بررسی امکان القای کالوس و باززایی غیرمستقیم در گیاه مامیران (*Chelidonium majus L.*) تحت تاثیر تنظیم‌کننده‌های رشد اکسین و سیتوکینین

اکرم اسفندیار[1*]، سید کمال کاظمی تبار[2] و غفار کیانی[2]

[1] ساری، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، گروه بیوتکنولوژی کشاورزی

[2] ساری، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی

تاریخ دریافت: ۹۴/۸/۴ تاریخ پذیرش: ۹۵/۷/۱۴

چکیده

مامیران گیاهی دارویی با نام علمی *Chelidonium Majus* از خانواده Papaveraceae است که بدلیل داشتن ترکیبات موثره فراوان، دارای خواص دارویی زیادی می‌باشد. در بخش اول این پژوهش، تاثیر هورمون‌های ۲و۴ – دی کلروفنوکسی استیک اسید (2,4-D) در پنج سطح (۰، ۰/۵، ۱، ۱/۵ و ۲ میلی‌گرم در لیتر) با هورمون بنزیل آدنین (BA) در چهار سطح (۰/۲۵، ۰/۵، ۱ و ۱/۵) میلی‌گرم در لیتر روی میزان کالوس‌زایی ریزنمونه‌های ساقه، برگ و بذر بررسی شدند. در بخش دوم، جهت بررسی باززایی از طریق کالوس از ترکیب هورمونی بنزیل آمینوپورین (BAP) در سه سطح (۱، ۲ و ۳ میلی‌گرم در لیتر) با هورمون 2,4-D در دو سطح (۰/۱ و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر) استفاده شد. این پژوهش به صورت آزمایش فاکتوریل بر پایه طرح کاملاً تصادفی در سه تکرار بود. نتایج نشان داد بهترین محیط کالوس‌زایی برای درصد القای کالوس محیط کشت پایه MS حاوی ۱ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D بهمراه ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BA به میزان ۶۹/۴۴ درصد و ۲ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D بهمراه ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر BA به نسبت ۶۳/۸۸ درصد بود. بهترین محیط القای کالوس برای وزن‌تر کالوس محیط کشت پایه MS حاوی ۲ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D بمیزان ۰/۴۱۷۵ گرم بود. بهترین ریزنمونه مامیران برای تشکیل و وزن کالوس ریزنمونه ساقه بود. بیش‌ترین باززایی و تولید برگ در محیط پایه MS حاوی ۲ میلی‌گرم در لیتر BAP و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D مشاهده شد ولی ساقه تشکیل نشد.

واژه‌های کلیدی: باززایی، کالوس، کشت بافت، مامیران

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۹۱۱۷۱۴۳۴۷۹ ، پست الکترونیکی: sanru_esfandyar@yahoo.com

مقدمه

مامیران گیاهی دارویی از تیره خشخاش (Papaveraceae) است که نام علمی آن *Chelidonium Majus L.* و نام لاتین آن Celandine می‌باشد. مامیران گیاهی علفی، دو یا چند ساله، و دولپه با ارتفاع ۴۵–۶۰ سانتی‌متر می‌باشد که دارای رشد سریع بوده، و نسبت به یخبندان حساس نیست (۹). گرده‌افشانی در این گیاه به وسیله حشرات صورت می‌گیرد. میوه آن کپسول باریک و دراز بوده که حاوی دانه‌های سیاه یا قهوه‌ای با زائده گوشتی از جنس چربی می‌باشد (۱۱). دانه‌های مامیران از اردیبهشت تا تیر کامل می‌شوند. گیاه متحمل به سایه بوده و در روی دیوارهایی که حالت نیمه سایه داشته باشد به خوبی رشد می‌کند (۵). گیاه مامیران به طور خودرو در قسمت‌های جنوبی و اروپای مرکزی، بخش‌های آسیا و شمال آمریکا می‌روید (۱۲).

اهمیت دارویی و پزشکی موجود در این گیاه بر مبنای سنتز ترکیباتی می‌باشد که از نظر دارویی مهم تلقی می‌گردند. از جمله آن می‌توان به آلکالوئیدها، فلاوونوئیدها

یا اسیدهای فنولیک اشاره کرد (۱۳). نتایج پژوهش‌های علمی نشان می‌دهد که حدود ۲۰ تا ۳۰ آلکالوئید، بسته به استخراج و روش جداسازی در گیاه مامیران وجود دارد. به طور کلی ریشه مامیران شامل ۲ الی ۳ درصد از انواع آلکالوئیدهاست، در حالی که بخش‌های اندام هوایی فقط ۰/۵-۱/۵ درصد از این ماده را دارا می‌باشد (۱۰). آلکالوئید اصلی این گیاه isoquinoline است که به گروه‌های مختلف مثل(protopine (protopine, allocryptopine، protopine، benzophenanthridine (sanguinarine, protoberberine، chelidonine and chelerithrine) و coptisine را شامل می‌شود (۶). این گیاه در درمان بیماری‌های کبدی، زخم معده، سل، درمان انسداد گردش خون، عفونت‌های دهان و دندان، یرقان و لاتکس زرد آن در درمان زگیل، میخچه، اگزما و تومورهای جامد کاربرد دارد (۴). خاصیت مسکن بودن، مدر بودن، تحریک کردن ترشح صفرا و همچنین خاصیت ضداسپاسمی این گیاه دارویی مشخص شده است (۳). گیاه مامیران دارای فعالیت آنتی اکسیدان، ضد حساسیت و ضد سرطان می‌باشد (۱۵).

