بهینه‌سازی کشت بافت و باززایی گیاه دارویی سنبل‌الطیب (*Valeriana officinalis*)

نرگس پشم‌فروش و محمد احمدآبادی*

ایران، تبریز، دانشگاه شهید مدنی آذربایجان، دانشکده کشاورزی، گروه بیوتکنولوژی

تاریخ دریافت: ۹۷/۳/۲۷ تاریخ پذیرش: ۹۷/۱۰/۲۵

چکیده

گیاه سنبل‌الطیب یکی از گیاهان دارویی مهم در ایران است. باتوجه به اهمیت دارویی این گیاه در استفاده سنتی و داروسازی صنعتی، در این پژوهش، بهینه‌سازی کشت بافت، پینه‌زایی و باززایی گیاه کامل از دو نوع ریزنمونه برگ و دمبرگ روی محیط‌های حاوی ترکیبات مختلف هورمونی ارزیابی گردید. نتایج نشان داد که ریزنمونه برگ برای پینه‌زایی در دو شرایط نوری تاریکی و روشنایی مناسب‌تر است. بیشترین مقدار پینه از ریزنمونه برگی در شرایط روشنایی و روی محیط حاوی ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP و ۱ میلی‌گرم در لیترBAP بدست آمد. پینه‌های القا شده در تاریکی، قدرت باززایی ساقه روی محیط‌های باززایی حاوی غلظت‌های مختلف BAP و TDZ را نداشتند و تنها رشد پینه و تولید اندام ریشه مشاهده شد. پینه‌های بدست آمده از ریزنمونه‌های برگی در شرایط روشنایی، قابلیت خوبی برای باززایی ساقه در محیط باززایی داشتند. حداکثر میانگین تعداد شاخه در محیط باززایی حاوی سه میلی-گرم در لیتر BAP مشاهده گردید. این نتایج، علاوه بر فراهم نمودن اطلاعات پایه در مورد اثر برخی فاکتورهای فیزیکی و شیمیایی روی پینه‌زایی و باززایی گیاه سنبل‌الطیب، یک سیستم کارآمد برای باززایی این گیاه را معرفی می‌نماید که می‌تواند در برنامه‌های اصلاح مولکولی با استفاده از مهندسی ژنتیک مورد استفاده قرارگیرد.

واژه‌های کلیدی: سنبل‌الطیب، پینه‌زایی، باززایی درون‌شیشه‌ای، *Valeriana officinalis*

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۴۱-۳۴۳۲۷۵۰۰ پست الکترونیکی: ahmadabadiir@yahhoo.com

مقدمه

سنبل‌الطیب (*Valeriana officinalis*) یکی از گونه‌های مهم جنس والریانا است که بومی اروپا و آسیا بوده و به طور سنتی و گسترده در صنایع داروسازی ایران مورد استفاده قرار می‌گیرد (۱۸). عصاره این گیاه حاوی ترکیبات دارویی مختلفی شامل روغن‌های فرار (از قبیل والریک اسید)، آلکالوئیدها و اسیدهای آمینه آزاد (از قبیل گاما آمینوبوتیریک اسید، آرژنین، تیروزین و گلوتامین) می‌باشد. والرنیک اسید و مشتقات آن از قبیل هیدروکسی والرنیک اسید از قوی‌ترین ترکیبات آرام‌بخش موجود در این گیاه است که به بصورت تجاری مورد توجه هستند (۱۵). خواص دارویی دیگری نیز از این گیاه شامل خاصیت ضد اسپاسم، ضداضطراب، ضدتشنج و ضدباکتری گزارش شده و برای درمان برخی از بیماری‌ها از قبیل سردرد، تپش قلب، فشارخون بالا، اختلالات رفتاری و یادگیری کودکان و ... استفاده شده است (۴، ۵، ۶، ۸، ۱۰و ۱۲). باوجود اهمیت دارویی گونه‌های مختلف این گیاه، مطالعات کشت بافت اندکی بر روی آن‌ها انجام شده است. در این مطالعات، از ریزنمونه‌های مختلفی چون برگ (۳، ۲۰و ۲۳)، ساقه (۲۳)، ریشه (۲۳) و جوانه جانبی (۲۱) استفاده شده است. در این پژوهش، پینه‌زایی و باززایی از دو نوع ریزنمونه برگ و دمبرگ گیاه سنبل‌الطیب با استفاده از ترکیبات مختلف هورمونی در شرایط نوری مختلف مورد ارزیابی قرارگرفت.

مواد و روشها

تهیه مواد گیاهی و ریزنمونه: دراین پژوهش، بذرهای گیاه سنبل‌الطیب از منطقه خسروشاه تبریز جمع‌آوری شدند. جهت ضدعفونی، بذرها در یک تیوپ آزمایشگاهی به مدت یک دقیقه با اتانول ۷۰ درصد و سپس به مدت پنج دقیقه با هیپوکلریت کلسیم ۶ درصد (حاوی یک قطره توئین ۲۰) تیمار شدند. پس از سه مرتبه شستشو با آب مقطر استریل، بذور جهت جوانه‌زنی و تهیه گیاهچه‌های استریل در محیط MS پایه (۱۴) حاوی ۳۰ گرم در لیتر ساکارز کشت شدند. نمونه‌ها پس از کشت در فیتوترون با شرایط نوری ۱۶ ساعت روشنایی (حدود ۳۵ میکرومول فوتون بر مترمربع در ثانیه) و هشت ساعت تاریکی و دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. رطوبت نسبی روی ۴۵±۵ درصد تنظیم گردید. برای تهیه ریزنمونه، قطعات دمبرگ به‌اندازه ۰/۵ سانتی‌متر مربع، و برگ حقیقی به‌اندازه ۳-۲ میلی‌متر مربع از گیاهچه‌های استریل شش هفته‌ای برش داده شدند.

