باززایی درون شیشه‌ای گیاه دارویی کتان سفید (*Linum album Kotschy ex Boiss*)

ندا جوادیان[۱]، قاسم کریم‌زاده[۱*]، محسن شریفی[۲] و احمد معینی[۱]

[۱] **تهران، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده کشاورزی، گروه اصلاح‌نباتات و بیوتکنولوژی**

[۲] **تهران، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم زیستی، گروه زیست‌شناسی گیاهی**

تاریخ دریافت: ۹۲/۹/۱۵ تاریخ پذیرش: ۹۲/۱۲/۲۵

چکیده

کتان سفید (*Linum album*)یکی از گیاهان دارویی بومی ایران است که حاوی ماده موثرۀ پودوفیلوتوکسین (PTOX) می‌باشد. این ماده ارزشمند دارویی به‌عنوان پیش‌ماده، برای سنتز داروهای ضدتوموری مهم مانند Etoposide، Teniposide و Etopophos استفاده می‌شود. کشت بافت گیاهی روشی مناسب برای افزایش تولید متابولیت‌های ثانویه در گیاهان دارویی می باشد. در این تحقیق، القا کالوس بمنظور باززایی در شرایط آزمایشگاه مورد بررسی قرار گرفته است. جداکشت نوساقه در محیط کشت MS حاوی ترکیب هورمون‌های KIN با غلظت‌های (۰/۴– ۰/۲– ۰) میلی‌گرم در لیتر و NAA با غلظت‌های (۲/۵– ۲– ۱/۵– ۱– ۰/۸– ۰/۴– ۰) میلی‌گرم در لیتر در تاریکی قرار گرفت. بیشترین وزن کالوس در محیط کشت MS حاوی ترکیب هورمونی ۲ میلی‌گرم در لیتر NAA و ۰/۴ میلی‌گرم در لیتر KIN به‌دست آمد. کالوس‌ها به محیط کشت MS حاوی غلظت‌های ۱ تا ۲/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP تنها یا در ترکیب با ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر NAA برای باززایی نوساقه انتقال یافتند که بهترین تیمار برای باززایی نوساقه، تیمار هورمونی ۲ میلی‌گرم در لیتر BAP بود. بیشترین درصد ریشه‌زایی نوساقه در محیط کشت ۱/۲MS حاوی ۱ میلی‌گرم در لیتر NAA مشاهده شد.

واژه‌های کلیدی: کتان سفید، *Linum album*، گیاه دارویی، کشت درون شیشه‌ای، القا کالوس، باززایی

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۲۱۸۲۸۸۴۴۷۹ پست الکترونیکی:karimzadeh_g@modares.ac.ir

مقدمه

کتان سفید (*Linum album*) گیاهی علفی چند ساله با خاصیت دارویی از خانواده کتان (Linaceace) و گونه بومی و انحصاری ایران است که دارای مقادیر قابل‌توجهی پودوفیلوتوکسین (Podophyllotoxin; PTOX) می‌باشد (۱۷ ، ۲۵). این ماده محصول طبیعی مهم دارویی است که به گروه شیمیایی لیگنان‌ها تعلق دارد که گروه بزرگی از متابولیت‌های ثانویه گیاهان را تشکیل می‌دهند. مسیر بیوسنتزی PTOX و لیگنان‌های مشابه هنوز به‌طورکامل مشخص نشده است اما مطالعات دقیقی به‌علت اهمیت بالینی آنها انجام شده است که نشان می‌دهد این ماده دارای خاصیت ضدتومور سرطانی و ضدباکتریایی می‌باشد. به دلیل اثرات جانبی مضر برای انسان، استفاده پزشکی آن محدود است ولی مشتقات نیمه‌سنتزی آن مانند Etoposide، Teniposide و Etopophos در درمان سرطان کاربرد فراوان دارد (۲۰). تولید صنعتی این ترکیب به‌دلیل ساختار شیمیایی پیچیده، از لحاظ اقتصادی امکان‌پذیر نیست (۲۵). بنابراین، فناوری کشت بافت و سلول به‌دلیل امکان استفاده از عوامل مختلف در محیط کشت (منبع کربن، تنظیم‌کننده رشد گیاهی و ...) روشی موثر در افزایش این ترکیب باارزش در گیاه در نظر گرفته می‌شود (۱۰). به‌علاوه، روش‌های تکثیر درون شیشه ابزار قدرتمندی برای حفظ ژرم‌پلاسم و تکثیر انبوه به‌شمار می‌رود (۱۹). در کشت بافت *L. album* تولید کالوس بمنظور ایجاد سوسپانسیون سلولی از جداکشت نوساقه در محیط کشت