از ماده Quinclorac (۷و۳-دی کلرو-۸ -کوئینولین کربوکسیلیک اسید) که یک علف‌کش از نوع اکسین است و مانند 2,4-D عمل می‌کند و همچنین از 2,4-D جهت القای کالوس جنین‌زا و تولید جنین‌های سوماتیکی کشت بافت در مامیران استفاده شده است. که در آن برگ‌ها و ساقه‌ها توسط این ماده برای تشکیل کالوس جنین‌زا القا نشدند و فقط ریشه برای القای کالوس‌های جنین‌زا و تولید جنین‌های سوماتیکی موثر بود. کالوس‌ها از ریشه‌های سالم روی محیط کشت MS حاوی 0.1-1 mg/l Quinclorac یا 1-2 mg/l 2,4-D القا شدند (۷).

در پژوهشی دو اکسین 2,4-D و IAA همراه با یک سیتوکینین (Kin) برای القای کالوس در اندام هوایی گیاه مامیران به کار برده شد و نتایج آن نشان داد که 1 mg/l 2,4-D همراه با 0.5 mg/l Kin در القای کالوس ساقه موثر بود و همچنین 0.5 mg/l IAA بهمراه 0.5 mg/l Kin موجب القای کالوس ریزنمونه ساقه شد (۱۴).

از ساقه گیاه خشخاش (*Papaver somnifrum*) که مانند گیاه مامیران از خانواده Papaveraceae است، بمنظور القای کالوس از محیط کشت پایه MS همراه با تنظیم کننده‌های رشد اکسین و سیتوکنین بمیزان 0.1 mg/l NAA و Kin (کینتین) استفاده شده است (۸).

کشت بافت، بخش مهمی از بیوتکنولوژی که می‌تواند در بهبود تولید مواد گیاهی از طریق افزایش توانایی صفات مورد نظر استفاده شود. این چنین مطالعات برای مطالعات آینده مانند انتقال ژن ضرورت دارد. از طریق کشت بافت این گیاه می‌توان اقدامات علمی همچون انتقال ژن، تغییرات کروموزومی و مهم‌تر از آن افزایش متابولیت‌های ثانویه را در جهت استفاده هرچه بیش‌تر از ترکیبات موثره این گیاه و نیز افزایش خواص درمانی آن انجام داد. با توجه به اینکه تاکنون پژوهشی در رابطه با جنبه‌های کشت بافت این گیاه در ایران گزارش نشده است و همچنین نمونه استفاده شده، گونه گیاهی بومی ایران بوده و مقاوم بودن این گیاه به کالوس‌دهی (به سختی کالوس داده شده)، این مطالعه با هدف بهینه‌سازی محیط کشت القای کالوس و باززایی از طریق کالوس در گیاه مامیران انجام شد که در آن تاثیر نوع و مقدار برخی از تنظیم کننده‌های رشد اکسین و سیتوکنین و نیز ریزنمونه‌های مختلف در میزان القای کالوس و باززایی غیر مستقیم در این گیاه ارزشمند دارویی مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روشها

بمنظور بررسی امکان تولید کالوس و باززایی در گیاه مامیران، دو آزمایش مختلف به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملا تصادفی با سه تکرار (پتری دیش) در آزمایشگاه اصلاح نباتات، گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری در سال ۹۳-۱۳۹۲

انجام شد.

آزمایش القای کالوس: این آزمایش در قالب فاکتوریل بر پایه طرح کاملا تصادفی با سه تکرار بود که فاکتورهای آزمایشی شامل ریزنمونه در سه سطح (ساقه، برگ و بذر) بعنوان عامل اول، تنظیم کننده رشد 2,4-D در پنج سطح (۰، ۰/۵، ۱، ۱/۵ و ۲ میلی‌گرم در لیتر) بعنوان عامل دوم و BA در چهار سطح (۰/۲۵، ۰/۵، ۱ و ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر) بعنوان عامل سوم بودند.

بمنظور تهیه ریزنمونه ساقه، برگ و بذر از گیاهان خودرو جمع‌آوری شده از استان مازندران استفاده شد. جهت تهیه ریزنمونه برگ، ابتدا بذر مامیران به مدت ۴۸ ساعت خیسانده شدند و سپس حدود ۲۰ دقیقه در آب مقطر بهمراه مایع ظرفشویی قرار گرفتند، بعد از آن سطح بذرها را با اتانول ۷۰ درصد به مدت ۳۰ ثانیه و با محلول هیپوکلریت به مدت ۱۰ دقیقه استریل شدند، سپس سه بار در آب مقطر شسته شدند و در محیط کشت MS قرار گرفتند. محیط کشت MS و ویتامین پیش از افزودن آگار بر روی pH = ۵/۸ تنظیم شدند و سپس با ۲۰ دقیقه اتوکلاوکردن در دمای ۱۲۱ درجه سانتیگراد استریل شدند. بذرها در اتاق رشد در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد تحت ۱۶ ساعت روشنایی با استفاده از لامپ‌های فلئورسنت استاندارد با شدت روشنایی ۴۰μmol m^{-2} s^{-1} برای جوانه‌زنی قرارگرفتند. بعد از سه هفته بذرها جوانه زدند و بعد از حدود ۵۵ روز پس از کشت بذور، ریزنمونه برگ بدست آمد. ریز نمونه ساقه نیز ابتدا توسط آب معمولی به مدت ۳۰ دقیقه شسته شدند، سپس ۱۰ دقیقه در آبی که حاوی ۲ تا ۳ قطره مایع ظرف‌شویی بود غوطه‌ور گردیدند. بعد از آن ریزنمونه‌ها به زیر هود لامینار ایرفلو انتقال داده شد به مدت ۱ دقیقه در قارچ‌کش بنومیل ۱ درصد ضدعفونی شدند. سپس به مدت ۲۰ دقیقه در محلول هیپوکلریت سدیم ۱۰ درصد حاوی چند قطره توین ۲۰ قرار گرفتند. بعد از ۳ مرتبه شستشو توسط آب مقطر، ۵ ثانیه در الکل ۷۰ درصد ضدعفونی شدند و بعد از آن ۳ مرتبه با آب مقطر استریل شستشو شدند و در پایان با استفاده از کاغذ صافی استریل خشک گردیدند. پس از کشت ریزنمونه‌ها در زیر هود لامینار، درب پتری دیش‌ها با پارافیلم مسدود شد و در انکوباتور با دمای ۲±۲۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند.

