتز یا تجزیه هورمون‌های‌درونی تأثیر می-گذارند(سید طباطبایی و امیدی،1390).

جدول 1: جدول تجزیه واریانس غلظت‌های مختلف اسید ایندول بوتیریک در ترکیب با توفوردی روی وزن خشک و ترکالوس حاصل از قطعات گره‌دار نسترن وحشی.

منابع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات		
		وزن تر کالوس	وزن کالوس	خشک
اسیدایندول بوتیریک	3	0/0389*	0/0004*	
خطا	12	0/0103	0/0001	

* اختلاف معنی دار در سطح 5 درصد



شکل (1): مقایسه میانگین تأثیر غلظت‌های مختلف اسید ایندول بوتیریک در ترکیب با توفوردی روی وزن خشک(الف) و تر (ب) کالوس حاصل از قطعات گره‌دار نسترن وحشی.

حروف غیر یکسان نشان دهنده وجود اختلاف معنی دار است.

منابع

سعیدی، ک.، و ر. امیدبیگی، 1388. اندازه‌گیری میزان ترکیب‌های فنولی، کربوهیدرات‌های محلول، کارتنوئیدها و عناصر معدنی میوه نسترن کوهی (Rosa canina L.) در جنوب غربی ایران، فصلنامه علمی-پژوهشی تحقیقات گیاهان دارویی و معطر ایران. جلد 25، شماره 2، صفحه 203 تا 215

شریفی ا. مشتاقی ن. و باقری ع. 1389.کشت بافت گیاهی کاربردی.انتشارات جهاد دانشگاهی مشهد.480ص.

سید طباطبایی، س. ب.، م. امیدی. 1390. کشت بافت و سلول گیاهی، مؤسسه انتشارات دانشگاه تهران.

ولی‌زاده، م.، ع. رضایی و ب. یزدی‌صمدی. 1379. طرح‌های آماری در پژوهش‌های کشاورزی. دانشگاه تهران.

ویشلقی، ن.، م. جلالی جواران، و ا. معینی. 1389. باززایی رز مینیاتوری هفت‌رنگ (Rosa hybrid, cv. 'Tanbakeda'). مجله علوم باغبانی ایران، دوره 41، شماره4، 347-357.

Esitken, A., Sezal, E., 2001. The effects of some hormones on the callus induction in Rosa canina and Rosa dumalis in vitro. Ataturk Univ. Ziraal Fak. Derg. 32(2): 125-128.

Sato F, Hashimoto T, Hachiya A (2001). Metabolic engineering of plant alkaloidbiosynthesis. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States ofAmerica. 98: 367-372.

Smaranda, V., 2011. In vitro multiplication of Rosa canina L. Biology vegetative. 11: 19-21.

Waileng LW, LaiKeng C (2004). Plant regeneration from stem nodal segments of Orthosiphon stamineus banth., a medicinal plant with diuretic activity. In vitro Cellularand Developmental Biology - Plant 40: 115-118.

Effect of indole butyric acid concentration of callus induction in(Rosa canina L.)

V. Rouhi 1, M. Rahimi 2*, A. Mohammad-Khani2 and A. fadaei-Tehrani3

1- M. Sc Student & 2- Assistant Professor Dept. of Horticultural Sciences, Shahrekord University, Shahrekord-Iran. 3- Assistant Professor Dept. of Plant Protection Sciences, Shahrekord University, Shahrekord- Iran.

*Corresponding author

Abstract

Dog rose (Rosa canina L.) is one of the most important medicinal plants that can obtain from callus culture. Callus culture of Dog rose studies physiological processes and the production of secondary compounds such as essential oils and medicinal compounds such as acid ascorbic. An experiment was conducted based on completely randomized design with four replicates. The treatment included Indole Butyric Acid (1, 2.5, 4, and 5.5 mg/l) in combination with 5.5 mg/l 2,4-D. In late November May 2012 was prepared. Explants (1.5 cm) disinfected by ethanol (70%) for one min and sodium hypochlorite (%10) for 15 min in late November 2012. Explants put horizontally on 1/4MS medium and callus wet and dry weight measured after three months. Callus tissue obtained with medium firmness and uneven snowy white mixed with a green pale. Also, in some callus because the pigment red (anthocyanin) observed pink color. Results showed that significant differences among different concentrations of indole butyric acid on the callus creation. The highest and lowest callus wet and dry weight obtained in four and one mg/l IBA, respectively.

Keywords: Rosa canina L., IBA, 2,4-D, Callus