MS حاوی ترکیب هورمونی ۲ میلی‌گرم در لیتر NAA و ۰/۴ میلی‌گرم در لیتر KIN گزارش شده است (۲۵). همچنین Smollny و همکارانش (۱۹۹۸) محیط کشت MS حاوی هورمون ۰/۴ میلی‌گرم در لیتر NAA را بهترین غلظت برای تولید ماده PTOX در سوسپانسیون سلولی در گیاه *L. album* معرفی کردند (۲۱). تاکنون باززایی در این گیاه گزارش نشده است اما باززایی تحت تیمارهای هورمونی از جداکشت‌های مختلف در دیگر ژنوتیپ‌های کتان زراعی (*Linum usitatissimum*) بررسی شده است. در تحقیقی، Chen و Dribnenki (۲۰۰۲) اثر ژنوتیپ و ترکیبات محیط کشت روی باززایی نوساقه از کشت بساک را بررسی کردند. نتایج حاصل نشان داد که ژنوتیپ و نوع محیط کشت بر باززایی نوساقه تأثیر معنی‌داری داشت (۷). تحقیقاتی را Burbulis و همکارانش (۲۰۰۹) بر روی ژنوتیپ‌های مختلف کتان زراعی انجام دادند که بیشترین (۹۴ درصد) پتانسیل باززایی نوساقه از هیپوکوتیل در ژنوتیپ Barabara و Mikael در محیط کشت MS حاوی ۲ میلی‌گرم در لیتر TDZ و ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر NAA به‌دست آمد، درحالی‌که برای واریته Szaphir در محیط کشت MS حاوی ۲ میلی‌گرم در لیتر BAP و ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر NAA مقدار باززایی نوساقه ۱۰۰ درصد بود (۶). در مطالعه دیگری روی برخی از ژنوتیپ‌های این گونه بالاترین باززایی نوساقه از لپه‌ها در محیط کشت MS حاوی هومورن ۱ میلی‌گرم در لیتر BAP گزارش کردند (۵). همچنین Jain و Rashid (۲۰۰۱) محیط کشت MS حاوی هورمون ۰/۱ میکرومولار TDZ را بهترین محیط برای تولید نوساقه از هیپوکوتیل در ژنوتیپ Neelam کتان زراعی معرفی کردند (۱۲). برای تحقیق بیشتر روی ترکیبات بیوشیمیایی و دارویی در *L. album*، سیستم باززایی درون شیشه‌ای مؤثری مورد نیاز است، زیرا گیاهان رشدیافته در شرایط درون شیشه‌ای ممکن است در معرض تغییرات فصلی و سوماتیکی، هجوم باکتری‌ها، قارچ‌ها و حشرات، همچنین آلودگی‌های محیطی قرار بگیرند که می تواند مقدار ماده باارزش دارویی گیاه را تحت تأثیر قرار دهد (۱۱). علاوه بر این، مهندسی مسیرهای متابولیسمی می‌تواند باعث افزایش تولید متابولیت‌های مهم گیاهی شود (۲۵). پیش‌نیاز اصلی و مهم در این موارد، وجود یک سیستم بهینه کالوس‌زایی و باززایی در گیاه مورد نظر است. بنابراین، تحقیق حاضر با هدف باززایی گیاه کتان سفید از کالوس انجام شد.

مواد و روشها

بذرهای گیاه دارویی کتان سفید (*L. album*) از منطقه طالقان با عرض جغرافیایی ۳۶ درجه و ۷ دقیقه شمالی و طول جغرافیایی ۵۰ درجه و ۳۵ دقیقه شرقی و ارتفاع ۱۸۷۰ متری از سطح دریا در مردادماه سال ۱۳۹۰ جمع‌آوری شدند. بذرها به‌مدت ۲۰ دقیقه در هیپوکلریت‌سدیم ۲٪ (w/v)، ۱۰ دقیقه در محلول آب‌اکسیژنه ۱۱٪ (v/v)، سپس به‌مدت ۱ دقیقه در اتانول ۷۰٪ (v/v) ضدعفونی شدند. بذرها بعد از هر مرحله ۳ بار (هر بار ۵ دقیقه) با آب‌مقطر استریل شستشو داده شدند. بمنظور شکستن خواب بذرها از اسیدجیبرلیک (۵۰۰ ppm) و سرما (۴ °C به‌مدت ۱۲ ساعت) استفاده شد و روی محیط کشت MS (۱۶) حاوی ۳٪ ساکارز و ۰/۸٪ آگار- آگار کشت گردید و در دمای °C ۲± ۲۵ و دوره نوری ۱۶/۸ ساعت تاریکی/ روشنایی قرار گرفتند. ۸ هفته بعد از کشت بذرها، نوساقه‌ها به قطعات ۵ میلی‌متری جدا و به‌عنوان جداکشت استفاده شدند. جداکشت‌ها بمنظور تولید کالوس در محیط کشت MS حاوی هورمون‌های KIN با ۳ غلظت (۰/۴- ۰/۲- ۰) میلی‌گرم در لیتر و NAA با غلظت‌های (۲/۵- ۲- ۱/۵- ۱- ۰/۸- ۰/۴-۰) میلی‌گرم در لیتر در تاریکی قرار گرفتند. جداکشت‌ها بعد از ۱ ماه در محیط‌های با همان ترکیب هورمونی واکشت شدند. سپس کالوس‌های حاصل برای باززایی نوساقه در محیط کشت MS حاوی ۴ غلظت مختلف (۲/۵ - ۲- ۱/۵- ۱) میلی‌گرم در لیتر BAP یا در ترکیب با ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر NAA قرار گرفتند. بمنظور

