مقاله پژوهشی، صفحات ۹۲-۷۷

اثر شرایط و محیط کشت برای کشت درون شیشه‌ای سه جنس از گیاه عدسک آبی بومی ایران به‌عنوان گیاهی با کاربردهای زیست فناوری

الهام تقی پور، نیما راد، صادق شجاعی، مهدی آرزومندی، فاطمه فروتن، سارا یعقوبی و علی هاتف سلمانیان*

ایران، تهران، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری، پژوهشکده زیست فناوری کشاورزی، گروه زیست فراورده های گیاهی

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۰۳/۱۲ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۰۷/۳۰

ONLINE FIRST

چکیده

عدسک آبی، کوچک‌ترین گیاه آبزی جهان با شش گونه در سطح تالاب‌های ایران پراکنده هستند. این گیاهان با خواص منحصربه‌فرد در رشد، محتوای پروتئینی و تغذیه‌ای به طور فزاینده‌ای برای کاربردهای زیست‌فناوری و امنیت غذایی موردتوجه قرار گرفته‌اند. بمنظور بهینه‌سازی کشت در شرایط کنترل شده، چهار محیط کشت هوگلند، MS، SH و NF استفاده شد و شاخص‌های نرخ رشد نسبی (RGR)، زمان دو برابر شدن فراند (DT) و تجمع زیست توده (BA) در سطح احتمال $P \leq ۰/۰۵$ مورد بررسی قرار گرفت. محیط مایع هوگلند با میانگین زمان دو برابر شدن فراندها هر ۲/۸ روز و دو برابر شدن زیست توده هر ۲/۱ روز برای گونه‌های *Lemna minor* و *Spirodela polyrhiza* و افزایش زیست توده هر ۱/۲ روز یکبار برای گونه‌ی خوراکی *Wolffia spp.* به عنوان بهترین محیط شناخته شد. نتایج نشان داد که محیط جامد MS در حضور تیمار هورمونی µM ۱۵ 2,4-D و µM ۷/۵ BAP و ۲٪ ساکارز، به طور معنی‌داری بیشترین درصد کالوس‌زایی را در جنس *Lemna* تحریک می‌کند. همچنین بیشترین درصد باززایی (۸۳٪) در حضور BAP با غلظت ۴µM و ۱٪ ساکارز به دست آمد. بنابراین عدسک آبی بومی ایران (*L. minor*) قابلیت کشت *in-vitro* و دستورزی در شرایط آزمایشگاه را داشته و با توجه به ارزش بالای غذایی می‌تواند به عنوان یک منبع پروتئین بالقوه به عنوان مکمل غذایی، خوراک دام و طیور و بویژه تولید پروتئین نوترکیب مورد بررسی قرار گیرد.

واژه های کلیدی: عدسک آبی، کشت بافت، نرخ رشد نسبی، لمنا مینور، امنیت غذایی

* نویسنده مسئول، تلفن: ۴۴۷۸۷۳۶۵-۰۲۱، پست الکترونیکی: salman@nigeb.ac.ir

مقدمه

عدسک آبی کوچکترین گیاه گلدار و آبزی جهان از خانواده‌ی تک لپه‌ای Lemnaceae، دارای سریع‌ترین نرخ رشد در میان گیاهان گلدار جهان می‌باشد. عدسک آبی با ۵ جنس و ۳۶ گونه در جهان طبقه بندی شده است (۶). از این تعداد، ۳ جنس *Spirodela Schleid., Lemna L.* و *Wolffia Horkel ex Schleid* و ۷ گونه تاکنون در ایران گزارش گردیده است (۲۲). این گیاهان با پراکنش بالای جغرافیایی عموماً در مناطق مرطوب و در تالاب‌هایی با آب‌های راکد یافت می‌شوند (۶). تکثیر غیرجنسی از ویژگی‌های منحصربه‌فرد عدسک آبی است که منجر به تولید نسل‌هایی با ژنتیک یکسان می‌گردد. این ویژگی موجب گردیده است که این گیاه به عنوان میزبان مناسبی برای بیان ژن های نوترکیب بدون نگرانی از انتقال ژن‌های نوترکیب به طبیعت مطرح شود. از طرف دیگر، تکثیر تصاعدی عدسک آبی منجر به افزایش نرخ تولید زیست توده می شود که در نتیجه می تواند نقش مهمی در کوتاه شدن چرخه تولید پروتئین های نوترکیب ایفا کند (۳۷). محتوای بالای پروتئینی گیاهان خانواده عدسک آبی (تا ۴۰

Proof Article

٪ وزن خشک در شرایط مساعد) و کیفیت بالای پروتئین از دیگر ویژگی‌های مورد توجه این خانواده است. پروفایل اسید آمینه در عدسک آبی شامل اسید آمینه‌های ضروری و غیر ضروری منطبق با توصیه سازمان خواربار و کشاورزی ملل متحد (Food and Agriculture Organization of the United Nations) می باشد (۳). از این رو، در مطالعات متعددی از عدسک آبی به عنوان یک سیستم بیانی مناسب برای پروتئین های نوترکیب دارویی همچون Interleukin-17B (۳۴)، واکسن هایی مثل Lamb برعلیه ویبریوز ماهیان (۱۶) و آنتی بادی های مونوکلونال (۱۰) و نیز بستری مناسب برای ایجاد تغییرات ژنتیکی هدف دار استفاده شده است (۳۶).

این گیاهان دارای قابلیت رشد و تکثیر در شرایط ساده و در مقیاس وسیع می باشند. بنابراین، می توانند به عنوان منبع یا مکمل غذایی برای انسان، دام، طیور و آبزیان محسوب شوند (۴ و ۱۹). بعلاوه عدسک آبی گیاهی غیر زراعی است بنابراین دخالت در رشد و تکثیر و تراریختی آن نمی تواند منجر به بحران های غذایی شود (۳۶). از گذشته های دور در بسیاری از کشورهای آسیایی از جمله مالزی و اندونزی از گونه ی فاقد ریشه *Wolffia* (با نام محلی *khai nam* به معنی تخم مرغ آبی) به عنوان منبع پروتئین در رژیم غذایی همراه با سالاد و برنج استفاده می گردید (۳). همچنین وجود ویژگی های تغذیه ای مطلوب، قابل مقایسه با سبزیجاتی همچون اسفناج و کلم، از جمله سطح بالای ویتامین A (۳۰-۱۰ mg در هر گرم وزن خشک) و E (۱۵ mg- ۰/۵ در هر گرم وزن خشک)، نسبت اسیدچرب امگا ۶ به ۳ مناسب (n-6/n-3 ≤ 1) که حاکی از غلبه اسیدهای چرب غیراشباع است، می تواند مؤید ظهور یک منبع غذایی جدید و مفید در آینده و در بحث امنیت غذایی در جهان باشد (۴، ۱۲، ۲۱ و ۲۶).