محیط‌های پینه‌زایی و باززایی و تیمارهای هورمونی: جهت بررسی اثر هورمون‌ها و نیز نوع ریزنمونه‌ها در القاء پینه و تولید پینه‌های جنین‌زا، آزمایشی فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با ترکیب دو نوع هورمون ۶-بنزیل آمینو پورین (BAP) با سه غلظت (۰، ۰/۵ و ۱ میلی‌گرم در لیتر) و تو-فور-دی (2,4-D) با سه غلظت (۰، ۱ و ۲ میلی‌گرم در لیتر) در ۳ تکرار و در شرایط تاریکی بررسی شد. ریزنمونه‌ها برای القاء پینه بر روی محیط‌های مختلف قرارداده شدند. کشت‌ها در فیتوترون در شرایط تاریکی قرارگرفتند. پس از هشت هفته، صفات درصد پینه‌زایی، طول پینه و وزن پینه‌های به دست آمده از ریزنمونه‌ها ارزیابی شدند.

انتقال پینه‌های به دست آمده در شرایط تاریکی به محیط باززایی: برای بررسی پتانسیل باززایی و القاء شاخه‌زایی در پینه‌های تشکیل شده در شرایط تاریکی، پینه‌هایی که شکل ظاهری آن‌ها زرد تیره بود و به نظر جنین‌زا می‌رسید، جهت القاء شاخه‌زایی به محیط باززایی انتقال داده شدند. برای این منظور، در یک آزمایش، پینه‌هایی به‌اندازه سه میلی‌متر مربع برش داده شده و در محیط MS حاوی دو نوع هورمون سیتوکنینی بنزیل آمینو پورین (BAP) و تیدیازورون (TDZ) در ۴ تیمار (بدون هورمون، ۱ mg/l BAP، ۲ mg/l BAP و ۱ mg/l TDZ، ۲ mg/l TDZ) و سه تکرار انتقال داده شده و نمونه‌ها در فیتوترون قرار داده شدند. پس از چهار هفته، پارامترهای رشد پینه، درصد ریشه‌زایی و درصد شاخه‌زایی ارزیابی شدند.

در ادامه این آزمایش، تیمارهایی که تولید پینه‌هایی به رنگ سبز تیره کرده بودند گزینش، و جهت القاء باززایی به محیط‌های هورمونی دیگری حاوی غلظت‌های بالاتر تیدیازورون (۰، ۳، ۴، ۵ و ۱۰ میلی‌گرم در لیتر) منتقل شدند.

القاء پینه‌های جنین‌زا در شرایط روشنایی: دراین آزمایش از سه نوع ریزنمونه دمبرگ (P)، برگ حقیقی (L) و ریشه (R) استفاده شد. ریزنمونه دمبرگ و ریشه به اندازه ۰/۵ سانتی‌متر مربع و برگ حقیقی به اندازه ۳-۲ میلی‌متر مربع برش داده شدند. برای راحتی مقایسه بافت‌های مختلف با همدیگر، پتری‌ها به سه قسمت مساوی تقسیم، و در هر قسمت سه ریزنمونه از هر نوع بافت کشت گردید. هر تیمار حداقل شامل سه تکرار بود. کشت‌ها در فیتوترون در شرایط روشنایی قرار داده شدند.

انتقال پینه‌های به دست آمده در شرایط روشنایی به محیط باززایی: پینه‌های حاصل از بهترین تیمارها در شرایط روشنایی، جهت القاء شاخه‌زایی، به محیط باززایی انتقال داده شدند. به همین منظور، قطعات سه میلی‌متری از پینه‌های حاصل، در محیط MS حاوی هورمون BAP با دو غلظت یک و سه میلی‌گرم در لیتر کشت شده و در فیتوترون قرار داده شدند. پس از شش هفته، صفاتی از قبیل درصد باززایی و تعداد شاخسارها ارزیابی شدند.

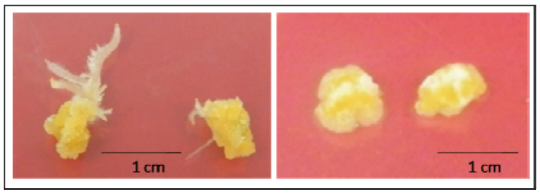
بهینه‌سازی ریشه‌زایی در گیاهچه‌های حاصل از باززایی: برای طویل شدن و نیز ریشه‌دار شدن، گیاهچه‌های حاصل از باززایی به محیط MS پایه فاقد هورمون و حاوی ۳۰ گرم در لیتر ساکارز منتقل شدند. پس از سه هفته، درصد ریشه‌دهی ارزیابی گردید.