ریشه‌دار کردن، نوساقه‌ها در محیط کشت ۱/۲MS حاوی هورمون‌های IAA، IBA یا NAA با ۴ غلظت (۲ – ۱/۵– ۱– ۰/۵) میلی‌گرم در لیتر قرار گرفتند. در هر مرحله محیط کشت MS بدون‌هورمون به‌عنوان شاهد در نظر گرفته شد.

طرح آزمایشی برای تعیین غلظت‌های مناسب هورمون برای القای کالوس به‌صورت آزمایش فاکتوریل در قالب طرح پایه کاملاً تصادفی و در مرحله باززایی نوساقه و ریشه‌زایی آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی و کلیه تیمارهای هورمونی در ۳ تکرار انجام شدند. برای انجام تجزیه واریانس القای کالوس و صفات مختلف ریشه به تمام داده‌ها به‌دلیل داشتن داده صفر، ۰/۵ اضافه شده و نرمال کردن دادها بترتیب با استفاده از روش NSCOR و square root انجام شد. اما داده‌های حاصل از باززایی نوساقه نرمال بودند. مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون چنددامنه‌ای دانکن محاسبه گردید و برای تجزیه و تحلیل داده‌های آزمایش از نرم‌افزارهای SPSS19 و Minitab 16 استفاده شد.

نتایج

کالوس‌ها بعد از ۱ ماه در اطراف جداکشت‌ها مشاهده شدند (که نرم، ترد و سفید بودند). جداکشت‌ها در محیطهای با همان ترکیب هومورمونی واکشت[1] شدند. پس از ۲ ماه درصد کالوس‌زایی و وزن‌تر کالوس اندازه‌گیری گردید. در تمام محیط‌های کشت MS با غلظت‌های مختلف NAA و KIN بجز محیط کشت حاوی تنها KIN و بدون‌هورمون، ۱۰۰ درصد کالوس‌زایی مشاهده شد اما بین این تیمارها از نظر مقدار تولید کالوس تفاوت وجود داشت. تجزیه واریانس داده‌ها برای وزن‌تر کالوس (جدول ۱) نشان داد که اثرات ساده هورمون‌های NAA و KIN و همچنین اثر متقابل آنها بترتیب در سطوح احتمال ۱ و ۰/۱ درصد تفاوت معنی‌داری نشان دادند.

جدول ۱– تجزیه واریانس برای صفت وزن کالوس حاصل از نوساقه در غلظت‌های مختلف KIN و NAA در محیط کشت MS در کتان سفید (*L. album*)

منابع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات
		وزن تر کالوس (گرم)
غلظت KIN	۲	۱/۷۵۸***
غلظت NAA	۶	۷/۵۳۸***
KIN × NAA	۱۲	۰/۲۹۴**
خطا	۴۲	۰/۰۹۵
ضریب تغییرات (٪)		۱۵/۳

، * وجود اختلاف معنی‌دار بترتیب در سطوح احتمال ۱ و ۰/۱ درصد

مقایسه میانگین‌های اثر متقابل نشان داد که بیشترین مقدار وزن کالوس در محیط کشت حاوی ۲ میلی‌گرم در لیتر NAA و ۰/۴ میلی‌گرم در لیتر KIN به‌دست آمد (جدول ۲) که در مقایسه با شاهدها تفاوت قابل ملاحظه‌ای نشان دادند.

میانگین وزن کالوس در محیط کشت NAA بدون KIN کمترین مقدار را دارد و با افزایش مقدار هورمون KIN در ترکیب با غلظت‌های مختلف NAA میانگین وزن‌تر کالوس به‌طور معنی‌داری افزایش یافت (نتایج ارائه نشده).

