بررسی اثر NAA و BAP بر القای کالوس در شقایق سیاه (*Papaver bracteatum*)

بهمن حسینی [۱]، رضا قهرمانی [۲*]، عطا سلیمی [۳]، علی شرفی [۴]
۱-استادیار گروه باغبانی، دانشگاه ارومیه، ارومیه. ۲- دانشجوی کارشناسی علوم باغبانی، دانشگاه ارومیه، ارومیه.
۳- فارغ التحصیل کارشناسی ارشد گیاهان دارویی، دانشگاه ارومیه، ارومیه. ۴- دانشجوی دکتری پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک ایران، تهران.

چکیده

گیاه شقایق سیاه (Papaverbracteatum) از گیاهان دارویی بسیار مهم خانواده Papaveraceae می‌باشد که ترکیب دارویی غالب آن آلکالوئید تبائین می‌باشد.کشت کالوس یکی از روش‌های موثر کشت بافت است. هدف از انجام این آزمایش دستیابی به تیمار مناسب هورمونی جهت تولید بالاترین میزان کالوس در گیاه فوق الذکر بود.این آزمایش در دو مرحله انجام پذیرفت. مرحله اول ریزنمونه هیپوکوتیل در محیط تکمیل شده با زغال فعال (۲ و ۴ گرم در لیتر) و غلظت‌های مختلف NAA و ۲,٤-D (صفر، ۱، ۲، ۳ و ۵ میلی گرم بر لیتر) به تنهایی و یا در ترکیب با غلظت‌های BA (صفر، ۰/۱ و ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر) استفاده گردید، در مرحله دوم از بخش اول آزمایش ریزنمونه بذری در محیط فاقد زغال فعال شامل غلظت‌های مختلف NAA (صفر، ۱، ۲، ۳ و ۵ میلی‌گرم در لیتر) و ۲,٤-D(صفر، ۰/۵، ۱ و ۲ میلی گرم بر لیتر) به تنهایی و یا در ترکیب با غلظت‌های BA (صفر، ۰/۱ و ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر) استفاده گردید. نتایج نشان داد که در محیط حاوی زغال فعال، تیمار ۲ میلی‌گرم در لیتر ۲,٤-D در حضور ۲ گرم در لیتر زغال فعال بیشترین کالوس‌زایی را دارد و در محیط فاقد زغال فعال تیمار ۱ میلی گرم در لیتر ۲,٤-D بالاترین کالوس‌زایی را داراست.

واژه‌های کلیدی: شقایق سیاه، کالوس‌زایی، ۲,٤-D، زغال فعال

مقدمه

گیاه شقایق سیاه (Papaver bracteatum lindl.) از تیره‌ی Papaveraceae بومی ایران و جنوب روسیه است(Sedigh et al.,۱۹۸۲) در ایران نواحی مختلف البرز و دامنه‌های کوه دماوند و نیز کوههای استان کردستان به عنوان زیستگاه این گیاه به شمار می‌رود(۱). غالب گیاهان این خانواده همانند جنس Papaver دارای مجاری ترشحی لاتکس، مرکب از سلول‌های منفرد یا پشت سر هم در پارانشیم ها به ویژه در بافت آبکش است،این گیاه جزوگیاهان دارویی بسیار مهم است که ترکیب عمده ی دارویی آن آلکالوئید تبائین است.(۱).گیاهان خانواده خشخاش گروهی از آلکالوئیدهای بنزوفنانتریدین را تولید می‌کنند که زیرگروه آلکالوئیدهای بنزیل ایزوکوئینولین هستند (Kaya.,۱۹۹۹). آلکالوئیدهای مرفین و نوسکاپین (با خاصیت ضد توموری) به مقدار فراوان در مجاری لاتکس این گیاهان وجود دارند و به میزان اندک به همراه آلکالوئیدهای دیگر مانند سانگوینارین در ریشه این گیاهان نیز تجمع می‌یابند (Phillipson.,۱۹۸۳)البته موادی چون کدئین،نئوپین،اوریپاوین و بنزیل ایزوکوئینولین نیز در آن کشف شده است.(Theun et al.۱۹۸٤)