در مجموع، این ظرفیت های متنوع، عدسک آبی را به عنوان یک راکتور زیستی گیاهی، مورد توجه بسیاری از محققین قرار داده است. فاکتورهای رویشی از جمله مدت زمان دو برابر شدن (doubling time) و تولید زیست توده (biomass accumulation) کوتاه، نرخ رشد عدسک آبی را تا ۲۸ برابر سریعتر از گیاهان زراعی رایج قرار داده است (۲۷). این ویژگی ها می توانند منجر به تجمع زیست توده حداکثر تا ۱۰۰ تن ماده خشک در هکتار در سال شود (۷). از این رو برای استفاده ی هر چه موثرتر از ویژگی های عدسک آبی در زیست فناوری و نیز بحث امنیت غذایی لزوم دستیابی به تکثیر بهینه ضروری به نظر می رسد. از جمله عوامل مهم رسیدن به رشد و تکثیر مطلوب، محیط کشت مناسب است. با توجه به اهداف مختلف تحقیق، در گام اول تکثیر و کشت عدسک آبی در آزمایشگاه و در شرایط استریل (*in-vivo*) و یا در محیط طبیعی (غیر استریل) صورت می گیرد. تاکنون مطالعات بسیاری برای بهینه سازی محیط های کشت مایع برای تکثیر درون شیشه گونه های مختلف عدسک آبی در جهان صورت گرفته است (۵ و ۱۸). که از این میان، محیط هایی که به طور گسترده مورد استفاده قرار گرفته اند شامل محیط کشت هوگلند (۱۸)، شنک و هیلدبرانت (۳۰) و موراشیگ و اسکوگ است (۲۴). با گسترش مطالعات، محیط کشت های جدیدی با توجه به ویژگی های فیزیولوژیکی گونه های مختلف عدسک معرفی گردید. Muranaka و همکاران در سال ۲۰۱۵ از محیط کشت جدید NF برای گونه *Lemna gibba* استفاده کردند که در حفظ بافت آئرانشیمی برجسته ی زیر شبه برگ های (فراند) این گونه موثر بود (۲۳).

بهینه سازی در کشت بافت عدسک آبی می تواند گام دوم در راستای توسعه مسیرهای دستورزی این گیاهان در حوزه بیان ژن های نوترکیب باشد. عدسک آبی گیاهی تک لپه است، لذا به سادگی با اگروباکتریوم و به صورت مستقیم مورد تراریختی قرار نمی گیرد. برای حل این مشکل و از اواسط دهه ۷۰ میلادی، تلاش های متعددی برای بهینه سازی کشت بافت این گیاهان از جمله ایجاد

Proof Article

کالوس و باززایی برای تسهیل در مهندسی ژنتیک انجام شده است (۳۲). در این بررسی ها تیمارهای مختلف هورمون اکسین و سیتوکینین در محیط کشت های متفاوت مورد بررسی قرار گرفتند (۳۷). در این میان، شرایط کشت بافت برای گونه های مختلف عدسک آبی نیز متغیر است. Chhabra و همکاران برای القای کالوس از فرانده‌های کامل گونه *L. minor* از غلظت های ۵ میکرومولار ۴،۲-دی کلروفنوکسی استیک (2،4-D) و ۵۰ میکرومولار (2-IP) N6-(2-Isopentenyl) adenine (یا ۵ میکرومولار TDZ) در محیط B5 و در حضور نور استفاده کرد (۹). درحالیکه مطالعات Chang و Chiu در سال ۱۹۷۸ بر روی گونه ی *L. gibba* نشان داد که ترکیب 2-IP (۱ میلی گرم در لیتر) و 2،4-D (۱۰ میلی گرم در لیتر) به طور موثر باعث ایجاد کالوس و افزودن ایندول استیک اسید (۴ میلی‌گرم در لیتر) و کاینتین (۱ میلی‌گرم در لیتر) به طور موفقیت‌آمیزی باعث باززایی فراندها می شود (۸).

با توجه به پراکنش بالای گونه‌های بومی عدسک آبی در ایران، پژوهش حاضر با هدف بهینه سازی و راه اندازی کشت در شیشه این گیاهان در آزمایشگاه (*in-vitro*) با سنجش ۴ محیط کشت مایع مختلف برای تکثیر بهینه ی گیاهان و سپس راه اندازی کشت بافت با بررسی تیمارهای مختلف هورمونی در کالوس زایی و باززایی در راستای تسهیل دستورزی های ژنتیکی عدسک آبی برای اولین بار بر روی یکی از عدسک‌های بومی ایران صورت گرفت. در گام اول استریل سازی و سپس یافتن محیط کشت مناسب برای سه جنس و گونهٔ گسترده عدسک آبی یعنی *Lemna minor*، *Spirodela polyrhiza* و *Wolffia spp.* با بررسی شاخص‌های رویشی DT، BA و RGR مورد بررسی قرار گرفت. سپس گونهٔ *L. minor* به واسطه ی پراکنش بالای جغرافیایی و نیز گستردگی مطالعات در زمینه های مختلف به نسبت سایر گونه ها به عنوان گونه مناسب برای دستورزی و انتقال ژن انتخاب شده و بهینه سازی کشت بافت برای آن انجام گرفت.

مواد و روشها

جمع آوری نمونه و استریل سازی: سه جنس و گونهٔ مختلف عدسک آبی (*Lemna minor*، *Spirodela polyrhiza* و *Wolffia spp.*) از تالاب‌های طبیعی شمال ایران (استان‌های مازندران و گیلان) جمع آوری شد. ابتدا عدسک‌های آبی با آب شهری تمیز شسته شدند و سپس با استفاده از محلول هیپوکلریت سدیم ۲/۵ درصد به مدت ۱ دقیقه استریل شدند. نمونه‌ها سه بار با آب مقطر استریل شسته شدند. برای بررسی زنده‌مانی و قدرت تکثیر اولیهٔ عدسک‌ها از محیط کشت رایج موراشیگ و اسکوگ (MS) 1X در حضور ۱٪ ساکارز درون شیشه‌های کوچک با درب شفاف و قابل اتوکلاو استفاده گردید. با توجه به تکثیر غیرجنسی این گیاهان و برای اطمینان از یکسان بودن کلون‌های یک گونه، پس از استریل سازی، هر فراند (ساختارهای شبه برگ-ساقه) داخل یک شیشه مجزا تکثیر گردید. نمونه‌ها در شرایط استاندارد اتاق کشت با دوره نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی تحت شدت نور ۸۰ $mmol/m^2/s$ (مهتابی‌های فلورسنت (40W) پارس شهاب، تهران، ایران) در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد قرار گرفتند.