جدول ۲- مقایسه میانگین محیط کشت MS حاوی غلظت‌های مختلف KIN و NAA برای صفت وزن کالوس حاصل از نوساقه در کتان سفید (*L. album*)

غلظت تیمارهای هورمونی (میلی‌گرم در لیتر)		وزن کالوس (گرم)
KIN	**NAA**	
۰/۰	۰/۰	۰/۰۰ ± ۰/۰۰۰ ^{k}
۰/۰	۰/۴	۰/۷۵ ± ۰/۰۳۴ ^{jk}
۰/۰	۰/۸	۱/۱۹ ± ۰/۰۸۹ ^{ghi}
۰/۰	۱/۰	۱/۲۲ ± ۰/۰۴۶ ^{fghi}
۰/۰	۱/۵	۱/۷۱ ± ۰/۰۸۰ ^{bc}
۰/۰	۲/۰	۱/۴۲ ± ۰/۰۹۳ ^{def}
۰/۰	۲/۵	۱/۳۷ ± ۰/۱۲۳ ^{defg}
۰/۲	۰/۰	۰/۰۰ ± ۰/۰۰۰ ^{k}
۰/۲	۰/۴	۱/۱۱ ± ۰/۰۹۳ ^{ij}
۰/۲	۰/۸	۱/۲۸ ± ۰/۰۷۷ ^{efghi}
۰/۲	۱/۰	۱/۳۰ ± ۰/۰۲۶ ^{efghi}
۰/۲	۱/۵	۱/۷۳ ± ۰/۱۱۳ ^{bc}
۰/۲	۲/۰	۱/۹۶ ± ۰/۰۷۵ ^{b}
۰/۲	۲/۵	۱/۳۱ ± ۰/۰۱۱ ^{efghi}
۰/۴	۰/۰	۰/۰۰ ± ۰/۰۰۰ ^{k}
۰/۴	۰/۴	۱/۱۷ ± ۰/۰۶۷ ^{hij}
۰/۴	۰/۸	۱/۳۵ ± ۰/۰۷۷ ^{defgh}
۰/۴	۱/۰	۱/۳۹ ± ۰/۰۱۷ ^{de}
۰/۴	۱/۵	۱/۸۲ ± ۰/۰۸۴ ^{bc}
۰/۴	۲/۰	۲/۳۸ ± ۰/۰۷۵ ^{a}
۰/۴	۲/۵	۱/۵۷ ± ۰/۰۵۸ ^{cd}

میانگین‌های با حروف لاتین مشابه تفاوت معنی‌داری در سطح احتمال ۱ درصد با یکدیگر ندارند.

کالوس‌ها برای باززایی نوساقه به محیط کشت MS حاوی غلظت‌های مختلف ترکیب هورمونی BAP+NAA و BAP قرار گرفتند. باززایی نوساقه از کالوس‌ها در محیط کشت حاوی ترکیب هورمون‌های BAP با NAA مشاهده نشد. جدول تجزیه واریانس برای ۲ صفت تعداد نوساقه و طول نوساقه (جدول ۳) نشان می‌دهد از نظر این ۲ صفت اختلاف معنی‌داری بین محیط‌های حاوی غلظت‌های مختلف BAP بترتیب در سطح احتمال ۱ و ۰/۱ درصد وجود داشت.

نتایج مقایسه میانگین‌ها برای غلظت‌های مختلف BAP نشان داد که با افزایش مقدار هورمون تا مقدار ۲ میلی‌گرم در لیتر تعداد نوساقه افزایش می‌یابد و بیشترین تعداد نوساقه از کالوس در محیط کشت حاوی ۲ میلی‌گرم در لیتر BAP به‌دست آمد. همچنین بلندترین نوساقه‌ها در ۲ و ۲/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP رشد کردند (جدول ۴).

نوساقه‌های باززایی شده بمنظور طویل شدن، در محیط کشت MS حاوی ۰/۴ میلی‌گرم در لیتر KIN به مدت ۱ ماه قرار داده شدند. نوساقه‌ها در اندازه ۴-۳ سانتی‌متر به محیط کشت ۱/۲MS حاوی غلظت‌های مختلف IAA ، IBA یا NAA برای ریشه‌دار کردن منتقل شدند. در محیط‌های کشت حاوی IAA، IBA القای ریشه مشاهده نشد. نتایج تجریه واریانس نشان داد (جدول ۵) که بین غلظت‌های مختلف NAA بر درصد القا، تعداد و طول ریشه در سطح احتمال ۵ درصد اختلاف معنی‌داری وجود دارد.

جدول ۳- تجزیه واریانس برای صفات مورد مطالعه در باززایی نوساقه بر کالوس در غلظت‌های مختلف BAP در محیط کشت MS در کتان سفید (*L. album*)

منابع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات	
		تعداد نوساقه	طول نوساقه (سانتی‌متر)
BAP	۳	۱۲/۵۵۶**	۱/۲۳۹***
خطا	۸	۱/۰۰۰	۰/۰۶۴
ضریب تغییرات (٪)		۲۶/۱	۱۵/۵

، *: وجود اختلاف معنی‌دار به‌ترتیب در سطوح احتمال ۱ و ۰/۱ درصد

جدول ۴- مقایسه میانگین‌های دو صفت تعداد و طول نوساقه باززایی شده از کالوس در محیط کشت MS حاوی غلظت‌های مختلف BAP در کتان سفید (*L. album*)