تشکیل بافت کالوس تحت تأثیر عواملی همانند ژنوتیپ، سن ریزنمونه، نوع ریزنمونه، نوع و غلظت تنظیم کننده‌های رشد گیاهی، نوع محیط کشت و عوامل متعدد دیگر قرار می‌گیرد(Kumari et al., ۲۰۰٦). اکسین باعث تحریک ریزنمونه‌های زخمی و ورود آنها به فاز کالوس‌زایی می‌شود و همچنین اکسین با اثر هم‌افزایی تولید اکسین درون‌زا را افزایش می‌دهد، وجود سیتوکنین در مرحله‌ی متافاز، از به تاخیر افتادن تقسیم سلولی به طور قابل ملاحظه‌ایی جلوگیری می‌کند و احتمال می‌رود که سیتوکنین‌ها برای تنظیم سنتز پروتئین‌های مؤثر در تشکیل و عملکرد دستگاه دوک میتوتیک مورد نیاز باشد (Jouanneau., ۱۹۷۵).تحقیقات نشان داده است که در شقایق سیاه تیمارهای ترکیبی نسبت به تیمارهایی که اکسین به تنهایی استفاده شده است میزان کالوس‌زایی را بهبود می‌بخشید مطالعات اولیه نشان داده است که تیمار (۱mg.l-۱) ۲,٤-D در ترکیب با (۰.۵mg.l-۱) BA بیشترین میزان کالوس‌زایی (۸۰ درصد) را نشان

داد(Rostampour et al.,۲۰۱۰). در بررسی بر روی گیاه Papaver orientale تیمار (۱mg.l-۱) NAA و (۰.۵mg.l-) BA بالاترین میزان کالوس را نشان داد.(Zakaria et al.,۲۰۱۱). در گیاه Papaver somniferum تیمار ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر ۲,٤-D و ۰/۱میلی گرم در لیتر کاینتین حداکثر درصد تشکیل کالوس را نشان داد (Kaya., ۱۹۹۹).مطالعات بر روی انواع رقم‌های کتان (Linus) مناسب‌ترین تیمار کالوس‌زایی را (mg.l-۱۰.۲۵) NAA و (mg.l-۱۰.۵) BA معرفی نمود (Reddy,.۲۰۰۲). در یک بررسی بر روی سیر (Garlic) تیمار (mg.l-۱۱) ۲,٤-D و (mg.l-۱۰.۵)BA حداکثر تولید کالوس را نشان داد(Khan et al.,۲۰۰٤). در آزمایش کالوس‌زایی گیاه Gemnema silvestris تیمار (mg.l-۱۵) ۲,٤-D و (mg.l-۱۱) BA حداکثر کالوس‌زایی (۸۰ درصد) را نشان داد(Roy et al., ۲۰۰۸). در کالوس‌زایی گیاه رازیانه(Foeniculum vulgare) افزایش غلظت BA کاهش کالوس‌زایی را در پی داردو غلظت ۲ و ۴ میلی‌گرم در لیترD-۲,٤ و ۰/۲۵ و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BA بهره برده شده است حداکثر درصد کالوس‌زایی را در پی داشته است.(سرخیل و همکاران.۱۳۸۸). این مطالعه به منظور بررسی اثر غلظتهای مختلف هورمونهای اکسینی و سیتوکینینی به همراه ترکیب با زغال فعال بر القای کالوس شقایق سیاه مطالعه گردید.

مواد و روش ها

این تحقیق در سال ۱۳۹۰ به صورت فاکتوریل بر پایه طرح کاملا تصادفی در آزمایشگاه کشت بافت گروه باغبانی دانشکده کشاورزی دانشگاه ارومیه انجام گرفت.

مواد گیاهی و کشت بذر: بذرهای گیاه بعد از رسیدن کپسول‌هایشان از عرصه طبیعی در استان آذربایجان غربی (منطقه مرگور) جمع-آوری و بعد از رفع نیاز سرمایی و ضد عفونی سطحی توسط اتانول ۷۰ درصد، هیپوکلریت سدیم ۲/۵ درصد و آب استریل به مدت ۲ روز در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد در محیط کشت پایه MS یشه در شرایط تاریکی کشت کرده و بعد از سبز شدن بمدت دو هفته آنها را در شرایط نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی قرار داده سپس از دانهال رشد کرده از بذر ریزنمونه‌های هیپوکوتیل، کوتیلدون، ریشه و ریزنمونه‌های بذری خراش داده شده جهت القای کالوس قرار داده شد.

