تأثیر غلظت‌های مختلف کینتین بر کالوس‌زایی نسترن وحشی

محبوبه رحیمی [1*]، وحید روحی [2]، عبدالرحمان محمدخانی [2]، علی اکبر فدایی تهرانی [3]
۱- دانشجوی کارشناسی ارشد علوم باغبانی دانشگاه شهرکرد، شهرکرد. ۲- استادیار گروه علوم باغبانی دانشگاه شهرکرد، شهرکرد. ۳- استادیار گروه گیاه‌پزشکی دانشگاه شهرکرد، شهرکرد.
*نویسنده مسئول mahrahimi۸@yahoo.com

چکیده

نسترن وحشی (*Rosa canina* L.) به‌عنوان پایه‌ی گل رز به‌کار برده می‌شود. هم‌چنین یکی از گیاهان دارویی است که از کشت کالوس آن می‌توان برای تولید انبوه گیاهچه‌های جدید و ترکیبات دارویی مانند اسیدآسکوربیک استفاده نمود. تحقیق حاضر با هدف بررسی اثرات کینتین بر خصوصیّات کالوس‌زایی نسترن وحشی صورت پذیرفت. این آزمایش در قالب طرح پایه‌ی کاملاً تصادفی با به‌کارگیری غلظت‌های مختلف کینتین (۰/۷۵، ۱/۵، ۲/۲۵ و ۳ میلی‌گرم بر لیتر) در ترکیب با ۵/۵ میلی‌گرم بر لیتر توفوردی، در ۴ تکرار اجرا گردید. قطعات ۱/۵ سانتی‌متری از شاخه‌های فرعی توسط محلول‌های اتانول ۷۰ ٪ به‌مدّت ۱ دقیقه و هیپوکلریت‌سدیم ۱۰٪ به‌مدّت ۱۵ دقیقه ضدعفونی شدند. سپس ریزنمونه‌ها به‌صورت افقی روی محیط کشت جامد $\frac{1}{2}$ MS قرارداده شدند. پس ازگذشت ۳ ماه و بدون انجام هیچ واکشتی، وزن تر و خشک کالوس‌ها اندازه‌گیری شد. کالوس‌های به‌دست‌آمده دارای سطحی ناصاف، بافتی سفت و به رنگ سبز و آمیخته به رنگ سفید بودند که گاهی لکه‌های صورتی نیز روی آن‌ها مشاهده می‌شد. نتایج نشان‌داد که با افزودن غلظت کینتین، از وزن تر و خشک کالوس کاسته می‌شود. بین غلظت‌های مختلف کینتین اختلاف معنی‌داری وجود داشت. بیش‌ترین وزن تر و خشک کالوس در پایین‌ترین غلظت کینتین (۰/۷۵ میلی‌گرم بر لیتر) مشاهده شد.

واژگان کلیدی: *Rosa canina* L.، کینتین، توفوردی، کالوس

مقدمه

نسترن یا رز وحشی با نام علمی (*Rosa canina* L.) متعلّق به خانواده Rosaceae، بومی اروپا، شمال غرب آفریقا و غرب آسیا می‌باشد. مهم‌ترین پایه گل رز است و با شرایط خشکی و خاک‌های قلیایی سازگاری دارد. قلمه آن به سختی ریشه می‌دهد (۵). هم‌چنین یکی از مهم‌ترین گیاهان دارویی است که میوه‌های آن حاوی ترکیب‌های ارزش‌مندی نظیر ترکیب‌های فنولیکی، کربوهیدرات‌های محلول، کارتنوئیدها و عناصر معدنی می‌باشد (۲).