شناسایی محیط کشت بهینه بر اساس فاکتورهای رویشی استاندارد: چهار محیط کشت رایج و پر مصرف موراشیگ و اسکوگ (MS)، هوگلند، شنک و هیلدبرانت (SH) و NF با هدف افزایش نرخ تکثیر جنس‌های مختلف عدسک آبی از جمله *Lemna minor*، *Spirodela polyrhiza* و *Wolffia spp.* انتخاب گردید. ترکیب عناصر معدنی آنها در جدول ۱ ارائه شده است. همه محیط ها حاوی ۱۰٪ ساکارز به عنوان منبع کربن بودند و pH محیط ها نیز بر روی ۵/۸ تنظیم شد. از هر سه جنس عدسک آبی تعداد ۲۰ عدد فراند کامل داخل شیشه های حاوی ۵۰ میلی لیتر از این ۴ محیط کشت تلقیح شدند. فراندهای هر گونه با تعداد و وزن مشابه، در سه تکرار بصورت مستقل در شرایط

Proof of Article

استاندارد اتاق کشت و در محیط کاملاً استریل قرار گرفتند. طبق روش استاندارد ISO 20079 مدت زمان آزمایش ۷ روز در نظر گرفته شد (۲۵). در این مدت اطمینان حاصل گردید که فرانداهای عدسک آبی برای پوشاندن سطح محیط با یکدیگر دچار رقابت و محدودیت تکثیر نمی گردند. شاخص های رشد از جمله تعداد و وزن فرانداها در روز اول (t_0) و روز ۷ ام (t_7) ثبت گردید. فاکتورهای رشد استاندارد از قبیل نرخ رشد نسبی (relative growth rate)، سرعت دوبرابر شدن تعداد فراند (DT) و سرعت دوبرابر شدن زیست توده بر حسب وزن فرانداها (BA) از طریق فرمول های استاندارد ۱ و ۲ بر طبق پروتکل سلمانیان و همکاران (۲۰۲۲) محاسبه گردید (۳۳).

$$RGR = (\ln x_{t7} - \ln x_{t0}) / (t7 - t0) \quad (۱)$$

$$(BA) \text{ or } DT = \ln 2 / RGR \quad (۲)$$

در این فرمول ها x_{t0} به معنی تعداد فراند اولیه یا وزن فراند اولیه در آغاز آزمایش و x_{t7} به معنی تعداد فراند یا وزن فراند ها پس از ۷ روز در پایان آزمایش می باشد.

بهینه‌سازی کشت بافت عدسک آبی

القای کالوس: بمنظور یافتن غلظت‌های بهینه‌ی هورمون-های اکسین و سیتوکینین برای القای کالوس از فراند کامل عدسک آبی از گونهٔ شاخص *L. minor* استفاده گردید. فرانداها در محیط MS جامد حاوی ۰/۸٪ آگار (pH ۵/۸) و در حضور غلظت‌های مختلف هورمون ۲،۴ دی کلروفنوکسی استیک اسید (2,4-D) به عنوان اکسین و هورمون بنزیل دی آمینو پورین (BAP) به عنوان سیتوکینین طبق جدول ۲ برگرفته از مرور منابع مختلف (۸، ۳۰ و ۳۲) قرار گرفتند. همچنین سه تیمار مختلف از ساکارز (۱٪، ۲٪ و ۳٪) نیز در این محیط‌ها مورد ارزیابی قرار گرفت. همه غلظت‌ها در سه تکرار در پلیت‌های شیشه‌ای استریل و در شرایط استاندارد اتاق کشت تحت نور ملایم ($mmol/m^2/s$ ۴۰) قرار گرفتند. محیط‌ها هر دو هفته یکبار تازه سازی گردید.

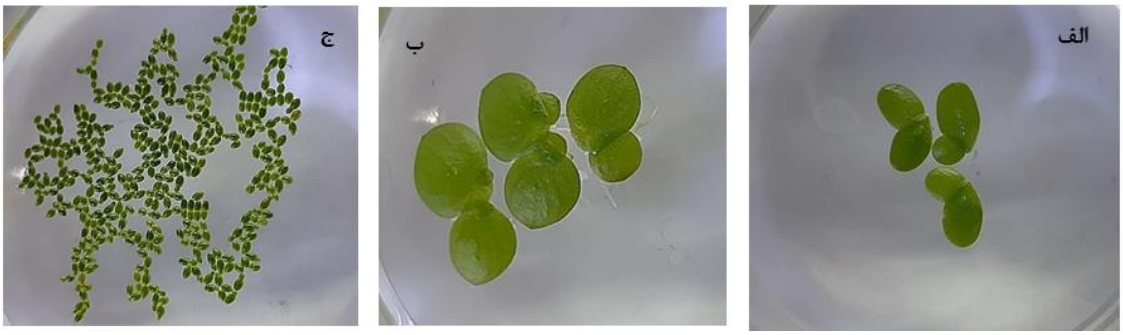
باززایی فراند: بمنظور بهینه سازی باززایی فرانداها از کالوس‌های ایجاد شده، غلظت‌های ۲، ۴، ۶، ۸ و ۱۰ ماکرومولار از هورمون BAP در محیط MS جامد حاوی ۰/۸٪ آگار و سه غلظت ساکارز (۱٪، ۲٪ و ۳٪) مورد ارزیابی قرار گرفت. هر غلظت در سه تکرار در پلیت‌های شیشه‌ای حاوی ۱۰ عدد کالوس بر روی محیط کاملاً استریل انجام گرفت. پلیت‌ها در شرایط استاندارد اتاق کشت و به مدت ۴ هفته در تاریکی و ۸ الی ۱۰ هفته در روشنایی قرار گرفتند. محیط‌ها در ۸ هفته اول هر دو هفته یکبار تازه سازی گردید. برای ریشه زایی نیز از هورمون نفتالین استیک اسید (NAA) با غلظت ۶ µM در محیط MS جامد حاوی ۰/۸٪ آگار و ۱۰٪ ساکارز استفاده گردید. فرانداهای باززا شده به مدت دو هفته در بر روی این محیط و در شرایط تاریکی قرار گرفتند.

آنالیز داده‌ها: تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها توسط آزمون فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با استفاده از نرم افزار SPSS 20 انجام شد. مقایسه تغییرات میانگین‌ها در بین گروه‌ها با استفاده از روش ANOVA یک طرفه بررسی شد. تفاوت در میانگین‌ها با استفاده از آزمون دانکن در سطح احتمال $P \leq ۰/۰۵$ مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

نتایج

بهینه سازی محیط کشت مایع بر اساس شاخص‌های رویشی (RGR، DT و BA): نتایج تحقیقات قبلی ما در شناسایی گونه های عدسک آبی با استفاده از مارکرهای استاندارد بین المللی نشان داد که عدسک های آبی مورد مطالعه (شکل ۱) متعلق به سه جنس و گونه ی *Lemna minor*، *Spirodela polyrhiza* و *Wolffia spp.* می باشند (۳۳).