صفات مورد اندازه‌گیری در آزمایش القای کالوس شامل درصد القای کالوس (درصد کالوس‌زایی) و وزن‌تر کالوس بود. بمنظور محاسبه درصد القای کالوس در هر پتری دیش تعداد ریزنمونه‌هایی که تولید کالوس نموده بودند تقیسم بر تعداد کل ریزنمونه‌های کشت شده شد و در عدد ۱۰۰ ضرب گردید. برای محاسبه وزن‌تر کالوس، با استفاده از ترازوی دیجیتال وزن کل کالوس‌های درون هر پتری دیش اندازه گرفته شد و تقسیم بر تعداد کالوس‌های کشت شده در همان پتری دیش می‌شد و به عنوان وزن‌تر کالوس در آن تکرار (پتری دیش) گزارش شد.

آزمایش باززایی از طریق کالوس: در آزمایش باززایی بمنظور تولید نوساقه، بعد از گذشت دو ماه از کشت ریزنمونه‌ها جهت تولید کالوس، بهترین کالوس‌ها انتخاب و در محیط کشت MS بدون هورمون، به مدت دو هفته واکشت شدند. سپس کالوس‌ها به محیط MS حاوی تنظیم کننده‌های رشد باززایی، انتقال داده شدند.

آزمایش در قالب فاکتوریل بر پایه طرح کاملا تصادفی با سه تکرار بود که فاکتورهای آزمایشی شامل BAP در سه سطح (۱، ۲ و ۳ میلی‌گرم در لیتر) بعنوان عامل اول و 2,4-D در دوسطح (۰/۱ و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر) بعنوان عامل دوم در نظر گرفته شدند.

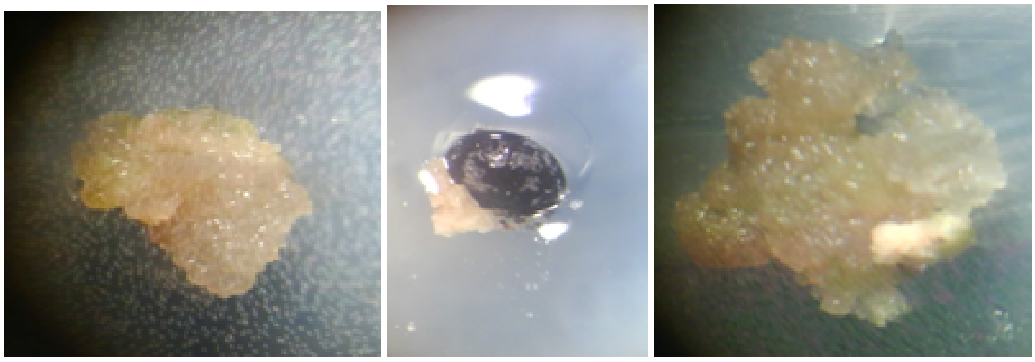
در آزمایش باززایی، بمنظور محاسبه درصد باززایی، در هر پتری دیش تعداد کالوس‌هایی که تولید نوساقه کرده بودند تقسیم بر تعداد کل قطعات کالوس کشت شده در هر پتری دیش شد و سپس در عدد ۱۰۰ ضرب شده و بعنوان درصد باززایی در آن تکرار در نظر گرفته می‌شد.

تجزیه‌های آماری

تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم افزار آماری SAS نسخه ۹,۱ انجام شد. مقایسه میانگین‌ها به روش آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ۱ و ۵ درصد انجام گرفت. جهت رسم نمودارهای مقایسات میانگین از نرم افزار Excel استفاده شد.

نتایج

القای کالوس: ریزنمونه‌ها بعد از گذشت چند روز در محیط کالوس‌دهی، بتدریج متورم شدند و طی ۱۵-۱۰ روز بعد از کشت، ریز نمونه‌ها شروع به کالوس‌دهی نمودند (شکل ۱). با توجه به اینکه محیط کشت استفاده شده برای ریزنمونه ساقه بتدریج فنولی می‌شد، واکشت به فاصله زمانی هفت روز یک بار انجام گرفت. بعد از سپری شدن یک ماه با بررسی تمام ریزنمونه‌های کشت شده صفت درصد کالوس‌زایی و بعد از یک بار واکشت و سپری شدن دو ماه از کشت ریزنمونه‌ها، صفت وزن تر کالوس اندازه‌گیری شد و تیمارها بر اساس درصد کالوس‌زایی و وزن‌تر کالوس مورد مقایسه قرار گرفتند.



شکل ۱- کالوس‌های تولید شده در ریزنمونه‌های ساقه، بذر و برگ (از چپ به راست) در گیاه مامیران

نتایج حاصل از تجزیه واریانس و مقایسه میانگین داده‌های مربوط به درصد تشکیل کالوس و وزن کالوس بر روی هر ریزنمونه نشان داد که اثر هر یک از عوامل نوع ریزنمونه، سطوح 2,4-D و BA بتنهایی و همچنین اثر متقابل دو عامل و سه عامل آن‌ها، در سطح احتمال ۱ درصد معنی‌دار شد (جدول ۱ و ۲).