تیمار های بکار برده شده عبارتند از:

تیمارهای هورمونی در غلظت‌های (صفر، ۰/۵، ۱ و ۲ میلی‌گرم در لیتر)NAAبه تنهایی و در ترکیب با غلظت‌های (صفر، ۰/۵، ۱ و ۲ میلی‌گرم در لیتر)BAو همچنین تیمارهای هورمونی در غلظت‌های (صفر، ۰/۵، ۱ و ۲ میلی‌گرم در لیتر)۲,٤-Dبه تنهایی و در ترکیب با غلظت‌های (صفر، ۰/۵، ۱ و ۲ میلی‌گرم در لیتر) BA می باشد. واکشت‌ها به فاصله هر چهار هفته یکبار و در سه تکرار انجام شد تعداد ریزنمونه‌های ریزنمونه ۱۰ عدد در هر پتری‌دیش بود و یادداشت‌برداری از وزن تر کالوس بعد از سومین واکشت انجام شد. غلظت‌های صفر، ۰/۵، ۱ و ۲ میلی‌گرم در لیترD-۲,٤وNAAدر ترکیب با ۰/۵ میلی‌گرم بر لیترBAجهت بررسی القای جنین سوماتیکی در ریزنمونه بذری در شرایط نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی در محیط کشت با پنج بار واکشت انجام پذیرفت. واکشت‌ها به فاصله هر چهار هفته یکبار و در سه تکرار انجام شد تعداد ریزنمونه‌ها ۱۰ عدد در هر پتری‌دیش بود. یادداشت برداری از تعداد ریزنمونه‌های با جنین سوماتیکی بعد از پنجمین واکشت انجام شد.

نتایج و بحث

مطالعات آنالیز تجزیه واریانس نشان داد که اثرات ساده غلظت‌های NAAو BAدر سطح احتمال ۱ درصد دارای اختلاف معنی‌دار می-باشد. همچنین نتایج آزمایش نشان داد که غلظت ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر BA دارای اثرات بیشتری جهت کالوس‌زایی در مقایسه با صفر و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BA می‌باشد اگرچه تفاوت معنی‌داری با غلظت بدون حضور BA ندارد. همچنین نتایج نشان داد که حداکثر القای

کالوس درتیمار ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر NAAدر ریزنمونه بذری به میزان ۷۴ درصد مشاهده گردید. غلظت ۲ گرم بر لیتر زغال فعال تاثیر بیشتری را نسبت به غلظت ۴ گرم بر لیتر زغال فعال بر درصد کالوس‌زایی نشان داد. مطالعات آنالیز تجزیه واریانس نشان داد که غلظت های ۲,٤-D در سطح احتمال ۱ درصد دارای اختلاف معنی‌داری در جنین زایی سوماتیکی می‌باشد. نتایج مقایسه میانگین داده‌ها نشان داد که بالاترین درصد القای جنین سوماتیکی درتیمار ۱ میلی‌گرم در لیتر ۲,٤-Dدر ترکیب ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BA به میزان ۷۷ درصد از ریزنمونه‌های بذری و کمترین درصد القای کالوس جنین‌زا در تیمار ۰/۵میلی‌گرم در لیتر BA بدست آمد و حضورNAAدر ترکیب باBAکالوس جنین‌زا را تولید نکرد.

جدول ۱- نتایج تجزیه واریانس بررسی اثرات ترکیب‌های مختلف زغال فعال، BA و NAA در کالوس‌زایی شقایق سیاه

منابع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات درصد کالوس‌زایی
زغال فعال (A)	۱	۱۰۰/۷**
(C) BA	۲	۱۵/۹۷**
(T) NAA	۴	۴/۵۳*
اثر متقابل (A×C)	۲	۰/۱۲ns
اثر متقابل (A×T)	۴	۵/۶۷**
اثر متقابل (C×T)	۸	۴/۳۶**
اثر متقابل (A×C×T)	۸	۲/۰۸ns
اشتباه آزمایشی	۶۰	۱/۲
ضریب تغییرات(٪)		۱۹/۷۳

ns،** و *نشاندهنده عدم وجود اختلاف معنی‌دار، معنی‌دار در سطح ۱ درصد و ۵ درصد می‌باشد.