Preprint Article



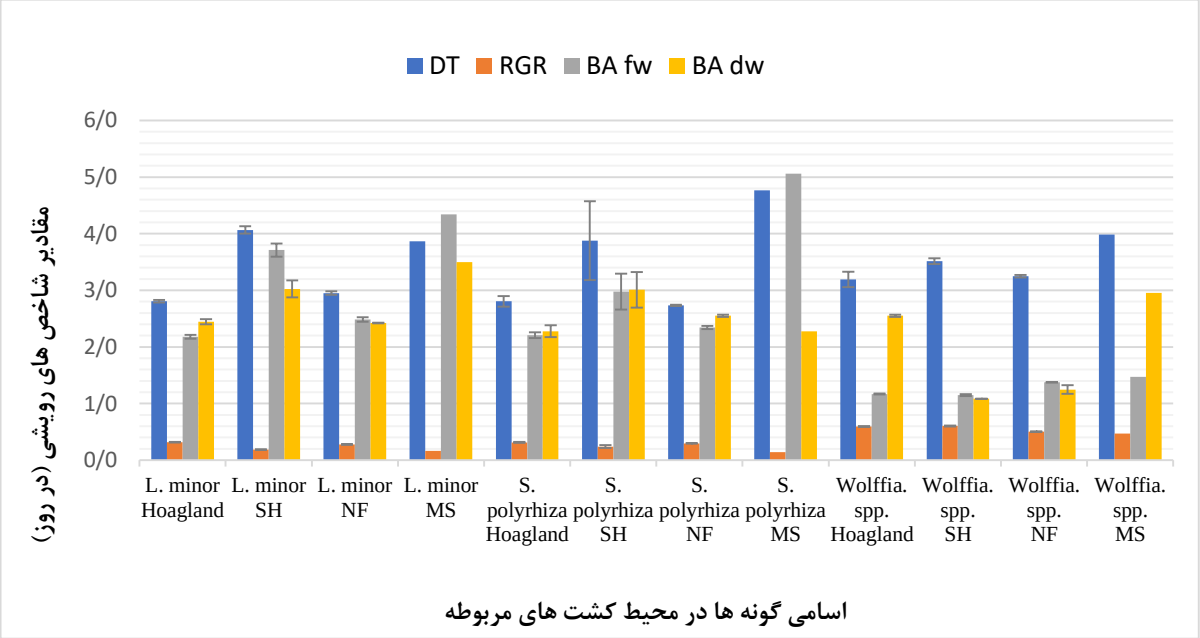
شکل ۱- عدسک‌های آبی مورد استفاده در بهینه‌سازی محیط کشت مایع. الف) *Lemna minor* ب) *Spirodela polyrhiza* ج) *Wolffia spp.*

از بین محیط‌های کشت مختلف (جدول ۱)، محیط هوگلند با RGR برابر ۰/۳۱۸ (فاقد واحد)، DT معادل ۲/۸ روز (مدت زمان دوبرابر شدن فراندها معادل ۲/۸ روز است) و BA معادل ۲/۲ روز (مدت زمان دو برابر شدن زیست توده تر معادل ۲/۲ روز) بهترین محیط برای تکثیر رویشی گونه *L. minor* شناسایی شد. تفاوت محیط کشت NF با هوگلند معنی دار نبود. علاوه بر آن اختلاف معنی داری برای شاخص‌های رویشی گونهٔ *S. polyrhiza* و *L. minor* در محیط هوگلند و NF مشاهده نشد. برای جنس *Wolffia spp* در هر سه محیط هوگلند، SH و NF مدت زمان دوبرابر شدن فراندها (DT) بترتیب ۳/۲، ۳/۵ و ۳/۳ روز ارزیابی شد. مدت زمان دوبرابر شدن زیست توده تر این جنس بترتیب ۱/۲، ۱/۴ و ۱/۱ روز بود. در این میان محیط کشت MS به طور معنی داری، کمترین بهره وری را برای کشت مایع هر سه گونهٔ عدسک آبی نشان می‌دهد. نتایج وزن خشک نیز مشابه داده‌های شاخص وزن تر بود. (نمودار ۱).

جدول ۱- ترکیب محیط کشت‌های مورد استفاده طبق دستورالعمل مولفین

Components	**NF**	**Schenk & Hildebrandt (SH)**	**Hoagland**	**Murashige & Skoog (MS)**
Macronutrients (mM)				
Potassium nitrate	5	12.5	2.5	18.7
Ammonium nitrate	-	-	-	20.62
Ammoniun phosphate monobasic	-	1.3	-	-
Calcium chloride (di-hydrate)	2.7	0.65	-	3
Calcium nitrate·4 H2O	-	-	2.3	-
Magnesium sulfate (hepta hydrate)	1.2	0.81	1	1.5
Potassium phosphate monobasic	1	-	-	-
Potassium dihydrogen phosphate	-	-	0.5	1.25
Micronutrients (µM)				
Boric acid	46	40.4	23.12	100
Manganese (II) chloride-dihydrate	18	-	4.6	-
Cobalt chloride·6 H2O	-	0.21	-	0.1
Cupric sulfate·5 H2O	0.32	0.4	0.18	-
Manganese sulfate·H2O	-	33	-	112
Molybdic acid (sodium salt) ·2 H2O	0.49	0.24	0.21	1.2
Potassium iodide	-	3	-	5
Zinc sulfate·7 H2O	0.77	1.7	0.38	29
EDTA acid, Na2·2 H2O	54	54	54	54
Ferrous sulfate·7 H2O	36	36	36	36
Organics (%)				
Sucrose	10	10	10	10

Preproof Article



نمودار ۱- نمودار ترکیبی تاثیر چهار محیط کشت MS، هوگلند، SH و NF بر شاخص‌های رویشی شاخص‌های رویشی (DT، BA و RGR) سه گونه ی مختلف عدسک آبی

کالوس زایی: از ۹ تیمار هورمونی استفاده شده برای القای کالوس در گونهٔ *L. minor* و سه غلظت مختلف ساکارز (۱٪، ۲٪ و ۳٪) در محیط MS، تیمار هورمونی با غلظت ۱۵ µM 2,4-D و ۷/۵ µM BAP در حضور ۲٪ ساکارز به طور معنی داری بیشترین درصد کالوس زایی (۸۳٪) را دارا بود. همچنین تیمار ۲۰ µM 2,4-D و ۱۰ µM BAP در حضور ۲٪ ساکارز با ۶۰٪ کالوس زایی در رتبهٔ بعدی القای کالوس قرار گرفت (جدول ۲).

کالوس‌ها از ناحیه مریستمی و در سطح شکمی فراندها تولید شده و به صورت گره‌های نرم تا تقریباً سفت و به رنگ سبز روشن یا زرد قابل مشاهده بودند (شکل ۲).