جدول ۱- تجزیه واریانس صفات اندازه‌گیری شده برای القای کالوس (2,4-D و BA)

منابع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات	
		درصد کالوس‌زایی	وزن تر کالوس (گرم)
BA	۳	۳۸/۶۳**	۶۵۲۴۴**
2,4-D	۴	۲۸۱/۱۹**	۳۵۴۸۸۴**
ریزنمونه	۲	۱۵/۴۰**	۵۲۱۷۷۷**
2,4-D × BA	۱۲	۱۸/۳۰**	۴۹۲۲۳**
BA × ریزنمونه	۶	۱/۵۹**	۱۷۳۳۱**
2,4-D × ریزنمونه	۸	۳/۱۲**	۷۱۳۶۲**
2,4-D × BA × ریزنمونه	۲۴	۲/۸۵**	۳۶۷۲۰**
خطا	۱۲۰	۰/۴۴	۵۰۱
ضریب تغییرات (CV %)		۱۴/۱۹	۱۸/۰۷

** معنی‌داری در سطح ۱ درصد

جدول ۲- مقایسه میانگین اثر غلظت‌های مختلف 2,4-D و BA بر درصد القا و وزن‌تر کالوس بر روی ریزنمونه‌های گیاه مامیران

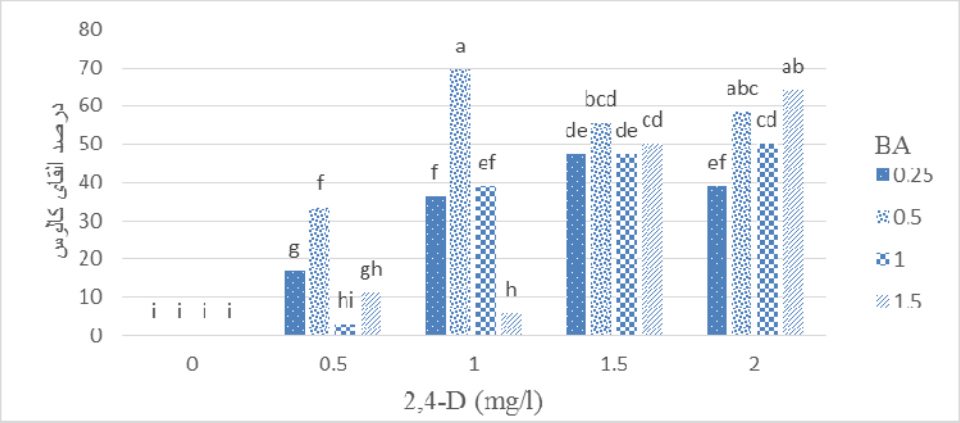
تغییرات	منابع	کالوس	القای	درصد	(گرم)	کالوس	وزن‌تر
2,4-D	BA	ساقه	برگ	بذر	ساقه	برگ	بذر
۰	۰/۲۵	۰^{h}	۰^{h}	۰^{h}	۰^{s}	۰^{s}	۰^{s}
۰/۵	۰/۲۵	۱۶/۶۷^{f}	۸/۳۳^{g}	۲۵^{ef}	۰/۲۲^{hij}	۰/۲۰^{ij}	۰/۰۲^{ij}
۱	۰/۲۵	۵۸/۳۳^{b}	۸/۳۳^{g}	۴۱/۶۷^{cd}	۰/۳۴^{qrs}	۰/۰۳^{ef}	۰/۰۳^{qrs}
۱/۵	۰/۲۵	۵۸/۳۳^{b}	۴۱/۶۷^{cd}	۴۱/۶۷^{cd}	۰/۳۸^{pqrs}	۰/۲۸^{d}	۰/۰۳^{g}
۲	۰/۲۵	۳۳/۳۳^{ed}	۴۱/۶۷^{cd}	۴۱/۶۷^{cd}	۰/۱۹^{qrs}	۰/۲۴^{jk}	۰/۰۳^{h}
۰	۰/۵	۰^{h}	۰^{h}	۰^{h}	۰^{s}	۰^{s}	۰^{s}
۰/۵	۰/۵	۵۰^{bc}	۲۵^{ef}	۲۵^{ef}	۰/۱۷^{kl}	۰/۰۷^{op}	۰/۰۲^{qrs}
۱	۰/۵	۵۰^{bc}	۶۶/۶۷^{b}	۹۱/۶۷^{a}	۰/۲۸^{g}	۰/۴۵^{c}	۰/۰۵^{opq}
۱/۵	۰/۵	۶۶/۶۷^{b}	۳۳/۳۳^{ed}	۶۶/۶۷^{b}	۰/۴۸^{b}	۰/۱۴^{lm}	۰/۰۵^{opq}
۲	۰/۵	۵۸/۳۳^{b}	۵۰^{bc}	۶۶/۶۷^{b}	۰/۴۹^{b}	۰/۳۳^{ef}	۰/۰۴^{pq}
۰	۱	۰^{h}	۰^{h}	۰^{h}	۰^{s}	۰^{s}	۰^{s}
۰/۵	۱	۰^{h}	۰^{h}	۸/۳۳^{g}	۰^{s}	۰^{s}	۰^{s}
۱	۱	۴۱/۶۷^{cd}	۲۵^{ef}	۵۰^{bc}	۰/۲۰^{ij}	۰/۱۱^{mn}	۰/۰۳^{pqrs}
۱/۵	۱	۵۸/۳۳^{b}	۲۵^{ef}	۵۸/۳۳^{b}	۰/۱۳^{lm}	۰/۰۸^{no}	۰/۰۳^{pqrs}
۲	۱	۴۱/۶۷^{cd}	۵۸/۳۳^{b}	۵۰^{bc}	۰/۲۳^{hi}	۰/۳۷^{ed}	۰/۰۳^{pqrs}
۰	۱/۵	۰^{h}	۰^{h}	۰^{h}	۰^{s}	۰^{s}	۰^{s}
۰/۵	۱/۵	۳۳/۳۳^{g}	۰^{h}	۰^{h}	۰^{s}	۰^{s}	۰^{s}
۱	۱/۵	۸/۳۳^{g}	۰^{h}	۸/۳۳^{g}	۰/۰۲^{qrs}	۰^{s}	۰^{s}
۱/۵	۱/۵	۵۰^{bc}	۵۸/۳۳^{b}	۴۱/۶۷^{cd}	۰/۱۹^{jk}	۰/۳۱^{fg}	۰/۰۳^{pqrs}
۲	۱/۵	۹۱/۶۷^{a}	۵۰^{bc}	۵۰^{bc}	۰/۷۶^{a}	۰/۲۹^{g}	۰/۰۴^{pqr}