انتقال گیاهچه‌های ریشه‌دار شده به خاک و سازگاری گیاهان به شرایط طبیعی: پس از رشد و ریشه‌دار شدن گیاهچه‌ها در شرایط درون‌شیشه‌ای، جهت انتقال و سازگاری آنها به شرایط طبیعی، ابتدا گیاهچه‌ها از محیط کشت خارج و ریشه‌ها با آب جاری شسته شدند. سپس گیاهچه‌ها به خاک (خاک زراعی- خاک برگ- پیت ماس به نسبت ۱:۱:۱) انتقال داده شدند.

روش تجزیه‌وتحلیل داده‌ها: برای تجزیه‌وتحلیل داده‌ها از نرم‌افزار SPSS ver 21° استفاده شد و مقایسه میانگین‌ها توسط آزمون دانکن مورد بررسی قرار گرفت.

نتایج

القاء پینه و تولید پینه‌های جنین‌زا در شرایط تاریکی: در آزمایش پینه‌زایی در شرایط تاریکی، پینه‌زایی از هفته چهارم به بعد در محل برش ریزنمونه‌ها مشاهده شد. پینه-های به دست آمده از ریزنمونه برگی حالت فشرده‌تری داشته و بیشتر مایل به زرد بودند. در صورتی‌که پینه‌های مشتق شده از ریزنمونه دمبرگ بیشتر سفید مایل به کرم و دارای ظاهری آبکی (شیشه‌ای) بودند. برای هر دو نوع ریزنمونه در تیمار کنترل هیچ‌گونه آثاری از پینه‌زایی مشاهده نشد. در تیمارهای هورمونی حاوی هورمون 2,4-D و نیز ترکیب هورمون 2,4-D و BAP، پینه‌زایی تقریباً به مقدار مساوی (ازنظر حجم) مشاهده شد. آثار اندام‌زایی (تولید ریشه) در پینه‌های حاصل از تیمارهای هورمونی حاوی هورمون 2,4-D و ترکیب دو هورمون مشاهده گردید (شکل ۱).



شکل ۱- پینه‌های مشتق شده از ریزنمونه‌های برگی با ساختار فشرده (سمت راست) و متمایل به تولید اندام ریشه (سمت چپ)

نتایج تجزیه آماری نشان داد که غلظت‌های مختلف هورمون 2,4-D و BAP تأثیر معنی‌داری روی پینه‌زایی و به‌ویژه صفت وزن پینه‌های بدست آمده از هر دو نوع ریزنمونه دارد (جدول ۱).

جدول ۱- پینه‌زایی از ریزنمونه‌های برگ و دمبرگ گیاه سنبل‌الطیب در شرایط تاریکی روی محیط حاوی غلظت‌های مختلف هورمون 2,4-D و BAP. داده‌ها میانگین حداقل سه تکرار می‌باشند.

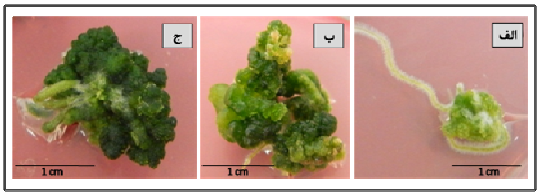
شماره محیط	غلظت BAP	غلظت 2,4.D	درصد پینه‌زایی از برگ	میانگین وزن پینه‌های برگ (gr)	درصد پینه‌زایی از دمبرگ	میانگین وزن پینه‌های دمبرگ (gr)
۱	۰	۰	۰ ± ۰ ^{c}	۰ ± ۰ ^{d}	۰ ± ۰ ^{b}	۰ ± ۰ ^{h}
۲	۰/۵	۰	۷۵ ± ۱۲/۵ ^{b}	۰/۰۱ ± ۰/۰۰۶ ^{d}	۱۰۰ ± ۰ ^{a}	۰/۰۲ ± ۰/۰۱۲ ^{f}
۳	۱	۰	۷۵ ± ۶/۲۵ ^{b}	۰/۰۱ ± ۰/۰۰۶ ^{d}	۱۰۰ ± ۰ ^{a}	۰/۰۱ ± ۰ ^{g}
۴	۰	۱	۱۰۰ ± ۰ ^{a}	۰/۱ ± ۰/۰۳۵ ^{c}	۹۱/۶۷ ± ۱۲/۵ ^{a}	۰/۰۷ ± ۰/۰۱ ^{e}
۵	۰/۵	۱	۱۰۰ ± ۰ ^{a}	۰/۱۹ ± ۰/۰۵۱ ^{b}	۱۰۰ ± ۰ ^{a}	۰/۱۲ ± ۰/۰۰۶ ^{c}
۶	۱	۱	۱۰۰ ± ۰ ^{a}	۰/۱۹ ± ۰/۰۱۲ ^{b}	۱۰۰ ± ۰ ^{a}	۰/۱۷ ± ۰/۰۱۵ ^{a}
۷	۰	۲	۱۰۰ ± ۰ ^{a}	۰/۱۱ ± ۰/۰۱ ^{c}	۱۰۰ ± ۰ ^{a}	۰/۰۹ ± ۰/۰۰۶ ^{d}
۸	۰/۵	۲	۱۰۰ ± ۰ ^{a}	۰/۱۷ ± ۰/۰۱۵ ^{b}	۱۰۰ ± ۰ ^{a}	۰/۱۶ ± ۰/۰۴۷ ^{b}
۹	۱	۲	۱۰۰ ± ۰ ^{a}	۰/۲۸ ± ۰/۰۲۶ ^{a}	۹۱/۶۷ ± ۱۲/۵ ^{a}	۰/۱۶ ± ۰/۰۲۱ ^{b}