جدول ۲- اثر غلظت های مختلف 2,4-D و BAP در حضور ساکارز ۲٪ بر القای کالوس در گیاه عدسک آبی (*L. minor*)

درصد کالوس زایی (٪)	BAP (µM)	2,4-D (µM)
۰	۰,۵	۱
۱۹	۱	۲
۲۲	۲/۵	۵
۳۳	۵	۱۰
۸۳	۷/۵	۱۵
۶۰	۱۰	۲۰
۲۴	۱۲/۵	۲۵
۴	۱۷/۵	۳۵
۰	۲۲/۵	۴۵

Preprint Article

شکل ۲- کالوس زایی در تیمار هورمونی با غلظت 2,4-D ۱۵ µM و BAP ۷/۵ µM در گیاه عدسک آبی (*L. minor*)

نتایج حاصل از تجزیه واریانس در قالب طرح فاکتوریل کاملا تصادفی نشان داد که اختلاف معنی داری در سطح احتمال ۹۵٪ بین تیمارهای هورمونی و درصد کالوس زایی وجود داشت (جدول ۳). همچنین نتایج حاصل از تجزیه واریانس اثر متقابل تیمارهای هورمونی و غلظت های ساکارز به کار رفته در کالوس زایی اختلاف معنی دار در سطح احتمال ۹۵٪ را نشان داد (جدول ۳).

سرعت ظاهر شدن کالوس‌ها در تیمار هورمونی با غلظت 2,4-D ۱۵ µM و BAP ۷/۵ µM بیشتر از تیمار ۲۰ µM 2,4-D و BAP ۱۰ µM بود. اولین گره‌های کالوس در بازه زمانی یک ماهه ظاهر شده و حداکثر طی دو ماه رشد آنها تکمیل می‌شود.

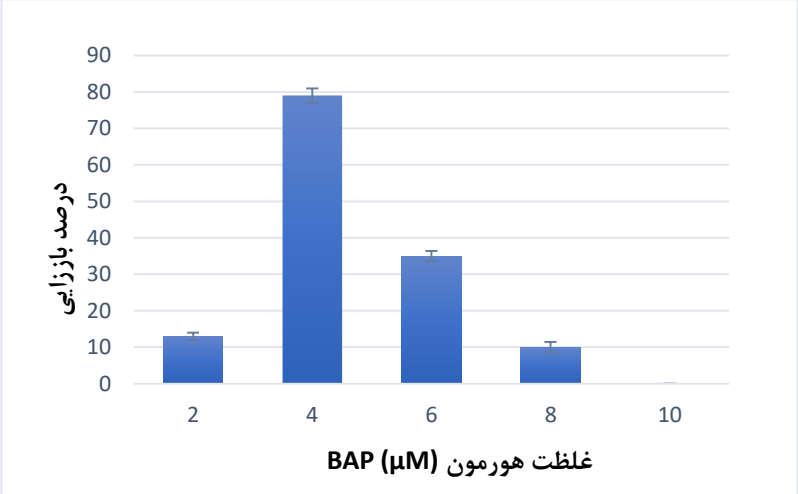
جدول ۳- تجزیه واریانس داده‌های مربوط به غلظت‌های مختلف تیمار هورمونی بر درصد کالوس زایی و باززایی عدسک آبی (*L. minor*)

منبع تغییر	درجه آزادی کالوس زایی	میانگین مربعات درصد کالوس زایی	درجه آزادی باززایی	میانگین مربعات درصد باززایی
غلظت های مختلف هورمونی	۸	۴۷۱۱/۱۱۴*	۴	۴۹۷۵/۷۷*
غلظت های مختلف ساکارز	۲	۵۰۳/۰۴۹*	۲	۵۷۲/۰۲۲*
اثر متقابل هورمون و ساکارز	۱۶	۱۵۸/۶۴۷*	۸	۱۶۹/۱۶۱*
خطا	۵۴	۷۷	۳۰	۵۵

* تفاوت معنی دار در سطح احتمال ۰/۰۵ درصد

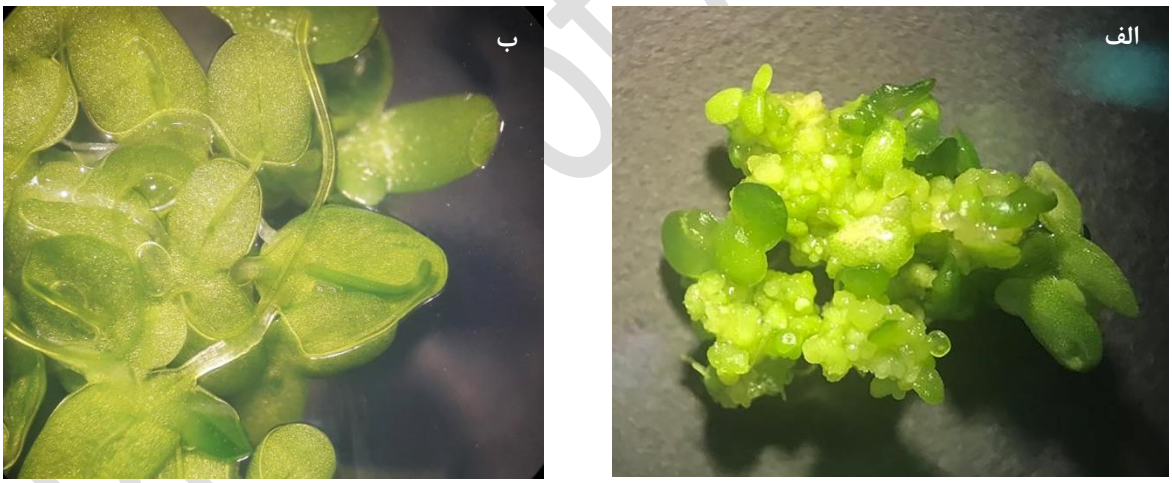
باززایی: از بین تیمارهای مختلف هورمون BAP و در حضور سه غلظت ساکارز (۱٪، ۲٪ و ۳٪)، تیمار ۴µM BAP درحضور ۱٪ ساکارز با درصد باززایی ۷۹٪ بیشترین بازدهی را در سطح معنی داری ۰/۰۵ درصد نشان داد. با افزایش غلظت هورمون، نتایج باززایی کاهش یافته و در تیمار BAP ۱۰µM نمونهٔ باززا شده‌ای قابل مشاهده نبود (نمودار ۲). نتایج حاصل از تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که اختلاف معنی داری در سطح احتمال ۹۵٪ بین تیمارهای هورمونی و درصد باززایی وجود داشت (جدول ۳).

Preprint of Article



نمودار ۲- اثر غلظت‌های مختلف هورمون BAP بر درصد باززایی کالوس‌های گیاه عدسک آبی (*L. minor*)

آغاز باززایی فرانداها از کالوس ها، پس از ۴ هفته شرایط تاریکی و سپس ۶ الی ۸ هفته نور ملایم اتاق کشت قابل مشاهده بود. فرانداهای باززا شده کاملا مشابه فراند مادری بودند (شکل ۳ الف). بمنظور ریشه زایی فرانداهای باززا شده، از محیط حاوی هورمون ریشه زایی NAA با غلظت ۶µM و در شرایط تاریکی استفاده گردید. پس از ۲ هفته ریشه ها از سطح شکمی و ناحیه ی مریستمی فرانداها ظاهر گردید (شکل ۳ ب).