میانگین‌هایی که دارای حداقل یک حرف مشترک هستند تفاوت معنی‌داری در سطح احتمال ۱درصد ندارند.

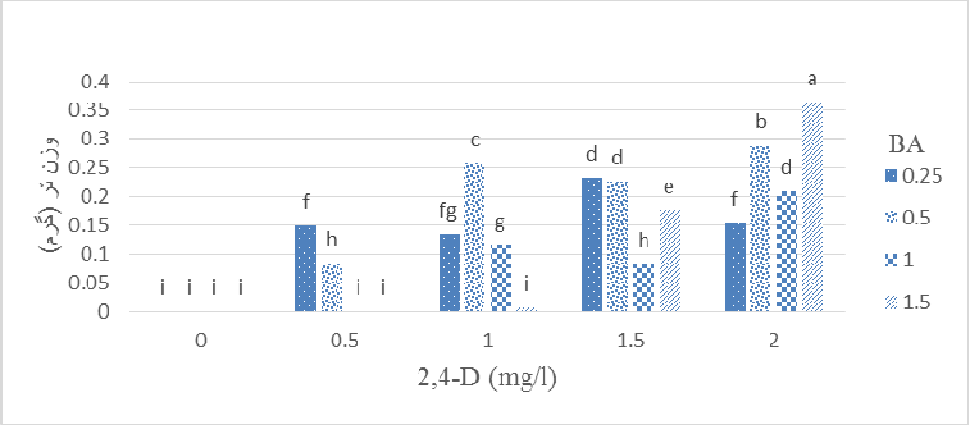
اثر هورمون‌های 2،4-D وBA بر میزان کالوس‌زایی و وزن تر کالوس: تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که تمام اثرات عوامل تنظیم کننده‌های رشد بتنهایی و یا در ترکیب باهم معنی‌دار می‌باشد (جدول ۱). بیش‌ترین درصد تشکیل کالوس با فراوانی ۶۹/۴۴ درصد با ترکیب هورمونی ۱ میلی‌گرم در لیتر 2،4-D بهمراه ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BA و ۲ میلی‌گرم در لیتر 2،4-D بهمراه ۱/۵ میلی‌گرم در لیترBA با فراوانی ۶۳/۸۸ درصد می‌باشد (شکل ۲). همچنین بیش‌ترین وزن‌تر کالوس در سطح ۲ میلی‌گرم در لیتر 4-2،D بهمراه ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر BA با میانگین ۰/۳۶۳۳ گرم می‌باشد (شکل ۳). در همه نمودارها میانگین‌های با حداقل یک حرف مشترک اختلاف اماری معنی‌داری از نظر دانکن در سطح احتمال ۱ درصد ندارند.

اثر متقابل هورمون 2,4-D و ریزنمونه بر میزان کالوس‌زایی و وزن‌تر کالوس: تجزیه واریانس (جدول ۱) سطوح ریزنمونه در هر سطح از 2,4-D نشان داد که در تمام سطوح 2,4-D، واکنش ریزنمونه‌ها با همدیگر اختلاف بسیار معنی‌داری داشت. مقایسه میانگین سطوح ریزنمونه در هر سطح از 2,4-D نشان داد که در غلظت ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر با میانگین ۵۸/۳۳ درصد و ۲ میلی‌گرم در لیتر با میانگین ۵۶/۲۵ درصد، ریزنمونه ساقه بیش‌ترین واکنش را به القای کالوس نشان داد (شکل ۴). همچنین ریزنمونه

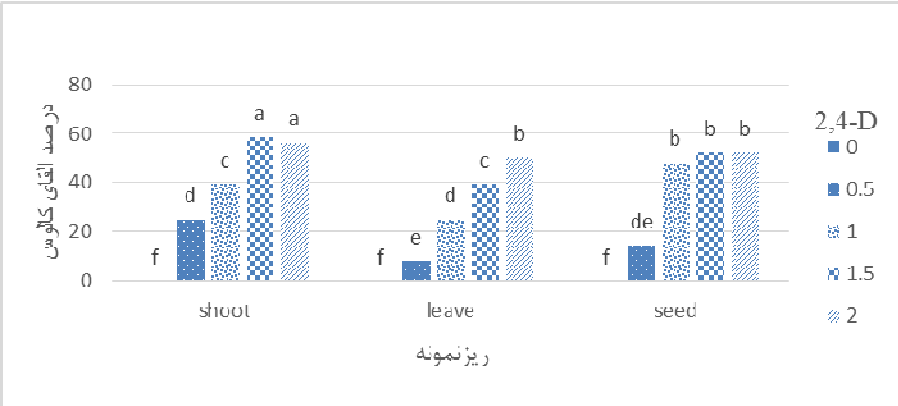
ساقه در سطح ۲ میلی‌گرم در لیتر با میانگین ۰/۴۱۷۵ گرم بیش‌ترین وزن‌تر را به خود اختصاص داد (شکل ۵).