به‌منظور تولید انبوه گیاهچه‌های جدید، اقدام به تولید کالوس می‌شود. کالوس یا پینه، توده سلول پارانشیمی تمایز نیافته است که در واکنش به زخم، در محل جوش خوردن پیوند یا در محیط درون شیشه‌ای تولید می‌شود. برای تولید کالوس اکسین‌ها و سیتوکینین‌ها به‌کارگرفته می‌شوند امّا سیتوکینین‌ها با غلظت کم‌تری نسبت به اکسین‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرند. کینتین یکی از سیتوکینین‌های مصنوعی است و توفوردی (۲ و۴- دی کلرو فنوکسی اسید استیک) غالباً به‌عنوان یک اکسین قوی تلقّی می‌شود (۱). سیتوکینین‌ها و اکسین‌ها آثار متقابلی دارند. اگر غلظت مناسب سیتوکینین‌ها همراه با اکسین‌ها در یک محیط‌کشت مورد استفاده قرارگیرد، تقسیم سلولی را به‌همراه خواهد داشت. (۳). انتخاب ریزنمونه مناسب برای ایجاد کالوس از اهمّیّت ویژه‌ای برخوردار است. در محیط حاوی توفوردی و کینتین تقسیمات سلولی در کالوس صورت می‌گیرد. کالوس می‌تواند در تهیّه پروتوپلاست، تولید جنین سوماتیک، تولید اندام‌های ریشه و ساقه و تولید متابولیت‌های ثانویه مورد استفاده قرارگیرد (۱). کالوس-های جنین‌زا بهترین و تنها ریزنمونه‌ی قابل استفاده برای انتقال ژن و باززایی گیاه معرّفی شده‌اند (۷، ۹ و ۱۱). کالوس‌های جنین‌زا به کالوس‌های صاف و ناصاف تقسیم می‌گردند. کالوس‌های جنین‌زا ممکن است دارای سطحی صاف یا ناصاف باشند که نوع ناصاف آن توانایی باززایی بیش‌تری نسبت به دیگر کالوس‌ها دارد. کالوس‌های جنین‌زا متراکم‌اند و ساختار سازمان یافته‌ای را به

ویژه در طی آخرین مرحله تمایز نشان می‌دهند. هم‌چنین رنگ سفیدتر (برفکی) و ساختار فشرده‌تری دارند، سلول‌های تشکیل دهنده آن‌ها کم و بیش کروی و دارای هسته‌ی به نسبت بزرگی است. رنگ، ساختار و قدرت باززایی کالوس‌ها تحت تأثیر ژنوتیپ و شرایط‌کشت (محیط‌کشت و شرایط نگهداری کشت‌ها) قرارمی‌گیرد (۳).

اسمارانداا (۲۰۱۱)، در تحقیقی در رابطه با ریزازدیادی نسترن وحشی، تأثیر ترکیب توفوردی با غلظت ۰/۰۲ میلی‌گرم بر لیتر به‌همراه کینتین با غلظت ۲ میلی‌گرم بر لیتر را بر جوانه‌های جانبی مورد بررسی قرارداد و کالوس‌زایی را مشاهده نمود و نیز بیان داشت که می‌توان کالوس‌زایی را به‌وسیله کم کردن غلظت اکسین‌ها ایجاد نمود. . استیکن و ارکیسلی (۲۰۰۱) اثرات هورمون‌های NAA و BA را بر کالوس‌زایی نسترن وحشی بررسی نمودند. حمید و همکاران (۱۹۹۳) در مطالعه‌ای بر کالوس‌زایی ۲ رقم رز هیبرید بیان نمودند که جهت القای کالوس‌دهی، ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر توفوردی به‌همراه ۰/۱میلی‌گرم بر لیتر کینتین برای رقم دیاموند جوبلی و ترکیب این دو هورمون هرکدام به میزان ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر برای رقم لانز فرنسس مناسب می‌باشد.

تحقیق حاضر در راستای دست‌یابی به کالوس‌های جنین‌زا و نیز بررسی اثر غلظت‌های کینتین در ترکیب با توفوردی بر خصوصیّات کالوس‌زایی نسترن وحشی پرداخته‌است.