شکل ۳- باززایی فراند های جدید و مشابه فراند مادری در عدسک آبی (*L. minor*). الف. فرانداهای باززا شده در غلظت ۴µM BAP از کالوس. ب. ریشه‌های ظاهر شده از سطح شکمی و ناحیه مریستمی فرانداهای باززا شد در حضور NAA

بحث

یافتن محیط کشت مطلوب بمنظور تکثیر بهینهٔ عدسک آبی با اهداف خوراکی و زیست فناوری از اهمیت بالایی برخوردار است. علاوه بر آن دستورزی این گیاهان مستلزم یافتن شرایط بهینهٔ کشت بافت برای تکثیر پایدار و عاری از میکروب این گیاهان در آزمایشگاه می‌باشد. بدین منظور توانایی تکثیر عدسک آبی بومی ایران از سه جنس مختلف *Lemna minor* و *Spirodela polyrhiza* و *Wolffia spp.* و در چهار محیط کشت متفاوت (هوگلند، SH، MS و NF) مورد ارزیابی قرار گرفت. از این بین محیط کشت مایع هوگلند نتایج بهتری در شاخص‌های رویشی در هر سه جنس عدسک آبی ایجاد نمود. بیشترین سرعت تکثیر از نظر نرخ دوبرابر شدن (DT) و نیز افزایش زیست توده

(BA) در محیط کشت هوگلند و در گونهٔ *L. minor* و *S. polyrhiza* مشاهده شد. این درحالی است که محیط کشت هوگلند حاوی غلظت‌های کمتری از عناصر ضروری ماکرو و میکرو نسبت به سه محیط دیگر است. از طرف دیگر، حضور کلسیم نیترات به عنوان منبع نیتروژن و کلسیم از دیگر مزایای محیط کشت هوگلند است. Walsh و همکاران در سال ۲۰۲۱ نشان دادند که افزودن کلسیم به محیط کشت پایه و بر قراری نسبت کلسیم به منیزیم بیشتر می‌تواند برای تکثیر موثرتر عدسک آبی ضروری باشد. همچنین آن‌ها اثبات کردند که نسبت‌های رقیق‌تری از محیط کشت می‌تواند بر کارایی جذب عناصر در عدسک آبی موثر باشد (۳۵). از طرف دیگر بالاترین سرعت افزایش زیست توده (هر ۱/۲ روز یکبار) به طور مشترک در هر سه محیط هوگلند، NF و SH در جنس *wolffia spp.* مشاهده شد. این انباشت سریع‌تر زیست توده در گونه *Wolffia* spp در مقایسه با سایر گونه‌ها، علی رغم اندازهٔ کوچک‌تر گونهٔ *Wollfia*، می‌تواند به دلیل زیست تودهٔ متراکم‌تر آن‌ها باشد. در این میان محیط کشت MS ۱X با بالاترین غلظت عناصر کمترین بهره وری را در تکثیر عدسک‌های آبی مورد مطالعه داشته است. به نظر می‌رسد که در محیط‌های مایع بدلیل دسترسی راحت‌تر ریزمغذی‌ها برای ریشهٔ گیاه عوارضی نظیر بیش مصرفی و بازدارندگی رشد طولی در ریشه‌ها بیشتر مشاهده می‌شود. در مطالعه Sidal و Ergonul در سال ۲۰۲۱ نیز محیط کشت MS ۱/۴ در مقایسه با MS ۱/۲ و X۱ بیشترین بازدهی را در تکثیر *L. minor* داشته است که با نتایج بررسی حاضر همخوانی داشت (۱۳).

از طرف دیگر طبق مطالعات متعدد در زمینه بهینه سازی کشت بافت عدسک آبی، بیشترین بازدهی در تشکیل کالوس و باززایی عدسک آبی در محیط کشت جامد MS صورت گرفته است (۳۷). در غالب بررسی‌های صورت گرفته از اثر متقابل هورمون‌های TDZ با 2,4-D یا 2,4-D با سایر سیتوکینین‌ها بمنظور القای کالوس در عدسک آبی استفاده شده است (۳۶). این تعادل هورمونی با اکسین‌ها و سیتوکینین‌های داخلی گیاه نیز باید برقرار گردد (۲۰). گونه‌های مختلف عدسک آبی پاسخ‌های متفاوتی نسبت به غلظت‌های هورمون‌های ذکر شده دارند (۳۷). در مطالعه حاضر بر روی گونهٔ بومی *L. minor*، بهترین تیمار جهت القای کالوس در نسبت دو به یک هورمون اکسین به سیتوکینین و در تعادل هورمونی 2,4-D ۱۵ µM و ۷/۵ µM BAP و در نور کم مشاهده شد. در تیمارهای با غلظت‌های بالاتر، فراندها سفید شدند که نشان دهندهٔ عدم تحمل بافت به مقادیر بالاتر هورمون‌های اکسین و سیتوکینین است. نقش اکسین‌ها و سیتوکینین‌ها در تشکیل کالوس به واسطه فعال سازی عوامل تنظیمی مرتبط با شروع کالوس زایی و نیز القای تقسیم و تکثیر سلولی به اثبات رسیده است (۲۰). همچنین اعتقاد بر این است که سیتوکینین‌ها با کاهش چوبی شدن دیواره سلولی (Lignifications) تشکیل کالوس را تسهیل می‌کنند (۱۷). در ادامه، قدرت باززایی کالوس‌های ایجاد شده در محیط MS جامد و با استفاده از تیمار هورمونی BAP به تنهایی عملکرد مناسبی داشت. در مطالعه Yang و همکاران در سال ۲۰۲۱، پیرو بررسی مکانیسم مولکولی تنظیم باززایی در عدسک آبی به عنوان یک گیاه مدل تک لپه‌ای، نشان داده شد که ژن‌های مرتبط با بیان اکسین در کالوس‌های در حال باززایی به طور معنی داری دچار تنظیم منفی (Down-regulating) می‌شوند. در عوض ژن‌های مسیر تولید سیتوکینین‌ها در مرحله باززایی دچار تنظیم مثبت (up-regulating) شدند (۳۷). القای باززایی کامل پس از اعمال تیمار روشنایی به کالوس‌ها صورت گرفت. از نشانه‌های شروع باززایی سبزتر شدن رنگ توده‌های کالوس‌ها در نتیجهٔ انباشت کلروفیل است. از طرف دیگر باززایی در حضور غلظت‌های کم سوکروز (۱٪) به عنوان منبع کربن به طور معنی داری بیشتر از سوکروز ۲ و ۳ درصد بود. این نتیجه با مطالعه Frick (۱۹۹۱) بر روی عدسک آبی گونهٔ *L. minor* همخوانی دارد. این محقق نشان داده بود که در شرایط درون شیشه