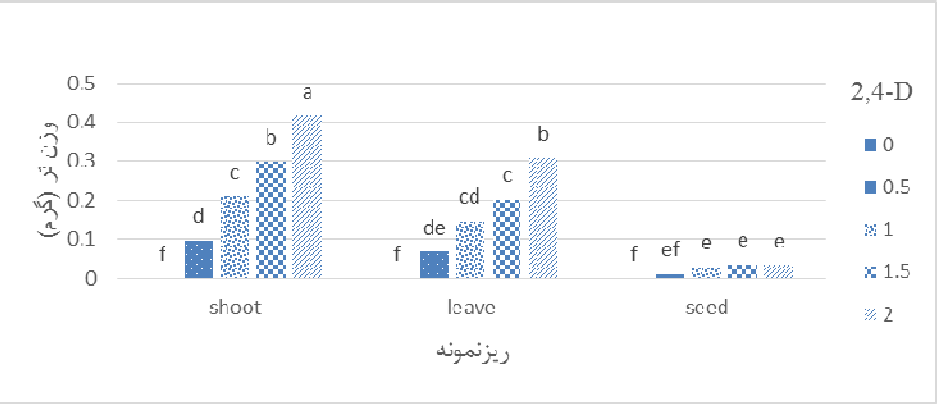
شکل ۲- اثر غلظت‌های مختلف 2,4-D و BA بر درصد القای کالوس در گیاه مامیران



شکل ۳- اثر غلظت‌های مختلف 2,4-D و BA بر وزن‌تر کالوس در گیاه مامیران

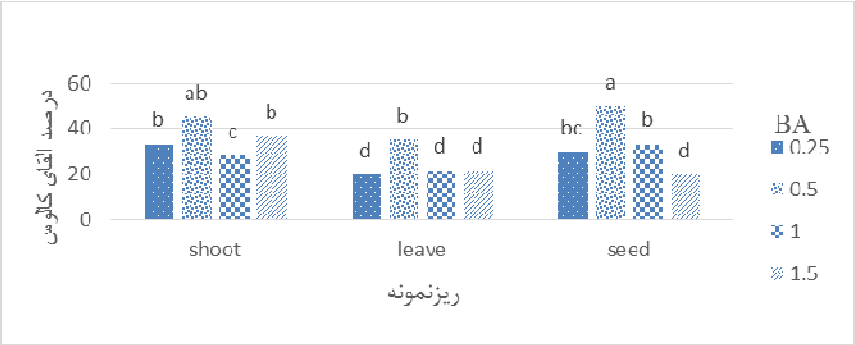


شکل ۴- اثر غلظت‌های مختلف 2,4-D و نوع ریزنمونه بر درصد القای کالوس در گیاه مامیران

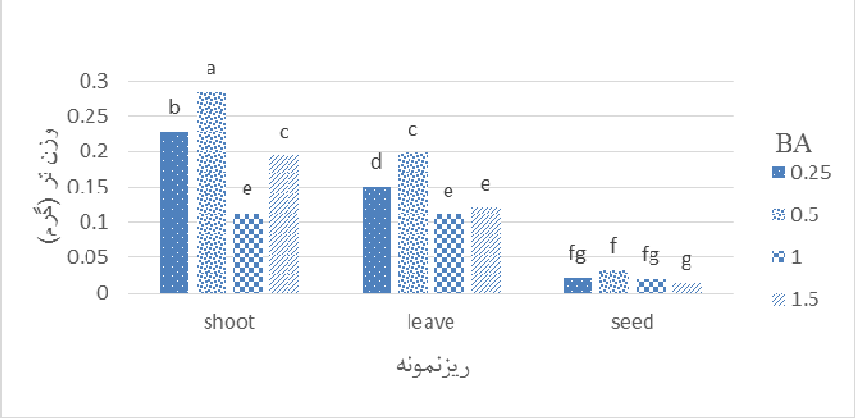


شکل ۵- اثر غلظت‌های مختلف 2،4-D و نوع ریزنمونه بر وزن‌تر کالوس در گیاه مامیران

اثر متقابل هورمون BA و ریزنمونه بر میزان کالوس‌زایی و وزن‌تر کالوس: تجزیه واریانس (جدول ۱) سطوح ریزنمونه در هر سطح از BA نشان داد که در تمام سطوح BA، واکنش ریزنمونه‌ها با همدیگر اختلاف بسیار معنی‌داری داشت. مقایسه میانگین سطوح ریزنمونه در هر سطح از BA نشان داد که در غلظت ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر ریزنمونه بذر با میانگین ۵۰ درصد و بعد از آن ریزنمونه ساقه با میانگین ۴۵ درصد بیش‌ترین درصد کالوس را داشت (شکل ۶). همچنین ریزنمونه ساقه با میانگین ۰/۲۸۳۵ گرم در غلظت ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر بیش‌ترین وزن‌تر را به خود اختصاص داد (شکل ۷).