غلظت BAP (میلی‌گرم در لیتر)	تعداد نوساقه	طول نوساقه (سانتی‌متر)
۱/۰	۱/۳۳ ± ۰/۳۳ c	۰/۸۷ ± ۰/۱۶ c
۱/۵	۳/۶۷ ± ۰/۳۳ b	۱/۳۶ ± ۰/۱۶ b
۲/۰	۶/۳۳ ± ۰/۸۸ a	۲/۰۳ ± ۰/۱۵ a
۲/۵	۴/۰۰ ± ۰/۵۷ b	۲/۲۸ ± ۰/۱۰ a

در هر ستون، میانگین‌های با حروف لاتین مشابه تفاوت معنی‌داری در سطح احتمال ۵ درصد با یکدیگر ندارند.

جدول ۵- تجزیه واریانس برای صفات مورد مطالعه در باززایی ریشه بر نوساقه در غلظت‌های مختلف NAA در محیط کشت ۱/۲MS در کتان سفید (*L. album*)

منابع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات		
		درصد القا ریشه	تعداد ریشه	طول ریشه (میلی‌متر)
NAA	۳	۱۵/۲۵۸*	۰/۵۵۰*	۰/۳۸۱ns
خطا	۸	۲/۵۵۶	۰/۰۷۴	۰/۰۹۳
ضریب تغییرات (٪)		۳۸/۵	۲۱/۱	۲۲/۴

ns، *: به‌ترتیب وجود اختلاف غیر معنی‌دار و معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد

بر اساس نتایج مقایسه میانگین‌های صفات مختلف تولید ریشه، بیشترین درصد القا و تعداد ریشه در تیمار ۱ میلی‌گرم در لیتر NAA به‌دست آمد و بین سایر غلظت‌های مختلف NAA از نظر این ۲ صفت اختلاف معنی‌داری وجود نداشت. طول ریشه در غلظت‌های مختلف NAA اختلاف معنی‌داری با یکدیگر نداشتند و ریشه طویل‌تر در محیط حاوی ۱ میلی‌گرم در لیتر هورمون NAA تولید شد. همچنین غلظت‌های بیشتر اکسین موجب القای کالوس ناخواسته در ساقه گردید (جدول ۶، شکل ۱).

جدول ۶- مقایسه میانگین‌های دو صفت درصد القا ریشه و تعداد ریشه باززایی شده بر نوساقه در محیط کشت MS ۱/۲ حاوی غلظت‌های مختلف NAA در کتان سفید (*L. album*)

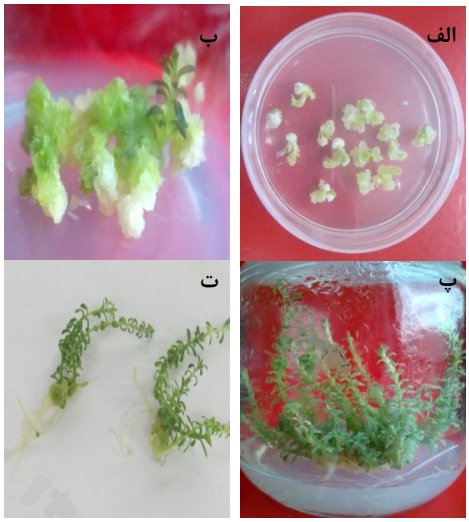
غلظت NAA (میلی‌گرم در لیتر)	درصد القا ریشه	تعداد ریشه
۰/۵	۱۱/۱۱ ± ۰/۶۸ b	۰/۶۷ ± ۰/۱۵ b
۱/۰	۵۰/۰۰ ± ۱/۱۵ a	۳/۰۰ ± ۰/۱۷ a
۱/۵	۲۲/۲۲ ± ۰/۵۵ b	۱/۳۳ ± ۰/۱۲ b
۲/۰	۵/۵۵ ± ۱/۱۳ b	۰/۳۳ ± ۰/۱۷ b

در هر ستون، میانگین‌های با حروف لاتین مشابه تفاوت معنی‌داری در سطح احتمال ۵ درصد با یکدیگر ندارند.

بحث

در این تحقیق برای تولید کالوس در گیاه دارویی کتان سفید از ترکیب ۲ هورمون NAA و KIN استفاده شد. همان‌طور که مشخص گردید بیشترین وزن کالوس در محیط کشت MS حاوی ۲ میلی‌گرم در لیتر NAA و ۰/۴ میلی‌گرم در لیتر KIN در تاریکی انجام شد که با مقدار ترکیب هورمون‌های استفاده شده توسط Yousefzadi و همکاران

(۲۰۱۰) در محیط کشت MS برای القای کالوس از نوساقه در این گیاه مطابقت دارد (۲۵).