Proof of Article

(*in-vitro*) سوکروز می‌تواند انباشت کلروفیل را مهار کند. در غیاب منبع کربن یا در غلظت‌های کم سوکروزِ محیط و در حضور نور، تجمع کلروفیل به عنوان پیش برندهٔ مسیرهای فتوسنتزی صورت می‌گیرد. (۱۴)، این فرایند می‌تواند تنظیم کنندهٔ مورفوژنز گیاه و به واسطه تحریک گیرنده‌های نوری مختلف توسط فوتون‌های نوری باشند (۱۱). بعلاوه، تاثیر هورمون NAA در ریشه زایی گیاهان مختلف در مطالعات متعددی به اثبات رسیده است (۱، ۲ و ۲۹)، که با نتایج این تحقیق در ریشه زایی ۱۰۰ درصدی فراندهای باززا شده در حضور هورمون NAA در محیط MS ۱/۲ و در شرایط تاریکی مطابقت دارد. تمام فراندهای باززا شده، به لحاظ ریخت شناسی مشابه فراند مادری بودند و زنده‌مانی فراندهای باززا شده در محیط کشت مایع ۱۰۰ درصد مشاهده شد.

نتیجه گیری

تکثیر بهینهٔ عدسک آبی در محیط مایع بمنظور حفظ پایدار زیست توده، محیط‌های کشت مختلف و عملکرد هر یک از آن‌ها در افزایش رشد و تکثیر و یا افزایش ریزمغذی‌ها و پروتئین در گیاه می‌توانند مورد بررسی و انتخاب قرار گیرند (۱۸). نتایج ما نشان دادکه محیط مایع هوگلند محیط ترجیحی برای تکثیر اکثر گونه‌های عدسک آبی در شرایط درون شیشه می‌باشد. از طرف دیگر بهینه سازی کشت بافت عدسک آبی می‌تواند تسهیل گر مسیرهای انتقال ژن به این گیاهان مدل تک لپه‌ای باشد که از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. نتایج این بررسی برای اولین بار بر روی گونه‌های بومی عدسک آبی ایران، علاوه بر فراهم کردن اطلاعات در خصوص تأثیر عوامل شیمیایی (از قبیل هورمون‌ها) و فیزیکی (از قبیل نور) روی پتانسیل کالوس زایی و باززایی نمونه‌های عدسک آبی، یک سیستم کارآمد در باززایی کامل و تکثیر رویشی بهینهٔ این گیاهان معرفی می‌کند که می‌تواند در برنامه‌های اصلاح مولکولی از طریق مهندسی ژنتیک مورد استفاده قرار گیرد.

تقدیر و تشکر

این طرح با حمایت مالی مرکز مطالعات و همکاری‌های بین المللی، وزارت علوم، تحقیقات و فناوری به شماره ۹۹۰۱۶۰ و پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری (از طریق طرح‌های ۷۱۴، ۷۸۴ و ۸۳۱) انجام شده است.

منابع

۱- بلندی ا.، حمیدی ح.، رضا قلی ع. (۱۳۹۵). تأثیر محیط کشت و هورمون بر تکثیر پایه های رویشیGF677 در کشت درون شیشه ای. مجله پژوهشهای گیاهی (مجله زیست شناسی ایران)(علمی)، ۲۹(۱)، ۱۴-۱.

۲- نجاریان کرمانی ن.، پارسائیان م.، قسیمی حق ز. (۱۴۰۳). ریزازدیادی گیاه *Haworthia attenuatae* با استفاده از کینتین و بنزیل‌آمینوپورین به همراه نفتالین‌استیک‌اسید. مجله پژوهشهای گیاهی (مجله زیست شناسی ایران)(علمی)، ۳۷(۲)، ۱۸۴-۱۶۸.

3- Appenroth, K. J., Sree, K. S., Bog, M., Ecker, J., Seeliger, C., Böhm, V., ... & Jahreis, G. (2018). Nutritional value of the duckweed species of the genus *Wolffia* (Lemnaceae) as human food. Frontiers in chemistry, 6, 483.

4- Appenroth, K. J., Sree, K. S., Böhm, V., Hammann, S., Vetter, W., Leiterer, M., & Jahreis, G. (2017). Nutritional value of duckweeds (Lemnaceae) as human food. Food chemistry, 217, 266-273.

5- Baek, G., M. Saeed and H.-K. Choi (2021). "Duckweeds: their utilization, metabolites and cultivation." Applied Biological Chemistry 64(1): 1-15.

6- Bog, M., K. J. Appenroth and K. S. Sree (2019). "Duckweed (Lemnaceae): Its Molecular Taxonomy." Frontiers in Sustainable Food Systems.3, 117.

7- Cao, H. X., P. Fourounjian and W. Wang (2018). "The importance and potential of duckweeds as a model and crop plant for biomass-based applications and beyond." Handbook of environmental materials management.

Preproof Article

8- Chang, W.-C. and P.-L. Chiu (1978). "Regeneration of *Lemna gibba* G 3 through Callus Culture." Zeitschrift für Pflanzenphysiologie 89(1): 91-94.

9- Chhabra, G., Chaudhary, D., Sainger, M., & Jaiwal, P. K. (2011). Genetic transformation of Indian isolate of *Lemna minor* mediated by *Agrobacterium tumefaciens* and recovery of transgenic plants. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, *17*, 129-136.

10- Dickey, L. F., Gasdaska, J. R., Cox, K. M., Peele, C. G., & Spencer, D. (2009). Expression of monoclonal antibodies in duckweed. United States Patent US7632983B2.

11- Dutta Gupta, S., & Agarwal, A. (2017). Influence of LED lighting on in vitro plant regeneration and associated cellular redox balance. Light emitting diodes for agriculture: smart lighting, 273-303.

12- Edelman, M. and M. Colt (2016). "Nutrient value of leaf vs. seed." Frontiers in chemistry 4: 32.

13- Ergönül, z., and Sidal, u. (2021). In vitro micropropagation of duckweed (*Lemna minor*) plant with temporary immersion system bioreactors. Celal Bayar University Journal of Science, 17(3), 325-335.

14- Frick, H. (1991). Callogenesis and carbohydrate utilization in *Lemna minor*. Journal of plant physiology, 137(4), 397-401.

15- Hasan, M. R. and C. Rina (2009). Use of algae and aquatic macrophytes as feed in small-scale aquaculture: a review, Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). FAO Fisheries and Aquaculture Technical Paper, No. 531, vii + 123 pp. ref. many

16- Heenatigala, P. P. M., Sun, Z., Yang, J., Zhao, X., & Hou, H. (2020). Expression of LamB vaccine antigen in *Wolffia globosa* (duckweed) against fish vibriosis. Frontiers in Immunology, 11, 549611.