شکل ۶- اثر غلظت‌های مختلف BA و نوع ریزنمونه بر درصد القای کالوس در گیاه مامیران



شکل ۷- اثر غلظت‌های مختلف BA و نوع ریزنمونه بر وزن‌تر کالوس در گیاه مامیران

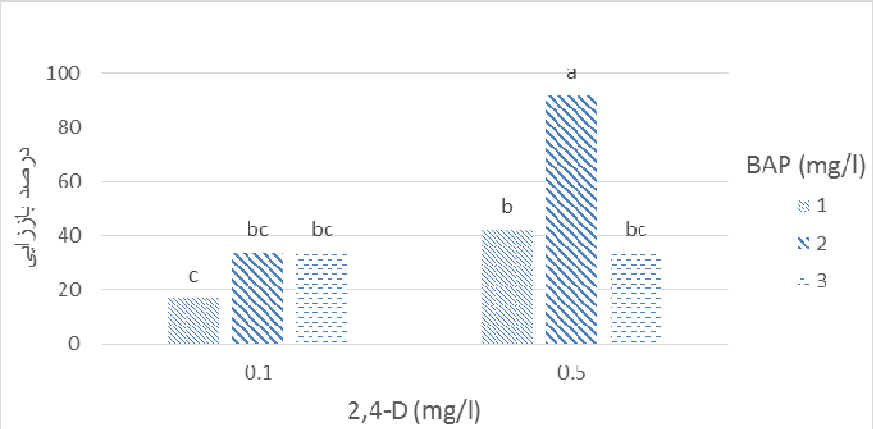
جدول ۳- تجزیه واریانس (میانگین مربعات) برای درصد باززایی در گیاه مامیران

منابع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات
BAP	۲	۹/۷۸**
2,4-D	۱	۱۹/۰۶**
BAP×2,4-D	۲	۵/۸۶*
خطا	۱۲	۱/۰۳
ضریب تغییرات	۱۶/۴۶ درصد	

* و ** بترتیب یعنی معنی‌دار در سطح احتمال ۵ و ۱ درصد

باززایی از طریق کالوس: نتایج حاصل از تجزیه واریانس داده‌های مربوط به درصد تشکیل برگ از کالوس نشان داد که اثر هورمون‌های BAP و2,4-D درسطح احتمال ۱ درصد و اثر متقابل 2,4-D و BAP در سطح احتمال ۵ درصد معنی‌دار می‌باشد (جدول ۳).

کالوس‌های تولید شده روی محیط کشت MS با تیمار هورمونی ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D و ۲ میلی‌گرم در لیتر BAP کشت شدند که بعد از گذشت یک هفته برگ تولید شد که بیش‌ترین درصد تولید جوانه در این محیط بود ولی ساقه ایجاد نشد. هر چند در محیط کشت MS حاوی ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D و ۱ میلی‌گرم در لیتر BAP نیز جوانه القا شد ولی منجر به تشکیل نوساقه نشد.



شکل ۸- اثر سطوح مختلف 2,4-D و BAP بر درصد باززایی در گیاه مامیران

شکل ۹- کالوس منتقل شده (ریزنمونه برگ) به محیط BAP ۲ + 2,4-D ۰/۵ + MS و تولید جوانه القا شده جهت باززایی در گیاه مامیران

بحث

مقایسه میانگین ریزنمونه‌ها در آزمایش نشان داد که نوع بافت مورد استفاده برای تهیه ریزنمونه، بر درصد کالوس‌زایی موثر است. نتایج بدست آمده در ریزنمونه ساقه که در محیط MS با تیمارهورمونی ۱/۵ میلی‌گرم بر لیتر BA و ۲ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D بیش‌ترین کالوس‌زایی مشاهده شد. با نتایج Vantu (۲۰۱۱) که ساقه فقط در محیط MS با تیمارهورمونی ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر KIN و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر IAA کالوس داده مطابقت ندارد. ولی طبق نظر Vantu (۲۰۱۱) ریزنمونه ساقه می‌تواند برای القای کالوس به کار برده شود که با نتایج بدست آمده مطابقت دارد.

در این پژوهش مشاهده شد که از ریزنمونه ساقه و برگ و بذر کالوس تولید شد که با نظر Vantu (۲۰۱۱) که از برگ کالوس تولید نمی‌شود و با گزارش Lee et al (۲۰۱۱) که فقط ریزنمونه ریشه برای کالوس مناسب است مطابقت ندارد.

Ovecka et al (۱۹۹۷) در خشخاش که مانند مامیران از خانواده Papaveraceae است از ساقه توانست کالوس بگیرد که طبق نتایج بدست آمده، ساقه مامیران نیز تولید کالوس کرد.

در این پژوهش هرچند مراحل ابتدایی تشکیل نوساقه مشاهده شد اما این جوانه‌های تشکیل شده منجر به ایجاد نوساقه نشد. این یافته با نتایج Vantu (۲۰۱۱) که توانست در این محیط ساقه و برگ بگیرد مطابقت ندارد. در بقیه تیمارهای هورمونی BAP و 2,4-D برگ با فراوانی کمتر تولید شد. در تیمارهای هورمونی کینتین و 2,4-D باززایی مشاهده نشد. همچنین نتایج ما با گزارشات Lee et al (۲۰۱۱) که توانست باززایی کامل بگیرد مطابقت ندارد. احتمالا این نتایج متفاوت در القا کالوس و باززایی نوساقه می‌تواند بدلیل تغییر در تعادل تنظیم‌کننده‌های رشدی درونی در اندام‌های مختلف گیاه باشد که نشان می‌دهد کالوس‌زایی و باززایی این گیاه به عواملی مانند ژنوتیپ منبع گیاهی مورد استفاده و نوع جداکشت آن وابسته است (۲). بعنوان یک نتیجه مهم در این آزمایش مشخص شده که هورمون BAP نقش بسزایی در باززایی داشت که با نتایج سایر مطالعات انجام شده مطابقت دارد (۱).