حروف متفاوت روی داده‌ها نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار آنها در مقایسه با داده‌های همان ستون در سطح احتمال $P<$ ۰,۰۵ می‌باشند. غلظت هورمون‌ها براساس میلی‌گرم بر لیتر نشان داده شده است.

در ریزنمونه برگ، تمام ریزنمونه‌ها در محیط‌های حاوی 2,4.D پینه‌زایی نشان دادند و بطور کلی، اضافه کردن BAP در غلظت‌های مورد آزمایش، تأثیر مثبت روی رشد پینه و افزایش وزن آنها داشت (جدول ۱). در ریزنمونه دمبرگ، درصد پینه‌زایی در محیط‌های حاوی هر دو نوع هورمون اختلاف معنی‌داری نشان نداد، اما بالاترین وزن پینه در محیط حاوی یک میلی‌گرم در لیتر 2,4.D و یک میلی‌گرم در لیتر BAP بدست آمد (جدول ۱). بطور کلی، بیشترین درصد پینه‌زایی و وزن پینه در ریزنمونه برگی حاوی دو میلی‌گرم در لیتر 2,4.D و یک میلی‌گرم در لیتر BAP مشاهده گردید (جدول ۱). از جمع‌بندی این نتایج، به نظر می‌رسد که در دمبرگ غلظت اکسین‌های طبیعی گیاه سنبل-الطیب نسبت به برگ بالا بوده و ازاین‌رو در سطوح پایین-تری از اکسین خارجی به حد اشباع رسیده و غلظت‌های بالاتر، تأثیر منفی روی رشد پینه داشته است.

انتقال پینه‌های به دست آمده در شرایط تاریکی به محیط باززایی: جهت بررسی باززایی پینه‌های بدست آمده در شرایط تاریکی، نمونه‌های پینه از هر دو نوع ریزنمونه و از تیمارهایی که شکل ظاهری پینه‌ها زرد تیره و به نظر جنین-زا بود (محیط‌های شماره ۴، ۵، ۶، ۸ و ۹ براساس جدول شماره ۱)، به محیط باززایی (حاوی دو میلی‌گرم در لیتر هورمون BAP یا TDZ به تنهایی، و یا یک میلی‌گرم در لیتر از هرکدام) جهت القاء شاخه‌زایی انتقال داده شدند. پس از حدود یک هفته، رشد محسوس پینه‌ها قابل‌مشاهده بود و ظاهر آنها در اکثر تیمارها فشرده و به رنگ سبز تیره بودند (شکل ۲). از هفته دوم به بعد، آثار اندام‌زایی در تیمارها مشاهده گردید. بااین‌حال، اکثر اندام‌های تشکیل شده، ریشه‌های سفید و یا سبز تیره بوده و تشکیل اندام‌های هوایی تنها در تیمار دو میلی‌گرم بر لیتر TDZ به مقدار بسیار کم (۶ درصد) مشاهده شد.

باتوجه به اثر بهتر TDZ روی رشد پینه‌های سبزرنگ (شکل ۲)، تأثیر افزایش غلظت آن روی بهینه‌سازی باززایی اندام ساقه بررسی گردید. نتایج نشان داد که افزایش غلظت این هورمون، تأثیری روی باززایی اندام نداشته و تنها باعث افزایش سرعت رشد و حجم پینه‌ها می‌شود.



شکل ۲- رشد و اندام‌زایی از پینه‌های القا شده در تاریکی روی محیط‌های باززایی حاوی هورمون‌های BAP (۲ mg/l) (الف)، ترکیب BAP (۱ mg/l) و TDZ (۱ mg/l) (ب)، و TDZ (۲ mg/l) (ج).

القاء پینه و تولید پینه‌های جنین‌زا در شرایط روشنایی: برای بررسی اثر نور روی القای پینه و باززایی از سه نوع ریزنمونه گیاه سنبل‌الطیب (ریشه، برگ و دمبرگ)، آزمایشی دیگر با استفاده از همان نه نوع ترکیب هورمونی ذکر شده در جدول یک انجام شد.

نتایج آزمایش القای پینه در روشنایی نشان داد که در ریزنمونه برگی، محیط‌های حاوی تنها BAP قادر به القای کارآمد پینه در روشنایی نیستند (جدول ۲)، در صورتیکه، تمام ریزنمونه‌ها در محیط‌های حاوی 2,4.D و صرف‌نظر از وجود BAP، پینه‌زایی داشتند (جدول ۲). البته، رشد پینه در تیمارهای مختلف تفاوت معنی‌داری نشان داد (جدول ۲)، که بیشترین مقدار آن (۰/۴ گرم) در محیط حاوی یک میلی‌گرم در لیتر 2,4.D و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP بدست آمد.

