باز زایی درون شیشه‌ای مامیران ایرانی (*Chelidonium majus* L.)

آرزوعزیزخواجه*، ابراهیم دورانی، سعید اهری‌زاد

ایران، تبریز، دانشگاه تبریز، دانشکده کشاورزی، گروه به‌نژادی و بیوتکنولوژی گیاهی

تاریخ دریافت: ۹۷/۱/۲۹ تاریخ پذیرش: ۹۷/۸/۱۵

چکیده

مامیران (*Chelidonium majus* L.) گیاهی دارویی از خانواده خشخاش و غنی از آلکالوئیدهای ایزوکوینولین است. از آنجایی که سنتز شیمیایی این آلکالوئیدها مقدور نیست، صنعت داروسازی به مقادیر زیادی گیاه برای استخراج این ترکیبات نیازمند است. هدف این پژوهش بهینه‌سازی یک روش تکرارپذیر برای باز زایی مامیران بواسطه کالوس‌زایی بود. بدین منظور، بذور مامیران بعد از ضدعفونی سطحی برای جوانه‌زنی در محیط 1/2 MS کشت شدند. ریز نمونه‌های کوتیلدون و هیپوکوتیل از گیاهچه‌های ۲۰ روزه و ریز نمونه‌های برگ از گیاهان ۳ ماهه تهیه و برای کالوس‌زایی در محیط کشت موراشیگ و اسکوگ (MS) تکمیل شده با تنظیم کننده‌های رشد گیاهی مختلف کشت شدند. بیشترین وزن‌تر کالوس از ریز نمونه‌های مستقر در محیط MS دارای ۱ میلی‌گرم بر لیتر۲و۴- دی کلرو فنوکسی استیک اسید (2,4-D) در ترکیب با ۱ یا ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر از یکی از سیتوکنین‌های بنزیل آمینو پورین (BAP) یا تیدیازورون (TDZ) به دست آمد. در چند تیمار بعد از باز کشت‌های مکرر اندام‌زایی نیز مشاهده شد. باز زایی دو ماه پس از باز کشت کالوس‌های حاصل از ریز نمونه‌های کوتیلدون در محیط کشت فاقد تنظیم کننده‌های رشد گیاهی با فراوانی ۱۱/۱۱ درصد و یک شاخساره به ازای هر ریز نمونه مشاهده شد. شاخساره‌ها در محیط MS فاقد تنظیم کننده-های رشد گیاهی با فراوانی ۷۷/۷۸ درصد و ۲/۳۶ ریشه به ازای هر شاخساره ریشه‌دار شدند.

واژه‌های کلیدی: القای کالوس، باززایی درون شیشه‌ای، کشت بافت، مامیران

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۹۱۴۸۳۲۵۹۶۰، پست الکترونیکی: a.azizkhajeh@gmail.com

مقدمه

مامیران بانام علمی *Chelidonium majus* L. یک گیاه دارویی باستانی است که از دیرباز بدلیل آلکالوئیدهای شیمیایی-دارویی موجود در آن مورد استفاده قرارگرفته است (۲۱). این گیاه حاوی آلکالوئیدهای ایزوکوینولین (از قبیل: سنگوینارین، چلیدونین، چلریترین، بربرین، پروتوپین و کوپتیسین)، فلاوونوئیدها و اسیدهای فنولیک می‌باشد (۲). عصاره خام مامیران و ترکیبات خالص‌سازی شده از آن طیف وسیعی از فعالیت‌های بیولوژیکی از قبیل خواص ضدالتهابی، آنتی باکتریایی، ضد توموری و غیره را نشان می‌دهند (۴).

سنتز شیمیایی ترکیبات دارای فعالیت بیولوژیکی بدلیل ساختار پیچیده و هزینه‌های بالا دشوار است. درنتیجه صنعت داروسازی برای استخراج ترکیبات باارزش دارویی به مقادیر بالایی از گیاهان دارویی نیازمند است (۱۵). گیاهان دارویی کشت شده در مزرعه نیز مستعد انواع آلودگی‌های قارچی، باکتریایی، فلزات سنگین، آفت‌کش‌ها و غیره هستند (۲۲). از طرف دیگر اکوسیستم‌های طبیعی به‌سرعت رو به فرسایش بوده و زیستگاه‌های طبیعی برخی گیاهان از بین رفته و آن‌ها در معرض انقراض هستند. همچنین تکثیر و حفظ بقای گیاهان از طریق روش‌های مرسوم مثل تکثیر رویشی یا بذر دارای محدودیت‌هایی ازجمله سرعت آهسته تکثیر، فاکتورهای آب و هوایی و

خاکی، دوره کمون، کم بودن میزان بذر و درصد پایین جوانه‌زنی است و برخی مواقع کلون‌های بدست آمده از تکثیر بوسیله بذر یکنواخت نیستند (۱۷). در جهت حل این مشکلات، کشت بافت گیاهی در مقیاس بزرگ یک جایگزین مناسب برای روش‌های سنتی کشت و زرع است (۱۳). تکنیک‌های کشت بافت گیاهی بطور فزاینده‌ای برای ریزازدیادی، نگهداری ژرم‌پلاسم، بهبود ژنتیکی گیاهان دارویی و تولید متابولیت‌های ثانویه بکار می‌روند (۶). تولید درون شیشه‌ای متابولیت‌های ثانویه می‌تواند مطمئن-تر، آسان‌تر و قابل پیش بینی‌تربوده و خالص‌سازی مواد فیتوشیمیایی سریع‌تر و مؤثرتر باشد (۷). اندام‌زایی بواسطه القای کالوس و جنین‌زایی سوماتیکی دو روش مهم در ریزازدیادی گیاهان هستند (۱۲). القای کالوس و مورفوژنز در شرایط درون شیشه‌ای بطور قابل‌توجهی بوسیله عواملی ازجمله نوع ریز نمونه، مرحله فیزیولوژیکی گیاه مادر، غلظت و ترکیب تنظیم کننده‌های رشد گیاهی تحت تأثیر قرار می‌گیرند (۱۶).