مواد و روش‌ها

آزمایش مذکور در قالب طرح پایه‌ی کاملاً تصادفی در ۴ سطح تیمار شامل غلظت‌های مختلف کینتین (۰/۷۵، ۱/۵، ۲/۲۵ و ۳ میلی‌گرم در لیتر) و ۴ تکرار (هر تکرار شامل ۲ 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 گره-دار ۱/۵ سانتی‌متری ساقه‌های فرعی ابتدا با آب جاری به مدّت ۲ دقیقه شسته شدند، سپس توسط محلول‌های اتانول ۷۰ ٪ به مدّت ۱ دقیقه و هیپوکلریت سدیم تجاری (حاوی ۵/۲۵ ٪ ماده مؤثره) به مدّت ۱۵ دقیقه با حرکت مداوم ظرف در طول این مدّت ضدعفونی شدند و پس از آن ۲ بار با آب مقطر استریل (هر بار به مدّت ۵ دقیقه) آب‌شویی شدند. و پس از آن در محیط‌کشت MS $\frac{1}{2}$ حاوی ۵/۵ میلی‌گرم بر لیتر توفوردی، ۲۰گرم ساکارز، ۸ گرم آگار و pH ۵/۷-۵/۸ به‌صورت افقی قرارداده‌شدند. پس از گذشت ۳ ماه از تاریخ کشت و بدون هیچ‌گونه واکشتی، آزمایش متوقّف شد. رشد کالوس با ارزیابی وزن تر یا خشک آن اندازه-گیری شد. وزن تازه با انتقال کالوس به ورق آلومینیومی وزن شده اندازه‌گیری شد، بدین ترتیب که وزن باهم آن‌ها، بی‌درنگ پس از برداشتن کالوس‌ها از روی محیط‌کشت اندازه‌گیری شد، زیرا کالوس به سرعت آب خود را از دست می‌دهد، بنابراین به سرعت وزن شد. سپس کالوس‌های مورد نظر با ورق آلومینیومی بسته‌بندی شدند (به طوری که تبادل هوایی وجود داشته باشد) و در دمای ۸۰ درجه سانتی‌گراد به مدّت ۲روز قرارداده شدند. در نهایت کالوس و ورق آلومینیومی دوباره وزن شدند و وزن کالوس با کم کردن وزن ورق آلومینیوم به دست‌آمد. داده‌ها پس از نرمال‌سازی از طریق فرمول $X = \sqrt{Y + 0.5}$ (۶)، توسط نرم افزار SAS ۹,۱ تجزیه‌گردید و مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون LSD در سطح ۵٪ انجام پذیرفت.

نتایج و بحث

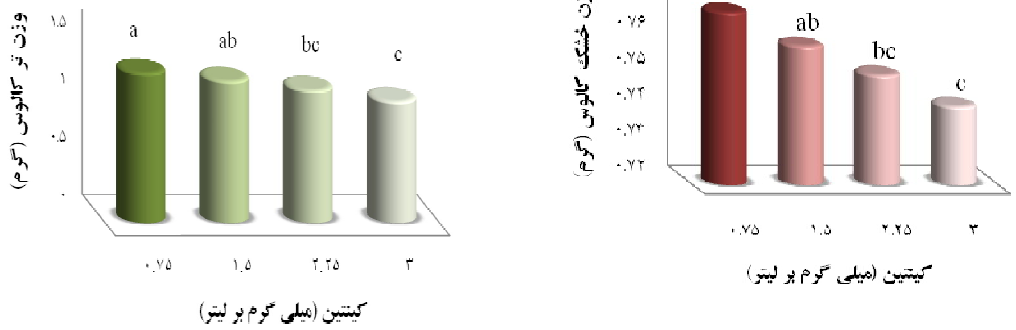
با توجّه به نتایج حاصل از تجزیه واریانس، در مرحله کالوس‌زایی مشخّص شد که بین تیمارهای هورمونی اعمال‌شده در دو صفت وزن تر و وزن خشک کالوس، اختلاف بسیار معنی‌داری در سطح یک درصد وجوددارد (جدول شماره ۱). بر اساس نمودار مقایسه میانگین‌ها، در محیط $\frac{1}{2}$ MS حاوی ۵/۵ میلی‌گرم بر لیتر توفوردی، وزن تر و خشک کالوس، با افزایش غلظت کینتین کاهش می‌یابد. شایان ذکر است به دلیل کاهش سریع و غیر قابل کنترل وزن تازه، وزن خشک معیار مطمئن‌تری است (۳). با توجّه به شکل شماره ۱ (الف و ب)، مشاهده می‌شود که هرچه بر میزان غلظت کینتین افزوده شود، وزن تر و خشک کالوس کاهش می‌یابد.