منابع

زرگری، علی.(۱۳۶۸). گیاهان داروئی. انتشارات و چاپ دانشگاه تهران، ۹۴۷ ص

سرخیل، پ.، امیدی، م.، سید علی، پ و دوازده امامی. (۱۳۸۸). تأثیر هورمونی و ریزنمونه بر کالزایی، باززایی و کشت سوسپانسیون سلولی در (Foeniculum vulgare Mill.) رازیانه. فصلنامه علمی- پژوهشی تحقیقات گیاهان دارویی و معطر ایران، ۲۵(۳): ۳۶۴- ۳۷۵.

۳-Kaya, N. (۱۹۹۹). Study of the Alkaloids in callusing plant tissues from a range of Turkish cultivars of Papaversomniferum.Triditional Journal of Agriculture and Forestry, ۲۳: ۳۷۷-۳۸۱.

٤-Phillipson, J. D. ۱۹۸۳. Intraspecific variation and alkaloids of Papaver species.Plant Medicinal. ٤٨: ۱۸۷-۱۹۲.

٥-Jouanneau, J. P. (۱۹۷٥). Protein synthesis requirement for thrcytokinin effect upon tobacco cell division.Plant Cell Reports, ۹۱: ۱۸٤-۱۹۰.

٦-Rostampour, S., Hashemi, S and Dehestani, A. (۲۰۱۰). In vitro regeneration of Persian poppy (Papaver bracteatum). Section Cellular and Molecular Biology, ٦٥(٤): ٦٤٧- ٦٥٢.

۷-Zakaria, R. A., Hour, M. H and Zare, N.(۲۰۱۱).Callus production and regeneration of the medicinal plant Papaverorientale. African Journal of Biotechnology, ۱۰(٥٤): ۱۱۱٥۲-۱۱۱٥٦.

۸-Tripathy, S and Reddy, G. M. (۲۰۰۲). In vitro callus induction and plantlet regeneration from Indian cotton cultivars. Plant Cell Biotechnology and Molecular Biology, ۳ (۳&٤): ۱۳۷-۱٤۲

۹-Khan, N., Alam, M. S and Nath, U.K.(۲۰۰٤). In vitro regeneration of Garlic through callus culture. Journal of Biological Sciences, ٤(۲): ۱۸۹-۱۹۱.

۱۰-Roy, A., Ghosh, S., Chaudhuri, M and Saha, P. K. (۲۰۰۸).Effect of different plant hormones on callus induction in Gymnemasylvestris R.Br. (Asclepiadaceae).African Journal of Biotechnology, ۷(۱۳): ۲۲۰۹-۲۲۱۱.

A study on effects of NAA & BAP on callus induction in (Papaver bracteatum)

Bahman Hosseini,Reza Ghahremani,Ata salami,Ali Ashrafi

Abstract

Plant Persian poppy (Papaver bracteatum), one of the very important medicinal plant, belongs to Papaveraceae containing more medicinal components especially thebaine alkaloid. Callus culture is known as one of culture methods used in regeneration and suspension culture. On this basis,the current study was conducted to determine some of effective factors at callusing Persian poppy. This experiment was carried out to find out the most suitable hormone treatment for callus induction. experiment included two steps: in the first step, a medium including activity charcoal (۲ and ٤ g.l-۱) was employed for hypocotyle explants and seed explants, in the second step,were cultured in a medium without activity charcoal. In the first experiment, hormone treatments with different concentrations of NAA and ۲,٤-D (۰, ۱, ۲, ۳ and ٥ mg.l-۱) and also their composition with BA (۰, ۰/۱ and ۰/٥ mg.l-۱)were utilized in ۱/۲ MS media culture. Results this study showed in the medium with ۲ g.l-۱ activity charcoal by ۲mg.l-۱ ۲,٤-D and medium without activity charcoal, ۱mg.l-۱ ۲,٤-D treatment could produce the most callusing.