چندین پژوهش در زمینه کشت بافت مامیران انجام شده است. تخمک‌های نابالغ مامیران در محیط کشت MS حاوی ۴/۵۲ میکرومولار 2,4-D، با فراوانی ۴۰ درصد کالوس جنین‌زا تولید کردند. سوسپانسیون سلولی نیز از کشت این کالوس‌ها در محیط کشت MS مایع محتوی ۴/۵۲ میکرومولار 2,4-D بدست آمد. توده‌های سلولی حاصل از کشت سوسپانسیون سلولی، جنین‌های سوماتیکی تولید کردند که در نهایت این جنین‌ها تبدیل به گیاهچه شدند (۹). در پژوهشی دیگر جنین‌زایی سوماتیکی در محیط کشت فاقد تنظیم کننده‌های رشد و یا محیط کشت-های حاوی کاینتین (Kin) از ریز نمونه‌های اپیکوتیل مامیران و بدون کالوس‌زایی مشاهده شده است (۲۰). در آزمایشات ونتو(۱۹) بیشترین مقدارکالوس از ریز نمونه‌های ساقه مامیران در محیط کشت MS حاوی ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر ایندول استیک اسید (IAA) و ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر Kin بدست آمده است. برای ریزازدیادی کشت ریز نمونه‌های ساقه در محیط کشت MS حاوی یک میلی‌گرم در لیتر BAP در ترکیب با ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر 2,4-D، و برای ریشه‌زایی محیط MS فاقد تنظیم‌کننده های رشد بهترین نتیجه را داشته‌اند. در پژوهشی که اتگونپورو و همکارانش نتیجه گرفتند که نسبت برابر اکسین و سیتوکنین برای کالوس‌زایی در مامیران مناسب است. برای تهیه سوسپانسیون سلولی نیز از کشت کالوس‌های قدیمی، در محیط کشت MS مایع استفاده کردند (۱۰). هاشمی و نقوی گزارش کردند که برای القای کالوس در مامیران با استفاده از ریز نمونه‌های ساقه، IAA بهتر از 2,4-D و نفتالین استیک اسید (NAA) می‌باشد و بیشترین درصد القای کالوس در محیط کشت B5 حاوی ۱ یا ۲ میلی‌گرم بر لیتر IAA و ۰/۱ یا ۰/۲ میلی‌گرم بر لیتر BAP بدست آمده است (۵). در پژوهش اسفندیار و همکاران (۱) بیشترین درصد کالوس‌زایی از ریز نمونه ساقه مامیران در محیط کشت‌های MS دارای ۱ میلی‌گرم بر لیتر 2,4-D و ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر بنزیل آدنین (BA) به میزان ۶۹/۴۴ درصد و ۲ میلی‌گرم بر لیتر 2,4-D به همراه ۱/۵ میلی‌گرم بر لیتر BA به میزان ۶۳/۸۸ درصد گزارش شد. بیشترین وزن‌تر نیز از کالوس‌های ساقه تشکیل شده در محیط حاوی ۲ میلی‌گرم بر لیتر 2,4-D بدست آمد. باز زایی نیز در محیط تکمیل شده با ۲ میلی‌گرم بر لیتر BAP و ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر 2,4-D بصورت تشکیل برگ مشاهده شد.

در این پژوهش سعی شده است رفتار ریز نمونه‌های هیپوکوتیل، کوتیلدون و برگ مامیران در محیط کشت‌های تکمیل شده با تنظیم کننده‌های رشد گیاهی مختلف بررسی گردد. هدف دستیابی به یک روش تکرارپذیر برای باز زایی مامیران بواسطه کالوس‌زایی است.

مواد و روشها

بذور مامیران از مرکز ذخایر ژنتیکی و زیستی ایران تهیه شدند. بذور بطور سطحی با هیپوکلریت سدیم ۱/۶ درصد به مدت ۱۵ دقیقه ضدعفونی شدند. سپس سه مرتبه و هر