هم‌چنین با افزایش غلظت کینتین، وزن تر و خشک کالوس به یک میزان کاهش یافته‌است. بین غلظت‌های مختلف کینتین اختلاف معنی‌داری وجود داشت. بیش‌ترین وزن تر و خشک کالوس در کم‌ترین غلظت کینتین (۰/۷۵ میلی‌گرم بر لیتر) مشاهده شد و عکس این مطلب نیز صادق می‌باشد. کالوس‌های به‌دست آمده دارای سطحی ناصاف، بافتی سفت و به رنگ سبز آمیخته به رنگ سفید بودند، که گاهی به‌دلیل داشتن رنگدانه‌های قرمز (آنتوسیانین) لکه‌های صورتی نیز روی آن‌ها دیده می‌شد. این کالوس‌ها به‌سختی از محیط‌کشت جدا می‌شدند. معلوم شده‌است که تولید آنتوسیانین پدیده‌ای ناپایدار در کشت سلولی است (۱). کالوس سبز حاوی کلروفیل است و کلروفیل‌دارشدن برای آغاز رویش ساقه ضروری است (۴). اثر هورمون‌ها تنها به میزان جذب آنها از محیط‌کشت بستگی ندارد، بلکه به پایداری در محیط‌کشت، بافت‌های کشت شده و حسّاسیّت بافت هدف نیز بستگی‌دارد. هورمون‌های اضافه شده به محیط‌کشت روی سنتز یا تجزیه هورمون‌های‌درونی تأثیر می‌گذارند. (۱). با توجّه به توضیحات و نتایج فوق کالوس‌های مذکور با مشخّصات کالوس‌های جنین‌زا و اندام‌زا مطابقت دارد که البتّه جهت دست‌یابی به نتایج بهتر در این زمینه، زمان و تحقیقات بیش‌تری لازم می‌باشد.

جدول شماره (۱): جدول تجزیه واریانس تأثیر غلظت‌های مختلف کینتین و توفوردی بر وزن تر و خشک کالوس‌های حاصل از قطعات گره‌دار ساقه‌ی فرعی نسترن وحشی

		میانگین مربعات	
منابع تغییرات	درجه آزادی	وزن تر کالوس	وزن خشک کالوس
کینتین	۳	۰/۰۴۵۰**	۰/۰۰۵۰**
خطا	۱۲	۰/۰۰۷۲	۰/۰۰۰۰۶

** اختلاف معنی دار در سطح یک درصد



شکل (۱): مقایسه میانگین تأثیر غلظت‌های مختلف کینتین در ترکیب با ۵/۵ میلی‌گرم بر لیتر توفوردی بر (راست) وزن خشک و (چپ) وزن تر کالوس حاصل از قطعات گره‌دار شاخه فرعی نسترن وحشی

* حروف غیر یکسان نشان دهنده وجود اختلاف معنی دار است

منابع

۱) سادات نوری، س. ا.، س. م.، میرمعصومی. ۱۳۹۰. اصول کشت سلول و بافت گیاهی. انتشارات جهاد دانشگاهی تهران.

۲) سعیدی، ک.، و ر. امیدبیگی، ۱۳۸۸. 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 ۲۵، شماره ۲، صفحه ۲۰۳ تا ۲۱۵.

۳) طباطبایی، س. ب.، م. امیدی. ۱۳۹۰. کشت بافت و سلول گیاهی، مؤسّسه انتشارات دانشگاه تهران.