در نمونه دمبرگ، در غلظت‌های بالای 2,4.D القای پینه انجام نشد (جدول ۲). این نتایج، موافق با نتایج بدست آمده از آزمایش تاریکی، نشان می‌دهد که احتمالاً تجمع اکسین‌های داخلی گیاه در دمبرگ بیشتر از برگ بوده، و به همین دلیل، زودتر از برگ به حالت اشباع ازنظر نیاز به اکسین خارجی برای تکثیر سلولی می‌رسد. برای این ریزنمونه، بیشترین پینه‌زایی و وزن پینه، در تیمار حاوی

تنها ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP بدست آمد. بااین‌حال، رشد پینه در ریزنمونه دمبرگ به‌مراتب ضعیف‌تر از رشد پینه-های بدست آمده از نمونه‌های برگی بود (جدول ۲) و بنابراین، ریزنمونه برگی برای ادامه کار مناسب‌تر تشخیص داده شد.

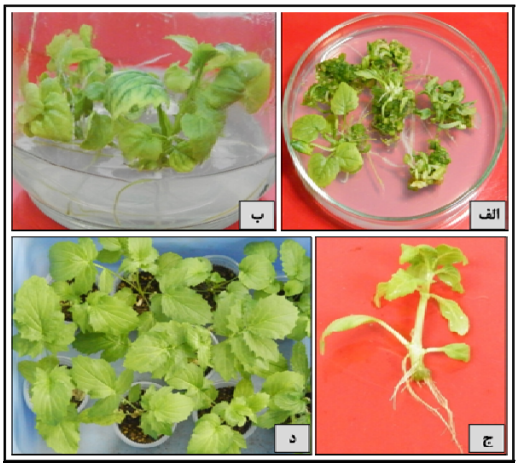
جدول ۲- پینه‌زایی از ریزنمونه‌های برگ و دمبرگ گیاه سنبل‌الطیب در شرایط روشنایی روی محیط حاوی غلظت‌های مختلف هورمون 2,4-D و BAP. داده‌ها میانگین حداقل سه تکرار می‌باشند.

شماره محیط	غلظت BAP	غلظت 2,4.D	درصد پینه‌زایی از برگ	میانگین وزن پینه‌های برگ (gr)	درصد پینه‌زایی از دمبرگ	میانگین وزن پینه‌های دمبرگ (gr)
۱	۰	۰	۰ ± ۰ c	۰ ± ۰ e	۰ ± ۰ b	۰ ± ۰ c
۲	۰/۵	۰	۰ ± ۰ c	۰ ± ۰ e	۸۸/۸۹ ± ۹/۶ a	۰/۰۳ ± ۰/۰۱۲ a
۳	۱	۰	۲۲/۲۲ ± ۱۷ b	۰/۰۰۵ ± ۰/۰۰۲ e	۸۸/۸۹ ± ۹/۶ a	۰/۰۲ ± ۰ b
۴	۰	۱	۱۰۰ ± ۰ a	۰/۱۵ ± ۰/۰۰۸ b	۱۱/۱۱ ± ۹/۶ b	۰ ± ۰ c
۵	۰/۵	۱	۱۰۰ ± ۰ a	۰/۴ ± ۰/۰۲۵ a	۶۶/۶۷ ± ۱۶/۶ a	۰ ± ۰ c
۶	۱	۱	۱۰۰ ± ۰ a	۰/۱۳ ± ۰/۰۰۵ b	۲۲/۲۳ ± ۹/۶ b	۰/۰۱ ± ۰/۰۱۵ bc
۷	۰	۲	۱۰۰ ± ۰ a	۰/۰۵ ± ۰/۰۰۵ d	۰ ± ۰ b	۰ ± ۰ c
۸	۰/۵	۲	۱۰۰ ± ۰ a	۰/۰۱ ± ۰/۰۰۳ e	۰ ± ۰ b	۰ ± ۰ c
۹	۱	۲	۱۰۰ ± ۰ a	۰/۱۱ ± ۰/۰۰۸ c	۰ ± ۰ b	۰ ± ۰ c

حروف متفاوت روی داده‌ها نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار آنها در مقایسه با داده‌های همان ستون در سطح احتمال P< ۰,۰۵ می‌باشند. غلظت هورمون‌ها براساس میلی‌گرم بر لیتر نشان داده شده است.

در خصوص ریزنمونه ریشه، نتایج قابل‌توجهی از القای پینه بدست نیامد و تنها محیط حاوی ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP بصورت ضعیف (حدود ۳۳ درصد) پینه‌زایی نشان داد و بنابراین، نتایج آن در جدول ۲ نیامده است.