بار به مدت سه دقیقه با آب مقطر استریل آبکشی شدند. تقریباً ۱۵ بذر در ۳۵ میلی‌لیتر محیط 1/2 MS در پتری دیش‌های ۱۰۰ × ۱۵ میلی‌متر کشت شدند. محیط کشت پایه شامل نمک‌های MS، ویتامین‌های B5 به همراه ۳ درصد ساکارز و ۰/۶ درصد آگار بود و pH آن قبل از افزودن آگار روی ۵/۷ تنظیم شده بود. بمنظور استریل شدن، محیط کشت به مدت ۱۵ دقیقه تحت فشار ۱/۲ کیلوگرم بر سانتی‌متر مکعب و دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد اتوکلاو شده بود. بذور در اتاق رشد با شدت نور کم 2) ($\mu mol.\ m^{-2}s^{-1}$) و دمای ۲ ±۲۵ درجه سانتی‌گراد جوانه زدند. ریز نمونه‌های هیپوکوتیل (بطول تقریبی ۱ سانتی‌متر) و کوتیلدون (با ابعاد تقریبی ۰/۵ ×۰/۵ سانتی‌متر) از گیاهچه‌های ۲۰ روزه و ریز نمونه‌های برگ (با ابعاد تقریبی ۰/۵ ×۰/۵ سانتی‌متر) از گیاهان سه ماهه تهیه و در محیط کشت MS تکمیل شده با ترکیب و غلظت‌های متفاوتی از تنظیم کننده‌های رشد گیاهی (جدول ۱) قرار داده شدند. برای هر تیمار سه تکرار (هر تکرار حاوی شش ریز نمونه) در نظر گرفته شد. کشت‌ها پس از ۴۵ روز باز کشت شدند و درصد کالوس‌زایی، وزن‌تر کالوس‌ها و درصد اندام‌زایی (در محیط القای کالوس) بعد از سه ماه محاسبه شد.

جدول ۱- تنظیم کننده‌های رشد گیاهی بکار رفته در محیط کالوس‌زایی و مقایسه میانگین درصد کالوس‌زایی و وزن‌تر کالوس‌ها (داده‌ها نشان‌دهنده میانگین±انحراف معیار هستند)

ردیف	تنظیم کننده‌های رشد گیاهی	درصد کالوس-زایی	وزن‌تر کالوس برحسب گرم		
			برگ	هیپوکوتیل	کوتیلدون
۱	0.5 mg/l IAA+ 0.5 mg/l BAP	۷۷/۷۸±۱۴/۴۳ ^{c}	۰/۰۵۲±۰/۰۰۷ ^{de}	۰/۰۱۰±۰/۰۰۲^{d}	۰/۰۳۵±۰/۰۰۶^{d}
۲	1 mg/l IAA+ 0.5 mg/l BAP	۹۸/۱۵±۵/۵۵ ^{a}	۰/۰۷۸±۰/۰۲۵ ^{cd}	۰/۰۱۹±۰/۰۰۵^{c}	۰/۰۶۵±۰/۰۱۶^{c}
۳	1 mg/l IAA+ 1 mg/l BAP	۹۰/۷۴±۸/۷۸^{b}	۰/۱۰۶±۰/۰۰۹ ^{c}	۰/۰۲۵±۰/۰۰۹^{c}	۰/۰۴۲±۰/۰۰۸^{cd}
۴	0.5 mg/l IAA+ 0.5 mg/l TDZ	۹۶/۳۰±۷/۳۵ ^{ab}	۰/۰۴۱±۰/۰۱۲ ^{e}	۰/۰۱۹±۰/۰۰۳^{c}	۰/۰۳۶±۰/۰۰۳^{d}
۵	1 mg/l IAA+ 0.5 mg/l TDZ	۹۴/۴۴±۱۱/۷۸ ^{ab}	۰/۰۲۳±۰/۰۰۴ ^{f}	۰/۰۲۴±۰/۰۰۷^{c}	۰/۰۶۳±۰/۰۰۵^{c}
۶	1 mg/l IAA+ 1 mg/l TDZ	۹۴/۴۴±۸/۳۳ ^{ab}	۰/۰۶۵±۰/۰۱۵ ^{cd}	۰/۰۱۷±۰/۰۰۶^{c}	۰/۰۴۸±۰/۰۱۴^{cd}
۷	0.5 mg/l 2,4-D + 0.5 mg/l BAP	۹۶/۳۰±۷/۳۵ ^{ab}	۰/۱۹۴±۰/۰۲۸ ^{b}	۰/۰۸۲±۰/۰۱۶ ^{ab}	۰/۱۴۵±۰/۰۱۸^{b}
۸	1 mg/l 2,4-D + 0.5 mg/l BAP	۱۰۰±۰ ^{a}	۰/۳۱۶±۰/۰۷۱ ^{ab}	۰/۱۰۹±۰/۰۲۶^{ab}	۰/۲۳۶±۰/۰۷۱^{ab}
۹	1 mg/l 2,4-D + 1 mg/l BAP	۱۰۰±۰ ^{a}	۰/۳۱۲±۰/۰۴۳ ^{ab}	۰/۱۲۴±۰/۰۰۹^{ab}	۰/۲۸۱±۰/۰۶۰^{a}
۱۰	0.5 mg/l 2,4-D + 0.5 mg/l TDZ	۱۰۰±۰ ^{a}	۰/۲۳۶±۰/۰۶۴ ^{b}	۰/۰۷۵±۰/۰۱۳^{b}	۰/۱۵۱±۰/۰۲۶^{b}
۱۱	1 mg/l 2,4-D + 0.5 mg/l TDZ	۱۰۰±۰ ^{a}	۰/۴۴۰±۰/۰۴۹^{a}	۰/۰۷۹±۰/۰۱۴^{ab}	۰/۱۹۲±۰/۰۰۸^{ab}
۱۲	1 mg/l 2,4-D + 1 mg/l TDZ	۱۰۰±۰ ^{a}	۰/۴۶۳±۰/۱۳۷^{a}	۰/۱۳۳±۰/۰۱۳^{a}	۰/۲۶۵±۰/۰۴۰^{a}
۱۳	1 mg/l 2,4-D	۰	۰	۰	۰
۱۴	1 mg/l BAP	۰	۰	۰	۰
۱۵	1 mg/l TDZ	۰	۰	۰	۰

برای باز زایی، کالوس‌های موفق به محیط کشت‌های باز زایی که با ترکیب متفاوتی از تنظیم کننده‌های رشد گیاهی تکمیل شده بودند (جدول ۲) و محیط کشت فاقد تنظیم کننده‌های رشد انتقال داده شدند.