۴) عبدمیشانی، س.، ۱۳۷۲. بیوتکنولوژی گیاهی و اصلاح نباتات. اوّلین کنگره زراعت و اصلاح نباتات.

۵) قاسمی قهساره، م. و م. کافی. ۱۳۸۸. گلکاری علمی و عملی (جلد اول). چاپ چهارم. انتشارات مؤلف. اصفهان.

۶) ولی‌زاده، م.، ع. رضایی و ب. یزدی‌صمدی. ۱۳۷۹. طرح‌های آماری در پژوهش‌های کشاورزی. دانشگاه تهران.

۷) ویشلقی، ن.، م. جلالی جواران، و ا. معینی. ۱۳۸۹. باززایی رز مینیاتوری هفت‌رنگ ('*Rosa hybrid*, cv. 'Tanbakeda'). مجله علوم باغبانی ایران، دوره ۴۱، شماره۴، ۳۴۷-۳۵۷.

۸) Esitken, A., and E. Sezal., ۲۰۰۱. The effects of some hormones on the callus induction in *Rosa canina* and *Rosa dumalis* in vitro. Ataturk Univ. Ziraal Fak. Derg. ۳۲ (۲): ۱۲۵-۱۲۸.

۹) Firoozabady, E., Y. Moy, N. Courtney-Gutterson and K. Robinson. ۱۹۹۴. Regeneration of transgenic rose (*Rosa hybrida*) plants from embryogenic tissue. Biotechnology, ۱۲. ۶۰۹-۶۱۳.

۱۰) Hameed, S., Z. Ahmad, F. Z. Khan, and M. Akram. ۱۹۹۳. Callus cultures of Rosa hybrid cultivars, Diamond Jubly and Lans Frances. Journal Pakistan Botany. ۲۵ (۲): ۱۹۳-۱۹۸.

۱۱) Rout, G. R., B. K. Debata and P. Das. ۱۹۹۱. Somatic embryogenesis in callus culture cultures of *Rosa hybrid* L. cv. Landora. Plant Cell Tissue Organ Culture, ۲۷. ۶۵-۶۹.

۱۲) Smaranda, V., ۲۰۱۱. In vitro multiplication of *Rosa canina* L. Biology vegetative. ۱۱: ۱۹-۲۱.

Effect different concentrations of Kinetine on callugenesis in (*Rosa canina* L.)

M. Rahimi[*۱] , V. Rouhi [۲], A. Mohammad-Khani[۲] and A. fadaei-Tehrani[۳]

۱- M. Sc Student & ۲- Assistant Professor Dept. of Horticultural Sciences, Shahrekord University, Shahrekord- Iran. ۳- Assistant Professor Dept. of Plant Protection Sciences, Shahrekord University, Shahrekord- Iran.

*Corresponding author

Abstract

Dog rose (*Rosa canina* L.) has been using as a rootstocks for ornamental roses also it is one of the medicinal plants that it is possible be used from callus culture for the mass production of plantlets and new pharmaceutical compounds such as ascorbic acid. In order to study was creating with aim of the effect kinetin on callus properties in dog rose. This experiment were conducted as a completely randomized design with employing different concentrations of kinetin (۰,۷۵, ۱,۵, ۲,۲۵ and ۳ mg/l) in combination with ۵,۰ mg/l ۲,٤-D, in ٤ replications. The segments (۱,۵ cm) from the branch a provided and were decontaminated with ۷۰٪ ethanol solution for ۱ min and ۱۰٪ sodium hypochlorite for ۱۵ min. Then the explants were given horizontally on a solid culture of ۱/٤ MS medium. After ۳ months without doing any subcultures, fresh and dry weight of callus was measured. Callus on the surface of rough, hard texture of green and white, sometimes tinged pink stain see to as it was. The results showed that with addition of kinetin concentrations, wet and dry weight of callus were decreased. Between different concentrations of kinetin were significantly difference. Over Fresh and dry weight of callus in the low concentration of kinetin (۰,۷۵ mg/l) was observed.

Keywords**:** .*Rosa canina* L, Kinetine, ۲,٤-D, Callus