انتقال پینه‌های به‌دست‌آمده در شرایط روشنایی به محیط باززایی: برای بررسی باززایی اندام ساقه از پینه‌های بدست‌آمده در روشنایی، قطعات ۰/۵ سانتی‌متری از پینه‌ها به محیط باززایی حاوی هورمون BAP با دو غلظت یک و سه میلی‌گرم در لیتر انتقال داده شدند. پس از چهار هفته، شاخه‌زایی در نمونه‌های کشت شده مشاهده شد (شکل ۳). درصد باززایی در محیط حاوی سه میلی‌گرم در لیتر BAP (۱۰۰ درصد) بطور معنی‌داری بیشتر از درصد باززایی در محیط حاوی یک میلی‌گرم در لیتر BAP (۳۰ درصد) بود. در هفته پنجم تا ششم، گیاهچه‌ها برای رشد بیشتر به ظرف شیشه‌ای حاوی محیط MS فاقد هورمون منتقل شدند (شکل ۳-الف). پس از دو هفته، گیاهچه‌ها رشد کرده و ریشه‌های کافی برای انتقال به خاک تولید کردند (شکل ۳- ب و ج). گیاهچه‌های منتقل شده به خاک دارای فنوتیپ عادی بوده و بصورت طبیعی در گلخانه رشد کردند (شکل ۳-د).



شکل ۳- باززایی ساقه و انتقال گیاهچه‌های تشکیل شده در محیط درون‌شیشه‌ای به محیط خاک. (الف) اندام‌زایی از پینه‌های القا شده در روشنایی روی محیط‌های باززایی حاوی سه میلی‌گرم در لیتر هورمون BAP. (ب) رشد و ریشه‌زایی گیاهچه‌های باززایی شده در محیط درون‌شیشه‌ای. (ج) گیاهچه رشد کرده حاوی ریشه، مناسب برای انتقال به خاک. (د) سازگاری گیاهچه‌های منتقل شده به خاک در گلخانه.

ازنظر تعداد سرشاخه‌های تشکیل شده به ازای هر ریزنمونه، اختلاف معنی‌داری بین دو تیمار دیده شد، و تیمار ۳ میلی‌گرم در لیتر با میانگین تعداد سرشاخه هفت عدد، بیشتر از تیمار یک میلی‌گرم در لیتر BAP با میانگین ۳/۵ بود.

بحث و نتیجه‌گیری

گیاه دارویی سنبل‌الطیب بانام علمی *Valeriana officinalis* به‌صورت سنتی و به طور گسترده در صنایع داروسازی ایران مورد استفاده قرار می‌گیرد(۱۸). تکنیک‌های کشت بافت و باززایی درون‌شیشه‌ای، علاوه بر ایجاد ابزار لازم برای تکثیر سریع و کم‌هزینه گیاهان دارویی، نقش بسیار مهمی، در نژادی مولکولی آنها با استفاده از تکنولوژی DNAی نوترکیب به‌ویژه در جهت بهبود بیوسنتز متابولیت‌های ثانویه دارویی دارند. تا بحال چندین گزارش از پینه‌زایی و اندام‌زایی از گیاه سنبل‌الطیب گزارش شده است که اکثراً تولید پینه و اندام‌زایی ریشه (۷، ۲۰و ۲۳) و در موارد محدودی تولید شاخه و اندام هوایی بوده است (۳). باتوجه به اهمیت دارویی این گیاه در ایران، بهینه-سازی پینه‌زایی و باززایی اندام ساقه از ریزنمونه‌های برگ و دمبرگ (با توجه به دسترسی آسان به این ریزنمونه‌ها) این گیاه در دو شرایط نوری (تاریکی و فتوپریود ۱۶ ساعت روشنایی/۸ ساعت تاریکی) بررسی شد. در شرایط تاریکی، تمام نمونه‌های برگ و دمبرگ در محیط‌های حاوی دو نوع هورمون BAP و 2,4.D پینه‌زایی نشان دادند (جدول۱). بااین‌حال، رشد پینه در تیمارهای مختلف متفاوت بود (شکل ۱). اثر هورمون‌های اکسین و سیتوکنین در تقسیم سلولی و تولید توده سلولی پینه شناخته شده است (۱۷و ۱۹). نکته جالب اینکه، رشد پینه‌های حاصل از ریزنمونه دمبرگ در محیط حاوی یک میلی‌گرم در لیتر BAP و یک میلی‌گرم در لیتر 2,4.D حداکثر بود و برخلاف ریزنمونه برگی، با افزایش غلظت اکسین در دمبرگ افزایش رشد و افزایش وزن پینه‌ها مشاهده نشد (جدول ۱). این مشاهده، توزیع قطبی و نامتقارن اکسین در اندام‌های دمبرگ و برگ گیاه را نشان می‌دهد که قبلاً در مطالعات دیگر برای کنترل صفات مختلف نیز به اثبات رسیده است (۹، ۱۱و ۲۲). پینه‌های ایجاد شده در تاریکی، قدرت باززایی ساقه روی محیط‌های مورد آزمایش را نداشتند. بااین‌حال، تولید ریشه و رشد پینه در تعدادی از محیط‌ها مطلوب بود (شکل ۲)، و از آنجا که در زمان باز کردن درب پتری‌دیش بوی غلیظی از نمونه‌ها احساس می-شد، به نظر تولید متابولیت‌های ثانویه فرار با کارآیی بالایی در این پینه‌ها ایجاد شده بود، پدیده‌ای که در پژوهش‌های قبلی نیز گزارش شده (۱، ۲و ۷) و نیاز به مطالعه بیشتر دارد.