شاخساره‌های باز زا شده برای ریشه‌زایی به محیط فاقد تنظیم کننده‌های رشد گیاهی و محیط MS تکمیل شده با ۲ میلی‌گرم بر لیتر از یک اکسین شامل: IAA، IBA و NAA انتقال داده شدند. تمامی کشت‌ها در مراحل کالوس‌زایی، باز زایی و ریشه‌زایی در اتاق رشد با دمای ۲±۲۵ درجه سانتی‌گراد و شدت نور کم ۲ $\mu mol.m^{-2}s^{-1}$ نگهداری شدند.

جدول ۲- تنظیم کننده‌های رشد گیاهی مورد استفاده در محیط باززایی

شماره ترکیب	مقدار تنظیم کننده‌های رشد برحسب میلی گرم بر لیتر		
	BAP	TDZ	2,4-D
۱	۰/۲	۰	۰
۲	۲	۰	۰
۳	۲	۰	۰/۵
۴	۰	۰/۲	۰
۵	۰	۲	۰
۶	۰	۲	۰/۵
۷	۲	۲	۰

تجزیه داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار MSTAT-C در قالب آزمایش فاکتوریل با سه تکرار بر پایه طرح کاملاً تصادفی و مقایسه میانگین‌ها به روش دانکن انجام شد.

نتایج و بحث

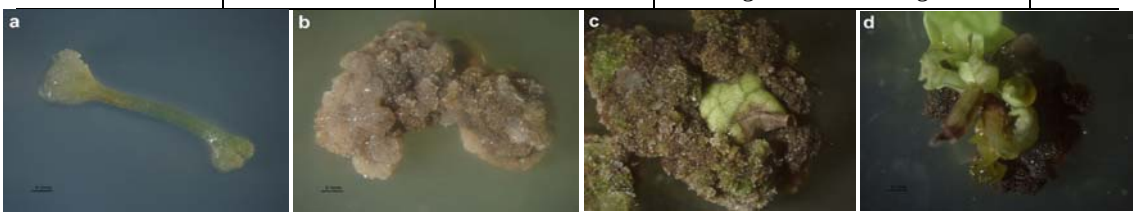
ریز نمونه‌های در محیط کشت تکمیل شده با یک اکسین یا یک سیتوکنین، شامل محیط کشت‌های حاوی ۱ میلی‌گرم بر لیتر 2,4-D، BAP یا TDZ، خشک شدند و هیچ تقسیم سلولی در آن‌ها دیده نشد. القای کالوس در محیط کشت-هایی مشاهده شد که حاوی اکسین و سیتوکنین بودند.

نتایج تجزیه واریانس نشان داد که تنظیم کننده‌های رشد گیاهی درصد کالوس‌زایی را تحت تأثیر قرار داده‌اند. همچنین وزن‌تر کالوس‌ها نیز تحت تأثیر نوع ریز نمونه، تنظیم‌کننده رشد گیاهی و اثر متقابل ریز نمونه×تنظیم‌کننده رشد گیاهی بوده است. مقایسه میانگین برای درصد کالوس‌زایی نشان داد که به‌جز محیط کشت‌های حاوی ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر IAA به‌اضافه ۰/۵ یا ۱ میلی‌گرم بر لیتر BAP، سایر محیط کشت‌ها عملکرد مشابهی دارند (جدول ۱). باتوجه به معنی‌دار بودن اثر متقابل ریز نمونه×تنظیم‌کننده رشد گیاهی، مقایسه میانگین برای صفت وزن‌تر کالوس برای تنظیم کننده‌های رشد گیاهی در هر ریز نمونه بصورت جداگانه انجام شد (جدول ۱). همه ریز نمونه‌ها در محیط کشت‌های تکمیل شده با ۱ میلی‌گرم بر لیتر2,4-D در ترکیب با ۱ یا ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر از یکی از سیتوکنین‌های BAP یا TDZ عملکرد مشابهی داشتند. همه کالوس‌ها سفت و متراکم بودند و رنگشان در ابتدا زرد روشن بود (شکل ۱a). اما بعد از باز کشت در محیط کشت مشابه رنگشان تغییر کرد و به رنگ قهوه‌ای درآمد (شکل ۱b). کالوس‌های قهوه‌ای به مدت ۶ ماه در محیط کالوس-زایی نگهداری شدند. پس از طی این مدت در محیط کشت‌های حاوی 2,4-D و TDZ نقاط سبزرنگی بر روی کالوس‌های قهوه‌ای ظاهر شدند ولی اندام‌زایی رخ نداد (شکل ۱c). رنگ محیط کشت نیز بدلیل ترشح متابولیت-های ثانویه توسط کالوس‌ها به محیط به رنگ نارنجی تغییر پیدا کرد.