17- Hoque A., Nahar A., Razvy M.A., et al. Micropropagation of water chestnut (*Trapa* sp.) through local varieties of Rajshahi division. Asian J. Plant Sci. 2006;5(3):409–413.

18- Khvatkov, P., Chernobrovkina, M., Okuneva, A., & Dolgov, S. (2019). Creation of culture media for efficient duckweeds micropropagation (*Wolffia arrhiza* and *Lemna minor*) using artificial mathematical optimization models. Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC), 136, 85-100.

19- Kumar, G., Sharma, J., Goswami, R. K., Shrivastav, A. K., Tocher, D. R., Kumar, N., & Chakrabarti, R. (2022). Freshwater macrophytes: A potential source of minerals and fatty acids for fish, poultry, and livestock. Frontiers in nutrition, 9, 869425.

20- Mayerni, R., B. Satria, D.K. Wardhani, and S.R.O.S. Chan. Effect of auxin (2, 4-D) and cytokinin (BAP) in callus induction of local patchouli plants (*Pogostemon cablin* Benth.). in IOP Conference Series: Earth and Environmental Science. 2020. IOP Publishing.

21- Mes, J. J., Esser, D., Somhorst, D., Oosterink, E., van der Haar, S., Ummels, M., ... & van der Meer, I. M. (2022). Daily intake of *Lemna minor* or spinach as vegetable does not show significant difference on health parameters and taste preference. Plant Foods for Human Nutrition, 77(1), 121-127.

22- Mozaffarian, V. (1996). A dictionary of Iranian plant names. Tehran: Farhang Moaser, 396(2), 396-398.

23- Muranaka, T., et al. (2015). "Characterisation of circadian rhythms of various duckweeds." Plant biology 17: 66-74.

24- Murashige, T., & Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia plantarum*, *15*(3).

25- Naumann B., Eberius M., Appenroth K.-J. (2007). Growth rate-based dose-response relationships and EC-values of ten heavy metals using the duckweed growth inhibition test (ISO 20079) with *Lemna minor* L. clone St. Journal of Plant Physiology, 164, 1656–1664.

26- Pagliuso, D., et al. (2022). "Duckweeds as promising food feedstocks globally." Agronomy 12(4): 796.

27- Polutchko, S. K., Stewart, J. J., McNamara, M., Doherty Garcia, N., López-Pozo, M., Adams III, W. W., & Demmig-Adams, B. (2022). *Lemna* as a sustainable, highly nutritious crop: Nutrient production in different light environments. Nutraceuticals, 2(4), 350-364.

28- Saengthongpinit, W., Sricharoen, B., & Krangpreecha, M. (2017). Effect of blanching in sodium chloride solution on phenolic content and antioxidant activity of water meal (*Wolffia globosa*). In *55*. Kasetsart University Annual Conference, Bangkok (Thailand), 31 Jan-3 Feb 2017.

29- Sarihan, E.O., Khawar, M.D., and Özcan, S., 2005. Prolific adventitious shoot regeneration

Proof Article

from black psyllium (*Plantago afra* L.). Gen., Appl. Plant Physiol., 31(1-2), PP: 81-87.

30- Schenk, R. U. and A. Hildebrandt (1972). "Medium and techniques for induction and growth of monocotyledonous and dicotyledonous plant cell cultures." Canadian journal of botany 50(1): 199-204.

31- Stefaniak, B., Woźny, A., & Budna, I. (2002). Callus induction and plant regeneration in *Lemna minor* L. *Biologia plantarum*, *45*, 469-472.

32- Stomp, A.-M. (2005). "The duckweeds: a valuable plant for biomanufacturing." Biotechnology annual review 11: 69-99.

33- Taghipour, E., Bog, M., Frootan, F., Shojaei, S., Rad, N., Arezoumandi, M., ... & Salmanian, A. H. (2022). DNA barcoding and biomass accumulation rates of native Iranian duckweed species for biotechnological applications. Frontiers in Plant Science, 13, 1034238.

34- Tan, X., Chen, S., Fang, Y., Liu, P., Hu, Z., Jin, Y., ... & Zhao, H. (2022). Rapid and highly efficient genetic transformation and application of interleukin-17B expressed in duckweed as mucosal vaccine adjuvant. Biomolecules, 12(12), 1881.

35- Walsh, É., et al. (2021). "Light intensity alters the phytoremediation potential of *Lemna minor*." Environmental Science and Pollution Research 28: 16394-16407.

36- Yang, G. L., Feng, D., Liu, Y. T., Lv, S. M., Zheng, M. M., & Tan, A. J. (2021). Research progress of a potential bioreactor: Duckweed. *Biomolecules*, *11*(1), 93.

37- Yang, L., Sun, J., Yao, J., Wang, Y., Yan, C., Wu, J., ... & Sun, J. (2021). The framework of plant regeneration in duckweed (*Lemna turonifera*) comprises genetic transcript regulation and cyclohexane release. bioRxiv, 2021-07.

Preproof Article

مقاله پژوهشی، صفحات ۹۲-۷۷

The Effect of culture conditions and medium on the *in-vitro* cultivation of three species of duckweed native to Iran as a plant with biotechnological applications

Taghipour E., Rad N., Shojaei S., Arezoumandi M., Frootan F., Yaghoubi S. and Salmanian A.H.

Dept. of Agricultural Biotechnology, National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology (NIGEB), Tehran, I.R. of Iran.

Abstract

Duckweed is the world's smallest aquatic plant with six species found on the surface of the Iran's wetlands. Duckweeds having unique characteristics in growth, protein, and nutritional content, have been considered for biotechnological applications and food security. For further study, optimization of cultivation under controlled conditions should be considered. For this purpose, four culture mediums Hoagland, MS, SH, and NF were used and the relative growth rate (RGR), doubling time (DT), and biomass accumulation (BA) were investigated. Hoagland's liquid medium with the average doubling time of fronds every 2.8 days and biomass doubling every 1.2 days for *Lemna minor* and *Spirodela polyrhiza* and accumulation of biomass every 1.2 days for the edible species *Wolffia* spp. was recognized as the best medium. Also, tissue culture optimization of the duckweed is needed to facilitate their genetic engineering. The results showed that MS solid medium in the presence of 15 µM 2,4-D and 7.5 µM BAP supplemented with 2% sucrose, significantly stimulates the highest percentage of callus induction in the *Lemna* species. Also, the highest rate of regeneration (83%) was obtained in the presence of BAP with a concentration of 4 µM and 1% sucrose. These data show that duckweed native to Iran (*L. minor*) can be grown *in-vitro* under laboratory conditions, and due to its high nutritional value, it can be used as a potentially rich source of protein as a supplement to food and feed and to produce recombinant proteins should be investigated.

Key words: duckweed, tissue culture, relative growth rate, *Lemna minor*, food security.

Preprint Article