بنابراین در این آزمایش روش تولید بهینه کالوس با استفاده از 2,4-D و BA مورد بررسی قرار گرفت و عوامل موثر بر آن از جمله نوع ریزنمونه مشخص شد. در آزمایش حاضر با بررسی تاثیر این دو هورمون بر تشکیل کالوس، مشخص شد که این دو ماده، تنظیم‌کننده رشد مناسبی جهت القای کالوس در گیاه مامیران می‌باشد. برای باززایی نیز تلاش زیادی شده و تیمارهای مورد استفاده گزارش شدند که منجر به ایجاد جوانه شد ولی نوساقه تشکیل نشد.

منابع

۱- اطرشی، م. و مرادی، ک. ۱۳۹۳. بررسی کالوس‌زایی و اندام‌زایی غیرمستقیم گیاه فلفل دلمه‌ای (*Capsicum annuum L.*) در شرایط کشت درون شیشه ای. مجله زیست شناسی ایران. جلد ۲۷. شماره ۳.

۲- جوادیان، ن. کریم‌زاده، ق. شریفی، م. و معینی، ا. ۱۳۹۴. باززایی درون شیشه ای گیاه دارویی کتان سفید (*Linum album Kotschy ex Boiss*). مجله زیست شناسی ایران. جلد ۲۸، شماره ۴.

3- Benninger J, Schneider HT, Schuppan D, Kirchner T and Hahn EG. 1999. Acute hepatitis induced by greater celandine (*Chelidonium majus*). Gastroenterology, 117: 1234-1237.

4- Biswas SJ. 2013. A review on pharmacological activities and clinical effects *Chelidonium majuse L*. Department of Zoology, Midnapore College, Midnapore, West Bengal, India-, Global Journal Research. Plants & Indigen. Med. Volume 2, Issue 4. 238–245.

5- Grey Wilson C and Matthews V. 1983. Gardening on Walls Collins. ISBN0-00-219220-0.

6- Kursinszki L, Sarkozi A, Kery A and Szoke E. 2006. Improved RP-HPLC Method for Analysis of Isoquinoline Alkaloids in Extracts of *Chelidonium majus*. Chromatographia. 63: 131-135.

7- Lee SY, Kim YK, Eom SH, Park WT, Uddin MR, Park NI, Kim SG and Park SU. 2011. Quinclorac an auxin type herbicide induces embryogenic callus and somatic embryogenesis of greater celandine (*Chelidonium majus L.*). Plant Omics Jurnal. 4(2): 91-94.

8- Ovecka M, Bobak M and Samaj J. 1997. Development of shoot primordia in tissue culture of *Papaver somniferum L.* Biologia Plantrum 39(4):499-506.

9- Phillips R and Rix M. 1991. Perennials Volumes1 and 2. Pan Books. ISBN 0-330-30936-9.

10- Taborska E, Bochorakova H, Paulova H and Dostal J. 1994. Separation of alkaloids in *Chelidonium majus* by reversed phase HPLC. Planta Medicinal. 60(4): 380-381.

11- Takatori J. 1966. Color Atlas medicinal plant of japan, Hirokawa publishing company, Tokyo, fig 45.

12- Tin Wa M, Kim HK, Fong HH and Farnsworth NR 1972. The structure of chelidimerine, a new alkaloid from *Chelidonium majus*, Lloydia 35, 8789.

13- Tome F and Colombo ML. 1995. Distribution of alkaloids in *Chelidonium majus* and factors affecting their accumulation, Phytochemistry40, 3739.

14- Vantu S. 2011. Aspects of "in vitro" cultivation of *Chelidonium majus L.* Scientific Annals of Alexandru Ioan Cuza University of Iasi. Biologie vegetala 2:49-52.

15- Williams RJ Spenser JPE and Rice Evans C. 2004. Flavonoids, antioxidants or signalling molecules, Free Radic Biology Mededicinal. 36: 838-49.

Investigation of callus induction and indirect shoot regeneration in *Chelidonium majus L.* affected by plant growth regulators

Esfandiar A., Kazemitabar S.K. and Kiani Gh.

Plant Breeding and Biotechnology Dept., Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University (SANRU), Sari, I.R. of Iran

Abstract

Celandine (*Chelidonium majus L.*), a member of Papaveraceae family, is a valuable medicinal plant. Because many active substances have medicinal properties that make it great. In order to study the effect of hormones 2,4-dichlorophenoxy acetic acid (2,4-D) in five levels (0, 0.5, 1, 1.5 and 2 mg/l) and with hormone benzyladenine (BA) at four levels (0.25, 0.5, 1 and, 1.5 mg/l) for callus, explant using stems, leaves and seeds were evaluated. To assess the regeneration of combined hormonal BAP at three levels (1, 2 and 3 mg/l) of 2,4-D hormone on two levels (0.1 and 0.5 mg/l) was used. This was a factorial experiment based on randomized complete design with three replications. The results showed that the best environment for the induction of callus induction on MS medium containing 1 mg/l 2,4-D and 0.5 mg/l BA 69.44 % rate of 2 mg/l 2,4-D and 1.5 mg/l BA 63.88 % respectively. The best medium for callus on MS medium containing 2 mg/l 2,4-D fresh weight. Best Celandine explants to form callus weight and stem explants. Most regeneration and leaf production in MS medium containing 2 mg/l BAP and 0.5 mg/l 2,4-D was observed but did not shoot.

Key words: regeneration, callus, tissue culture, celandine.