پس از باز کشت کالوس‌ها، در چند تیمار اندام‌زایی رخ داد (جدول ۳). بیشترین درصد اندام‌زایی (۳۳/۲ درصد) در ریز نمونه‌های برگ کشت شده در محیط کشت MS حاوی ۱ میلی‌گرم بر لیتر IAA به‌اضافه ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر BAP مشاهده شد و به ازای هر ریز نمونه ۲ شاخساره تشکیل شد (شکل ۱d). این شاخساره‌ها از کالوس‌ها جدا شدند و برای رشد بیشتر به محیط کشت MS حاوی ۰/۲ میلی‌گرم بر لیتر BAP انتقال داده شدند.

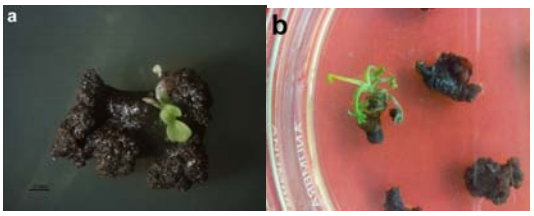
جدول ۳- اثر تنظیم کننده‌های رشد گیاهی و ریز نمونه‌ها بر میزان اندام‌زایی در محیط‌های القای کالوس (RP: درصد اندام‌زایی(٪) و SH/E: تعداد شاخساره تشکیل شده به ازای هر ریز نمونه)

ردیف	ترکیب تنظیم کننده‌های رشد گیاهی	ریز نمونه					
		برگ		لپه		زیر لپه	
		RP	SH/E	RP	SH/E	RP	SH/E
۱	1 mg/l IAA + 0.5 mg/l BAP	۳۳/۲	۲	۰	۰	۰	۰
۲	1 mg/l IAA + 1 mg/l BAP	۵/۵	۲	۰	۰	۰	۰
۳	0.5 mg/l 2,4-D + 0.5 mg/l BAP	۰	۰	۱۶/۶	۱/۳۳	۵/۵	۱
۴	1 mg/l 2,4-D + 0.5 mg/l BAP	۱۱/۰۶	۲	۰	۰	۰	۰
۵	1 mg/l 2,4-D + 1 mg/l BAP	۰	۰	۵/۵	۱	۰	۰
۶	0.5 mg/l 2,4-D + 0.5 mg/l TDZ	۰	۰	۰	۰	۵/۵	۱



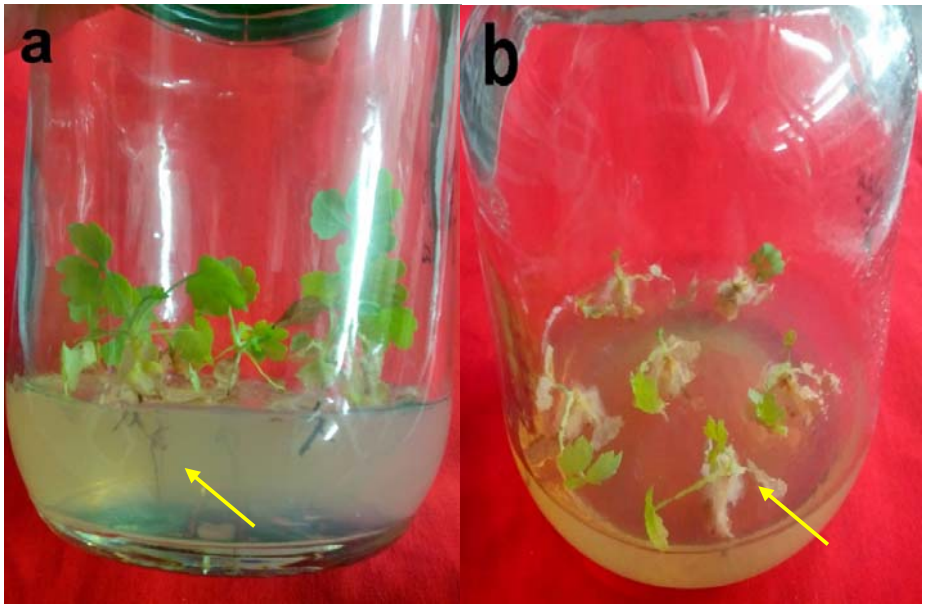
شکل ۱- القای کالوس در *مامیران*: a: تشکیل کالوس‌هایی به رنگ زرد روشن در مراحل اولیه القا، b: قهوه‌ای شدن کالوس‌ها پس از بازکشت در محیط مشابه، c: ظهور نقاط سبزرنگ بر روی کالوس‌های قهوه‌ای تشکیل شده در محیط کشت حاوی ۱ میلی گرم بر لیتر 2,4-D و ۰/۵ میلی گرم بر لیتر TDZ، d: اندام‌زایی در محیط کشت القای کالوس (محیط تکمیل شده با ۱ میلی گرم بر لیتر IAA و ۰/۵ میلی گرم بر لیتر BAP)

کلیه کالوس‌های تشکیل شده در محیط کشت‌های تکمیل شده با 2,4-D به‌اضافه یکی از سیتوکنین‌های BAP یا TDZ به محیط کشت‌های باز زایی انتقال داده شدند. رنگ این کالوس‌ها تیره‌تر شد و تقسیم سلولی در آن‌ها ادامه پیدا کرد. در ریز نمونه‌های کوتیلدون و هیپوکوتیل نقاط سبزرنگی بر روی کالوس‌های قهوه‌ای پدید آمد. باز زایی فقط در محیط کشت عاری از تنظیم کننده‌های رشد گیاهی از کالوس‌های مشتق از ریز نمونه‌های کوتیلدون که در محیط کالوس زایی حاوی ۱ میلی‌گرم بر لیتر 2,4-D به‌اضافه ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر BAP تشکیل شده بودند، با فراوانی ۱۱/۱۱ درصد و تشکیل یک شاخساره به ازای هر ریز نمونه، دو ماه بعد از انتقال مشاهده شد (شکل ۲a و ۲b).