شکل ۱- کالوس‌زایی و باززایی درون شیشه‌ای در *L. album* الف) کالوس‌های حاصل از ریزنمونه قطعات نوساقه در محیط کشت MS حاوی ۲ میلی‌گرم در لیتر NAA و ۰/۴ میلی‌گرم در لیتر KIN در تاریکی، ب) باززایی نوساقه از کالوس در محیط کشت حاوی ۲ میلی گرم در لیتر BAP، پ و ت) باززایی ریشه بر نوساقه‌ها در محیط کشت ۱/۲MS حاوی ۱ میلی‌گرم در لیتر NAA.

نتایج تحقیقات Fakhari و همکاران (۲۰۱۳) نشان داد که وزن کالوس کتان سفید در محیط کشت MS حاوی ترکیب مختلف KIN با ۳ غلظت (۰/۴- ۰/۲-۰ میلی‌گرم در لیتر) و NAA با ۲ غلظت (۱- ۰/۴ میلی‌گرم در لیتر) اختلاف معنی‌داری نداشتند (۹)، درحالی‌که نتایج مطالعه حاضر نشان داد که ترکیب هورمونی NAA بدون KIN کمترین مقدار وزن کالوس را تولید کرد. در مطالعه‌ای دیگر، Behar و همکاران (۲۰۱۱) تنها KIN در غلظت‌های ۱، ۰/۷۵، ۰/۵، ۰/۲۵، ۰ میلی‌گرم در لیتر برای تولید کالوس و باززایی نوساقه از جداکشت نوساقه کتان زراعی استفاده کردند که در تمام محیط‌ها کالوس و نوساقه مشاهده شد (۴) که با نتایج تحقیق حاضر مطابقت ندارد. زیرا وجود اکسین (NAA) در محیط کشت برای القای کالوس در تحقیق حاضر ضروریست؛ به‌طوری‌که در محیط‌های فاقد هورمون یا KIN تنها کالوس مشاهده نشد. اکسین همراه با سیتوکینین در محیط کشت برای القای کالوس در برخی گیاهان مانند *Phyllanthus Acidus* (۸)، *Brassica napus* (۲۲) و *Gossypium hirsutum* (۱۶) ضروری می‌باشد. این تحقیق، نخستین گزارش از باززایی کتان سفید (*L. album*) در شرایط درون شیشه می‌باشد اما باززایی در گونه‌های دیگر این جنس مانند گونه کتان زراعی بررسی شده است. برای باززایی نوساقه در این گیاه از هورمون BAP استفاده شد. گزارش‌های متعددی وجود دارد که نشان می‌دهد BAP یکی از هورمون‌های مؤثر در باززایی درون شیشه‌ای کتان زراعی می‌باشد (۱۴ ، ۲۶). براساس نتایج به‌دست آمده، بالاترین میزان باززایی نوساقه در محیط کشت MS حاوی ۲ میلی‌گرم در لیتر BAP می‌باشد و در محیط کشت حاوی BAP در ترکیب ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر NAA باززایی نوساقه مشاهده نشد. این نتایج با برخی از مطالعات در مورد مقدار کم ۰/۰۲ میلی‌گرم در لیتر یا نبود NAA همراه با BAP در محیط کشت MS باززایی ساقه از لپه و هیپوکوتیل ارقام مختلف کتان زراعی مطابقت دارد (۵، ۲۴). از طرفی Kalyaeva و همکاران (۱۵) نشان دادند که کاهش مقدار اکسین و نبود آن در محیط کشت باعث کاهش معنی‌داری در باززایی ساقه از جداکشت هیپوکوتیل برخی از ژنوتیپ‌های کتان زراعی می‌شود. همچنین استفاده از هورمون‌های سیتوکینین متفاوت (TDZ و 2iP) در محیط کشت برای دستیابی به بیشترین تعداد تولید ساقه در ژنوتیپ‌های کتان زراعی در سایر تحقیقات گزارش شده است (۶ ، ۲۴). احتمالا این نتایج متفاوت در القا کالوس و باززایی نوساقه می‌تواند به‌دلیل تغییر در تعادل تنظیم-کننده‌های رشدی درونی در اندام‌های مختلف گیاه باشد که نشان می‌دهد کالوس‌زایی و باززایی نوساقه این گیاه به عواملی مانند ژنوتیپ منبع گیاهی مورد استفاده و نوع جداکشت آن وابسته است (۱، ۲، ۱۳). در مطالعه حاضر، همچنین بیشترین درصد (۵۰ درصد) ریشه‌زایی در محیط کشت MS ۱/۲ حاوی ۱ میلی‌گرم در لیتر NAA مشاهده شد. در مطالعه‌ای دیگر Vrbova و همکاران (۲۰۱۳) محیط