برخلاف پینه‌های بدست آمده در تاریکی، پینه‌های القا شده در روشنایی روی همان محیط‌ها، قابلیت باززایی خوبی روی محیط‌های مورد آزمایش به‌ویژه محیط حاوی سه میلی‌گرم در لیتر BAP نشان دادند (شکل ۳). این نتایج نشان می‌دهد که تیمار روشنایی، در زمان پینه‌زایی، سیگنال‌هایی را، راه‌اندازی می‌کند که در ادامه راه برای باززایی ساقه مهم می‌باشند (۱۳و ۱۶). حداکثر تعداد شاخه به ازای نیم سانتی‌متر مربع از پینه‌های القا شده از نمونه‌های برگی در شرایط روشنایی، هفت شاخه بود که در تیمار سه میلی‌گرم در لیتر BAP بدست آمد. تمام گیاهچه‌های باززایی شده، به‌راحتی در محیط فاقد هورمون قادر به ریشه‌زایی بودند (شکل ۳) و استقرار و سازگاری آنها در محیط خاک و گلخانه با قابلیت بالایی (۱۰۰ درصد) انجام گرفت.

این نتایج، علاوه بردادن اطلاعات خوبی در خصوص تأثیر فاکتورهای شیمیایی (از قبیل هورمون‌ها) و فیزیکی (از قبیل نور) روی پتانسیل پینه‌زایی و اندام‌زایی از ریزنمونه-های مختلف گیاه سنبل‌الطیب، یک سیستم کارآمد باززایی کامل برای این گیاه معرفی می‌کند که می‌تواند در تکثیر

سریع رویشی، نگهداری ژرم‌پلاسم، و برنامه‌های اصلاح مولکولی از طریق مهندسی ژنتیک مورد استفاده قرار گیرد.

سپاسگزاری

نویسندگان مقاله از دانشگاه شهید مدنی آذربایجان برای حمایت مادی و معنوی این پژوهش قدردانی می‌نمایند.

منابع

۱- مفید بجنوردی، م.، اقدسی، م.، میان‌آبادی، م.، و نداف، م.، ۱۳۹۵. بهینه‌سازی تولید کالوس و تولید افدرین در گیاه افدرا (*Ephedra major*)، مجله پژوهش‌های گیاهی (مجله زیست-شناسی گیاهی ایران)، جلد ۲۹، شماره ۱، صفحات ۲۰۹-۱۹۹.

۲- رحمتی، ز.، پیام‌نور، و.، قاسمی بزدی، ک.، و ابراهیمی، پ.، ۱۳۹۶. مقایسه میزان تاکسول تولید شده در شرایط درون‌شیشه‌ای با بافتهای طبیعی گیاه. مجله پژوهش‌های گیاهی (مجله زیست-شناسی گیاهی ایران)، جلد ۳۰، شماره ۱، صفحات ۱۷۲-۱۵۹.

3- Abdi, G. H., and Khosh-Khui, M., 2007. Shoot regeneration via direct organogenesis from leaf segments of valerian (*Valeriana officinalis* L.). International Journal of Agricultural Research, 2, PP: 877-882.

4- Caudal, D., Guinobert, I., Lafoux, A., Bardot, V., Cotte, C., Ripoche, I., Chalard, P., and Huchet, C., 2018. Skeletal muscle relaxant effect of a standardized extract of *Valeriana officinalis* L. after acute administration in mice. Journal of Traditional and Complementary Medicine, 8, PP: 335-340.

5- de Oliveria, D. M., Barreto, G., De Andrade, D. V., Saraceno, E., Aon-Bertolino, L., Capani, F., Dos Santos, E., Bacha, R., and Giraldez, L. D., 2009. Cytoprotective effect of *Valeriana officinalis* extract on an in vitro experimental model of Parkinson disease. Neurochemical Research, 34, PP: 215-220.

6- Dugaheh, M. A., Meisami, F., Torabian, Z., and Sharififar, F., 2013. Antioxidant effect and study of bioactive components of *Valeriana sisymbriifolia* and *Nardostachys jatamansii* in comparison to *Valeriana officinalis*. Pakistan journal of pharmaceutical sciences, 26, PP: 53-58.

7- Ekhteraei, T. S., Radjabian, T., Ebrahimzadeh, H., and Niknam, V., 2010. Enhanced production of valerenic acids and valpotriates by *in vitro* cultures of *Valeriana officinalis* L. International Journal of Plant Production, 4, PP: 209-222.

8- Fernandez, S., Wasowski, C., Paladini, A. C., and Marder, M., 2004. Sedative and sleep-enhancing properties of linarin, a flavonoid-isolated fromValeriana officinalis. Pharmacology Biochemistry and Behavior, 77, PP: 399-404.

9- Grant, M. R., and Jones, J. D., 2009. Hormone (dis)harmony moulds plant health and disease. Science, 324, PP: 750-752.

10- Hattesohl, M., Feistel, B., Sievers, H., Lehnfeld, R., Hegger, M., and Winterhoff, H., 2008. Extracts of *Valeriana officinalis* L. s.l. show anxiolytic and antidepressant effects but neither sedative nor myorelaxant properties. Phytomedicine, 15, PP: 2-15.