شکل ۲- باززایی بواسطه کالوس‌زایی در محیط کشت MS فاقد تنظیم کننده‌های رشد گیاهی

تشکیل ریشه با فراوانی ۷۷/۷۸ درصد و ۲/۳۶ ریشه به ازای هر شاخساره در محیط کشت فاقد تنظیم کننده‌های رشد گیاهی ۱۰ روز پس از انتقال شاخساره‌ها به محیط ریشه‌زایی مشاهده شد (شکل ۳a). در محیط‌های ریشه‌زایی تکمیل شده با تنظیم کننده‌های رشد گیاهی، ریشه‌های نابجا از قسمت‌های بالایی شاخساره به وجود آمدند (شکل ۳b). تعداد این ریشه‌های نابجا خیلی زیاد و شمارش آن‌ها غیرممکن بود.



شکل ۳- ریشه‌زایی درون شیشه‌ای در مامیران: a: ریشه‌زایی در محیط کشت MS فاقد تنظیم کننده‌های رشد گیاهی، b: ریشه‌های نابجا در محیط کشت MS تکمیل شده با ۲ میلی گرم بر لیتر NAA

کیم و همکاران (۹) گزارش کردند که تخمک‌های نابالغ *C. majus* در محیط کشت MS تکمیل شده با 2,4-D کالوس جنین‌زا تشکیل می‌دهند. در آزمایشات اسفندیار و همکاران نیز بیشترین وزن کالوس از ریزنمونه‌های ساقه مامیران در محیط کشت MS حاوی ۲ میلی گرم بر لیتر 2,4-D گزارش شد (۱). طبق مطالعات افزودن TDZ به محیط کشت به‌عنوان تنها تنظیم‌کننده رشد گیاهی منجر به تولید کالوس-هایی با توانایی باز زایی از ریزنمونه‌های برگ *Echinacea purpurea* L. (۸)، و اندام‌زایی غیرمستقیم از ریزنمونه‌های گره *Asparagus racemosus* (۱۸) شده است. همچنین BAP اندام‌زایی غیرمستقیم از ریزنمونه‌های برگ *Curculigo orchioides* را سبب شده است (۳). اما در این پژوهش ریز نمونه‌ها در پاسخ به محیط کشت‌هایی که با 2,4-D، TDZ یا BAP تکمیل شده بودند، خشک شدند. تکثیر کالوس از بافت‌های بیشتر گیاهان دولپه معمولاً به حضور اکسین و سیتوکنین در محیط رشد نیاز دارد. عموماً برای القای کالوس غلظت برابر اکسین و سیتوکنین بیشتر از سایر غلظت‌ها بکار می‌رود (۱۱). اتگونپورو و همکاران (۱۰) و ونتو (۱۹) گزارش کردند که غلظت برابر اکسین و سیتوکنین برای القای کالوس در مامیران بهتر است. اما نتایج پژوهش حاضر نشان داد که غلظت این دو تنظیم کننده رشد گیاهی می‌تواند برابر باشد و یا غلظت اکسین در محیط کشت بیشتر باشد. هاشمی و نقوی (۵) گزارش کردند که در میان اکسین‌ها، برای کالوس‌زایی از ریزنمونه-های ساقه مامیران، IAA مؤثرتر از 2,4-D و NAA است. ولی نتایج پژوهش حاضر نشان داد که برای کالوس‌زایی در مامیران با استفاده از ریزنمونه‌های کوتیلدون، هیپوکوتیل و برگ، 2,4-D موثرتراز IAA است. طبق نتایج بدست آمده، برگ‌ریز نمونه موفقی برای کالوس‌زایی در مامیران است. در تقابل، ونتو (۱۹) گزارش کرد که برگ‌ریز نمونه خوبی برای القای کالوس در مامیران نیست و واکنش ریزنمونه-های برگ فقط نکروزه شدن است.

اندام‌زایی در مامیران از ریزنمونه‌های ساقه در محیط کشت MS تکمیل شده با ۱ میلی گرم بر لیتر BAP به‌اضافه ۰/۵ میلی گرم بر لیتر 2,4-D و تولید ۵ شاخساره به ازای هر ریز نمونه گزارش‌شده است (۱۹). اما در این مطالعه اندام-زایی بصورت غیرمستقیم رخ داد که این موضوع می‌تواند

به نوع ریز نمونه، تنظیم کننده‌های رشد گیاهی و اکوتیپ مورد استفاده در مطالعه که متعلق به منطقه گیلان بود، مربوط باشد.