کشت MS حاوی ۰/۰۰۵ میلی‌گرم در لیتر NAA را برای ریشه‌دار کردن نوساقه حاصل از هیپوکوتیل برخی ارقام کتان زراعی استفاده کردند (۲۳). در گزارش دیگری در واریته Neela کتان زراعی برای ریشه‌دار کردن نوساقه حاصل از شاخساره و گره‌های جانبی ساقه از IBA و NAA به‌طور جداگانه از ۴ غلظت ۲- ۱/۵- ۱- ۰/۵ میلی-گرم در لیتر NAA استفاده شد و بیشترین ریشه‌زایی در محیط کشت MS ۱/۲ حاوی ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA به‌دست آمد (۳). مطالعه حاضر، نخستین گزارش از باززایی کالوس حاصل از نوساقه در شرایط درون شیشه‌ای گیاه دارویی کتان سفید (*L. album*) بومی ایران می‌باشد. از نتایج این تحقیق می‌توان در استفاده از روش‌های بیوتکنولوژی برای بهبود ژنتیکی و مهندسی مسیرهای متابولیکی این گونه گیاهی بهره جست.

سپاسگزاری

از مسئولان محترم دانشگاه تربیت مدرس بدلیل حمایت مالی از این تحقیق تشکر و قدردانی می‌شود.

منابع

۱- رهنما، ح.، منتصر کوهساری، ش.، نادری مشکین، ح. و فهیمی، ح. ۱۳۹۱. باززایی با فراوانی بالا از قطعات جداکشت میانگره، برگ و ریزغده گیاه سیب زمینی (*Solanum tuberosum* L.). مجله زیست شناسی ایران، ۲۵: ۱۲۹-۱۲۰.

۲- هاتف سلمانیان، ع. و کهریزی، د. ۱۳۸۶. مطالعه تأثیر ژنوتیپ ونوع ریزنمونه بر روی باززایی نوساقه گیاهچه‌های کلزا (*Brassica napus* L.). مجله زیست شناسی ایران، ۲۰: ۱۷۹-۱۷۱.

3-Akter, F., Parvez, M. S., Islam, M. S., Mondol, P. C. and Alam, M. F. 2008. Effects of different hormones *in vitro* regeneration of linseed *(Linum usitatissimum* L.). Plant Environment and Development, 2(2): 135-138.

4-Behar, N., Kumar, P. and Chandel, G. 2011. Effect of explant type, genotype and plant growth regulators on morphogenetic potential of flax (*Linum usitatissimum* L.). Journal of Cell and Plant Sciences, 2(1): 13-18.

5-Belonogova, M. A. and Raldugina, G. N. 2006. Shoot regeneration from cotyledon explants of fibre flax (*Linum usitatissimum*) and their subsequent rooting. Russian Journal of Plant Physiology, 53(4): 501–506.

6-Burbulis, N., Blinstrubiene, A. and Kupriene, R. 2009. Regeneration of adventitious shoots of linseed (*Linum usitatissimum* L.) from hypocotyls explants. Zemdirbyste-Agriculture, 96(3): 168-175.

7-Chen, Y. and Dribnenki, P. 2002. Effect of genotype and medium composition on flax *Linum usitatissimum* L. anther culture. Plant Cell Reports, 21(3): 204-207.

8-Duangporn, P. and Siripong, P. 2009. Effect of auxin and cytokinin on phyllanthusol a production by callus cultures of *Phyllanthus acidus* skeels. American-Eurasian Journal of Agricultural and Environmental Sciences, 5 (2): 258-263.

9-Fakhari, S., Sharifi, M., Yousefzadi, M. and Beshamgan, E. 2013. Effect of some phytohormones on podophyllotoxin production in cell and plantlets cultures of *Linum album.* Journal of Medicinal Plants and By-Products,1: 83-89.

10-Farkya, S, Bisaria, V. S. and Shrivastava, A. K. 2004. Biotechnological aspects of the production of the anticancer drug podophyllotoxin. Applied Microbiology Biotechnology, 65(5): 504-519.

11-Geng, S., Ma, M., Ye, H. C., Liu, B. Y., Li, G. F. and Cong, K. 2001. Effects of ipt gene expression on the physiological and chemical characteristics of *Artemisia annua* L. Plant Science, 160(4): 691-698.

12-Jain, P. and Rashid, A. 2001. Stimulation of shoot regeneration on *Linum* hypocotyl segments by thidiazuron and its response to light and calcium. Biologia Plantarum, 44(4): 611-613.

13-Janowicz, J., Niemann, J. and Wojciechowski, A. 2012. The effect of growth regulators on the regeneration ability of flax (*Linum usitatissimum* L.) hypocotyl explants in *in vitro* culture. Journal of Biotechnology, Computational Biology and Bionanotechnology, 93(2): 135-138.