11- Immanen, J., Nieminen, K., Smolander, O. P., Kojima, M., Alonso Serra, J., Koskinen, P., Zhang, J., Elo, A., Mähönen, A. P., Street, N., Bhalerao, R. P., Paulin, L., Auvinen, P., Sakakibara, H., and Helariutta, Y., 2016. Cytokinin and auxin display distinct but interconnected distribution and signaling profilesto stimulate cambial activity. Current Biology, 26, PP: 1990-1997.

12- Jung, H. Y., Yoo, D. Y., Kim, W., Nam, S. M., Kim, J. W., Choi, J. H., Kwak, Y. G., Yoon, Y. S., and Hwang, I. K., 2014. *Valeriana officinalis* root extract suppresses physical stress by electric shock and psychological stress by nociceptive stimulation-evoked responses by decreasing the ratio of monoamine neurotransmitters to their metabolites. BMC Complementary and Alternative Medicine, 14, 476 p.

13- Motte, H., Vereecke, D., Geelen, D., and Werbrouck, S., 2014. The molecular path to *in vitro* shoot regeneration. Biotechnology Advances, 32, PP: 107-121.

14- Murashige, T., and Skoog, F., 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. Physiologia plantarum, 15, PP: 473-497.

15- Nam, S. M., Choi, J. H., Yoo, D. Y., Kim, W., Jung, H. Y., Kim, J. W., Kang, S. Y., Park, J., Kim, D. W., Kim, W. J., Yoon, Y. S., and Hwang, I. K., 2013. *Valeriana officinalis* extract and its main component, valerenic acid, ameliorate D-galactose-induced reductions in memory, cell proliferation, and neuroblast differentiation by reducing corticosterone levels and lipid peroxidation. Experimental Gerontology, 48, PP: 1369-1377.

16- Nameth, B., Dinka, S. J., Chatfield, S. P., Morris, A., English, J., Lewis, D., Oro, R., and Raizada, M. N., 2013. The shoot regeneration capacity of excised Arabidopsis cotyledons is established during the initial hours after injury and is modulated by a complex genetic network of light signalling. Plant, Cell & Environment, 36, PP: 68-86.

17- Pernisova, M., Kuderova, A., and Hejatko, J., 2011. Cytokinin and auxin interactions in plant development: metabolism, signalling, transport and gene expression. Current Protein & Peptide Science, 12, PP: 137-147.

18- Safaralie, A., Fatemi, S., and Sefidkon, F., 2008. Essential oil composition of *Valeriana officinalis* L. roots cultivated in Iran. Comparative analysis between supercritical CO_2 extraction and hydrodistillation. Journal of Chromatography A, 1180, PP: 159-164.

19- Schaller, G. E., Bishopp, A., and Kieber, J. J., 2015. The yin-yang of hormones: cytokinin and auxin interactions in plant development. Plant Cell, 27, PP: 44-63.

20- Shekarchian, A., Rahmani, G. H., Kudori, M. R., and Zeidabadi, D. D., 2016. Direct embryogenesis of Valerian (*Valeriana officinalis* L.) using leaf segments. Journal of Biodiversity and Environmental Sciences, 9, PP: 113-120.

21- Tansaz, M., Zamani, A., and Otroshy, M., 2014. Rapid in vitro shoot regeneration of *Valeriana officinalis*. Plant Tissue Culture and Biotechnology, 24, PP: 263-271.

22- Teribia, N., Tijero, V., and Munne-Bosch, S., 2016. Linking hormonal profiles with variations in sugar and anthocyanin contents during the natural development and ripening of sweet cherries. New Biotechnology, 33, PP: 824-833.

23- Zebarjadi, A. R., Najafi, S. H., Ghasempour, H. R., and Motamedi, J., 2011. Establishment of a practical tissue culture for producing hairy roots of *Valeriana officinalis* L. via *Agrobacterium rhizogenes.* Journal of Medicinal Plants Research, 5, PP: 4984-4992.

Optimization of tissue culture and regeneration in Valerian (*Valeriana officinalis*) medicinal plant

Pashmforoosh N. and Ahmadabadi M.

Dept. of Biotechnology, Faculty of Agriculture, Azarbaijan Shahid Madani University, Azarbaijan, I.R. of Iran

Abstract

Valerian is one of the most important herbs in Iran. Regarding the importance of this plant in traditional and industrial medicine, in this research, optimization of tissue culture, callus induction, and regeneration of whole plant from two types of leaf and petiole explants were evaluated on various hormone combinations. The results showed that the leaf segment is more suitable for callugenesis in both light and dark conditions. The highest amount of callus was obtained in light conditions for the leaf explant cultured on the medium containing 0.5 mg/L BAP and 1 mg/L BAP. Dark-induced calli did not show the potential to shoot regeneration on tested media containing different concentrations of BAP and TDZ, and only callus growth and root formation was observed. The light-induced calli from the leaf explants had a good potential to regenerate shoots on the regeneration medium. Maximum mean number of shoots was observed in the regeneration medium containing 3 mg/L BAP. These results provided basic information on the effects of some physical and chemical factors on the tissue culture and regeneration of Valerian. Also, we introduce an efficient system for shoot regeneration in this plant that can be used in molecular breeding programs using genetic engineering techniques.

Key words: Valerian, Callus induction, *in vitro* regeneration, *Valeriana officinalis*