در میان محیط کشت‌هایی که برای باز زایی مورد آزمایش قرارگرفتند، باز زایی فقط در محیط کشت فاقد تنظیم کننده‌های رشد گیاهی مشاهده شد که این نتیجه با برخی پژوهش‌ها مطابقت دارد. کیم و همکاران (۹) باز زایی مامیران از طریق جنین‌زایی سوماتیکی در محیط کشت MS فاقد تنظیم کننده‌های رشد گیاهی با استفاده از سلول‌های منفرد حاصل از سوسپانسیون سلولی را گزارش کرده‌اند. سرخیل و همکاران (۱۴) نیز گزارش کرده‌اند که محیط کشت فاقد تنظیم کننده‌های رشد، مناسب‌ترین محیط برای باز زایی رازیانه (*Foeniculum vulgare* Mill.) بواسطه کالوس‌زایی است. ولی اسفندیار و همکاران محیط پایه MS حاوی ۲ میلی گرم بر لیتر BAP و ۰/۵ میلی گرم بر لیتر 2,4-D را به‌عنوان بهترین محیط باززایی مامیران معرفی کردند (۱).

نتیجه‌گیری کلی

در این پژوهش در مرحله کالوس‌زایی درصد کالوس‌زایی، وزن‌تر کالوس‌ها و درصد اندام‌زایی کالوس‌ها مورد بررسی و محاسبه قرارگرفت. ریز نمونه‌های کوتیلدون، هیپوکوتیل و برگ در ۱۵ نوع محیط کشت MS که هرکدام با ترکیب و غلظت‌های متفاوتی از تنظیم کننده‌های رشد گیاهی تکمیل شده بودند (جدول ۱)، کشت شدند. ازنظر درصد کالوس‌زایی به غیر از ریزنمونه‌های کشت شده در محیط کشت‌های تکمیل شده با ۰/۵ میلی گرم بر لیتر IAA به‌اضافه ۰/۵ یا ۱ میلی گرم بر لیتر BAP، همه ریز نمونه‌ها در سایر محیط‌ها عملکرد مشابه داشتند. بیشترین وزن‌تر کالوس از هر سه ریز نمونه در محیط کشت‌های MS تکمیل شده با ۱ میلی گرم بر لیتر2,4-D در ترکیب با ۱ یا ۰/۵ میلی گرم بر لیتر از یکی از سیتوکنین‌های BAP یا TDZ بدست آمد. در این مرحله در برخی کالوس‌ا اندام-زایی نیز مشاهده شد. بیشترین درصد اندام‌زایی (۳۳/۲ درصد) به ریزنمونه‌های برگ کشت شده در محیط کشت MS حاوی ۱ میلی گرم بر لیتر IAA به‌اضافه ۰/۵ میلی گرم بر لیتر BAP مربوط بود و به ازای هر ریز نمونه ۲ شاخساره تشکیل شد. کالوس‌های تشکیل شده در محیط کشت‌های تکمیل شده با 2,4-D در ترکیب با BAP یا TDZ به محیط کشت‌های باز زایی انتقال داده شدند. ولی باز زایی فقط در محیط کشت MS فاقد تنظیم کننده‌های رشد گیاهی از کالوس‌های مشتق از ریزنمونه‌های کوتیلدون که در محیط کالوس زایی حاوی ۱ میلی گرم بر لیتر 2,4-D به‌اضافه ۰/۵ میلی گرم بر لیتر BAP تشکیل شده بودند، با فراوانی ۱۱/۱۱ درصد و تشکیل یک شاخساره به ازای هر ریز نمونه، دو ماه بعد از انتقال مشاهده شد. ریشه‌زایی در شاخساره‌های حاصله نیز در محیط کشت MS فاقد تنظیم کننده‌های رشد گیاهی با فراوانی ۷۷/۷۸ درصد و ۲/۳۶ ریشه به ازای هر شاخساره رخ داد.

منابع

۱- اسفندیار، ا.، کاظمی تبار، ک.، و کیانی، غ.، ۱۳۹۶. بررسی امکان القای کالوس و باز زایی غیرمستقیم در گیاه مامیران (*Chelidonium majus* L.) تحت تأثیر تنظیم کننده¬های رشد اکسین و سیتوکنین، مجله پژوهش¬های گیاهی، (۳)۳۰، صفحات ۶۷۱-۶۵۶.

2- Clombo, M. L., and Bosisio, E., 1996. Pharmaligical activities of *Chelidonium majus* L. (Papaveraceae). Pharmalogical Research, 33, PP: 127 – 134.

3- Dhenuka, S., Balakrishna, P., and Anand, A., 1999. Indirect organogenesis from leaf explants of medicinally important plant *Curculigo orchioides* Gaertn, Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology, 8, PP: 113-115.

4- Gilca, M., Gaman, L., Panait, E., Stoian, I., and Valeriu, A., 2010. *Chelidonium majus* – an

integrative review: traditional knowledge versus modern finding. Forsch Komplementmed, 17, PP: 241 – 248.

5- Hashemi, S. M., and Naghavi, M. R., 2015. Callus production of medicinal plant (*Chelidonium majus* L.), 1th International and 9th National Biotechnology Congress of Islamic Republic of Iran. May 24-26, Shahid Beheshti University, Tehran. Iran.