14-Janowicz, J. and Wojciechowski, A. 2009. The evaluation of regeneration ability of two flax (*Linum usitatissimum* L.) cultivars in *in vitro* culture. Oilseed Crops, 30(1): 35-50.

15-Kalyaeva, N. M., Zakharchenko, N. S., and Bur'yanov, Y. I. 2000. Features of fiber flax plant regeneration. Biotekhnologiya, 6: 34–40.

16-Michel, Z., Hilaire, K. T., Mongomake, K., Georges, A. N. and Justin, K. Y. 2008. Effect of genotype, explants, growth regulators and sugars on callus induction in cotton (*Gossypium hirsutum L.*). Australian Journal of Crop Science, 2: 1-9.

17-Mohagheghzadeha, A., Hemmatia, Sh. and Alfermannb, W. 2006. Quantification of aryltetralin lignans in *Linum album* organs and *in vitro* cultures. Iranian Journal of Pharmaceutical Sciences, 2(1): 47-56.

18-Murashige, T. and Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiologia Plantarum, 15(3): 473-497.

19-Murch, S. J., KrishnaRaj, S. and Saxena, P. K. 2000b. Phytomaceuticals: mass production, standardization, and conservation. Scientific Review of Alternative Medicine, 4(2): 39-43.

20-Petersen, M. and Alfermann, A. W. 2001. The production of cytotoxic lignans by plant cell cultures. Applied Microbiology and Biotechnology, 55(2): 135-142.

21-Smollny, T., Wichers, H., Kalenberg, S., Shahsavari, A., Petersen, M., Alfermann, A. W. 1998. Accumulation of podophyllotoxin and related lignans in cell suspension cultures of *Linum album*. Phytochemistry, 48(6): 975-979.

22-Tavakkol Afshari, R., Angoshtari, R. and Kalantari, S. 2011. Effects of light and different plant growth regulators on induction of callus growth in rapeseed (*Brassica napus* L.) genotypes. Plant Omics Journal, 4(2): 60-67.

23-Vrbova, M., Kotrba, P., Horacek, J., Petr Smykal, P., Svabova, L., Vetrovcova, M., Smykalova, I. and Griga, M. 2013. Enhanced accumulation of cadmium in *Linum usitatissimum* L. plants due to overproduction of metallothionein α-domain as a fusion to β-glucuronidase protein. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 112(3): 321-330.

24-Yildiz, M. and Özgen, M. 2006. A comparison of growth regulators for adventitious shoot regeneration from hypocotyls of flax (*Linum usitatissimum* L.). Journal of Food, Agriculture and Environment, 4(3): 171-174.

25-Yousefzadi, M., Sharifi, M., Behmanesh, M., Moyano, E., Bonfill, M., Cusido, R. M. and Palazon, J. 2010. Podophyllotoxin: Current approaches to its biotechnological production and future challenges. Engineering in Life Sciences, 10(4): 281-292.

26-Zhan, X. C., Jones, D. A. and Keer, A. 1989. *In vitro* plantlet formation in *Linum marginale* from cotyledons, hypocotyls, leaves, roots and protoplasts. Australian Journal of Plant Physiology, 16(4): 315-320.

In Vitro Regereration in *Linum Album* Kotschy Ex Boiss

Javadian N.[1], Karimzadeh Gh.[1], Sharifi M.[2] and Moieni A.[1]

[1] **Plant Breeding and Biotechnology Dept., Faculty of Agriculture, Tarbiat Modares University, Tehran, I.R. of Iran**

[2] **Plant Biology Dept., Faculty of Biological Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, I.R. of Iran**

Abstract

Linum album of the member Linaceae is a herbaceous Iranian endemic medicinal plant, having podophyllotoxin (PTOX) metabolite. This important pharmaceutical compound used as a precursor for the synthesis of important antitumor drugs like Etoposide, Teniposide and Etopophos. Plant tissues culture is an appropriate method of increasing secondary metabolits production. In this research, callus induction was investigated to regeneration under *in vitro* condition. Calli were initiated from shoot segment of young plant on Murashige and Skoog (MS) culture medium supplemented with (0- 0.4- 0.8- 1- 1.5- 2- 2.5 mg l^{-1}) naphthalene acetic acid (NAA) and (0- 0.2- 0.4 mg l^{-1}) kinetin (KIN) in the dark. The heaviest calli were obtained in 2 mg l^{-1} NAA with 0.4 mg l^{-1} KIN. Calli were then transferred to MS medium supplemented with 6-benzyladenine (1-2.5 mg l^{-1} BA) either alone or in combination with 0.2 mg l^{-1} NAA for shoot regeneration. The 2.0 mg l^{-1} BA was identified more effective on shoot regeneration. For induction root from shoots, the optimal result obtained from half-strength MS medium supplemented with 1 mg l^{-1} NAA.

Key words: *Linum album*, medicinal plant, *in vitro* culture, callus induction, regeneration.