6- Hussain, A., Qarshi, I. A., Nazir, H., and Ullah, I., 2012a. Plant tissue culture: current status and opportunities, In: A. Leva and L. M. R., Rinaldi (eds). Recent Advances in Plant *in Vitro* Culture. INTECH, PP: 1 – 28.

7- Hussain, S., Fareed, S. H., Ansari, S., Rahman, A., Ahmad, I. Z., and Saeed, M., 2012b. Current approaches toward production of secondary plant metabolites, Journal of Pharmacy and BioAllied Sciences, 4, PP: 10-20.

8- Jones, M. P. A., Yi, Z., Murch, S. J., and Saxena, P. K., 2007. Thidiazuron induced regeneration of *Echinacea purpurea* L: micropropagation in solid and liquid culture systems, Plant Cell Reports, 26, PP: 13-19.

9- Kim, S. K., Min, B. W., and Liu, J. R., 1999. High frequency plant regeneration from immature ovule-derived embryogenic cell suspension cultures of *Chelidonium majus* var. *asiaticum*, Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 56, PP: 125 – 129.

10- Otgonpurev, S., Altantsetseg, K. H., and Tsevegsuren, N., 2013. Callus and cell suspension culture of *Chelidonium majus*, Journal of Agriculture Sciences, 11, PP: 150–154.

11- Ramawat, K. G., and Merillon, J. M., 1999. Biotechnology Secondary Metabolites, Science Publisher, Enfield, USA, PP: 425-432.

12- Rout, G. R., Samantaray, S., and Das, P., 2000. *In vitro* manipulation and propagation of medicinal plants. Biotechnology Advances, 18, PP: 91-120.

13- Sajc, L., Grubisic, D., and Vunjak-Novakovic, G., 2000. Bioreactors for plant engineering: an outlook for further research, Journal Biochemistry Engineering, 4, PP: 89–99.

14- Sarkheil, P., Omidi, M., Peyghambari, S. A., and Davazdahemami, S., 2009. The effect of plant growth regulators and explants on callogenesis, regeneration and suspension culture in *Foeniculum vulgare* Mill, Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants, 25, PP: 364-375.

15- Shimomura, K., Yoshimatsu, K., Jaziri, M., and Ishimaru, K., 1997. Traditional medicinal plant genetic resources and biotechnology applications. In: K. Watanabe and E.R.G. Pehu (eds), Plant biotechnology and plant genetic resources for sustainability and productivity. Austin, TX: R. G., Landes Company and Academic Press Inc, PP: 209 - 225.

16- Sidhu, Y., 2010. *In vitro* propagation of medicinal plants by tissue culture. The Plymouth Student Scientist, 4, PP: 432-449.

17- Sridhar, T. M., and Aswath, C. R., 2014. Review on medicinal plants propagation: A comprehensive study on role of natural organic extracts in tissue culture medium. American Journal of Plant Sciences, 5, PP: 3073-3088.

18- Trivedi, M., Yadav, S. K., Yadav, G. K., Bhaskar, R., and Tiwari, R. K., 2010. Thidiazuron induce callus induction and *in vitro* regeneration of asparagus (*Asparagus racemosus* Wild). Indian Journal of Science Research, 1, PP: 27-30.

19- Vantu, S., 2011. Aspects of *in vitro* cultivation of *Chelidonium majus.* Scientific Annals of Alexandru Cuza University of Iasi. New Series, Section 2, Vegetable Biology, PP: 49 – 52.

20- Vinterhalter, B., and Vinterhalter, D., 2002. Propagation of *Chelidonium majus* L., by somatic embryogenesis. Biologia Plantarum, 45, PP: 489 – 493.

21- Wagner, H., 1982. Pharmazeutische biologie, Vol. 2, Fischer, Stuttgart, PP: 155.

22- Wen, K., 2000. The turnover rate of marker constituents in Chinese herbal medicine, Journal of Food and Drug Analysis, 8, PP: 270 – 277.

In vitro regeneration of Iranian *celandine* (*Chelidonium majus* L.)

Aziz Khajeh A., Dorani E. and Aharizad S.

Dept. of Plant Breeding and Biotechnology, Agriculture Faculty, Tabriz University, Tabriz, I.R. of Iran

Abstract

Celandine (*Chelidonium majus* L.) is a medicinal plant belonging to the Papaveraceae and rich in isoquinolin alkaloids. Chemical synthesis of these alkaloids is not possible. So, the pharmaceutical industry requires large quantities of plants to extract these compounds. The purpose of this study was optimization of a repeatable method for regeneration of *celandine* by callus induction. *Celandine* seeds after surface sterilizing were placed on 1/2MS medium for germination. Cotyledon and hypocotyl explants were prepared from 20-day-old sterile seedlings and leaf explants from 3-month-old plants. Explants were put on Murashige and Skoog (MS) medium supplemented with different plant growth regulators (PGRs) to callus induction. The highest fresh weight was for calli in mediums containing 1 mg/l 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) in combination with 0.5 or 1 mg/l Amino Purine (BAP) or Tidiazuron (TDZ). Organogenesis was observed in few treatments after repetitive subculture. Plant regeneration only happened in PGRs free MS medium, from cotyledon calli after 2 months with frequency of 11.11 % by one shoot per explant. Shoots were rooted in PGRs free MS medium with frequency of 77.78 % by 2.36 roots per explant.

Keywords: callus induction, *in vitro* regeneration, tissue culture, *celandine*.