زیست‌شناسی گیاهی، سال سوم، شماره دهم، زمستان ۱۳۹۰، صفحه ۱۱-۲۲
تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۸۹/۱۲/۱۸
تاریخ بررسی مجدد: ۱۳۹۰/۰۴/۲۲
تاریخ پذیرش نهایی: ۱۳۹۰/۰۷/۳۰

تولید کالوس و باززایی گیاه *Papaver pseudo-orientale* در شرایط کشت درون شیشه

مریم حقیقت حور، رسول اصغری زکریا * و ناصر زارع
گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل، ایران

چکیده

گونه *Papaver pseudo-orientale* از بخش Oxytona جنس *Papaver* منبع مهمی برای آلکالوئیدها مانند ایزوتبائین است. در این پژوهش تولید کالوس و باززایی درون شیشه‌ای این گونه از ریز نمونه‌های هیپوکوتیل-کوتیلدون در محیط‌کشت پایه موراشیگ و اسکوگ (MS) و گامبورگ (B5) حاوی سطوح مختلف نفتالین استیک اسید (NAA)، کینتین (Kin) و یا بنزیل آدنین (BA) در دمای ۲۰ درجه سانتیگراد و دوره نوری ۱۶ ساعت روشنایی بررسی شد. تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که بین محیط‌های مختلف کشت از لحاظ درصد کالوس‌زایی، وزن تر کالوس، درصد ساقه‌زایی، وزن تر ساقه، درصد ریشه‌زایی و وزن تر ریشه اختلاف معنی‌داری ($P<0.01$) وجود دارد. محیط‌کشت مناسب برای تولید کالوس در گونه *P. pseudo-orientale* محیط‌کشت MS حاوی ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر از هورمون‌های بنزیل آدنین (BA) و نفتالین استیک اسید (NAA) و محیط‌کشت B5 حاوی ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر کینتین (Kin) و ۱ میلی‌گرم بر لیتر نفتالین استیک اسید (NAA) بود. محیط‌کشت B5 حاوی هورمون‌های کینتین (Kin) و نفتالین استیک اسید (NAA) هر کدام به مقدار ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر مناسب‌ترین محیط‌کشت برای باززایی در این گونه بود.

واژه‌های کلیدی: باززایی، تولید کالوس، کشت درون شیشه‌ای، هورمون‌های گیاهی، *Papaver pseudo-orientale*

مقدمه

گیاهان به عنوان منبع مهمی برای داروها، نقش کلیدی در سلامت مردم جهان دارند و بسیاری از مواد دارویی با ارزش جزو متابولیت‌های ثانویه گیاهان هستند (Constabel, 1990). در برخی موارد سنتز مصنوعی این مواد مشکل است و یا اینکه تولید مصنوعی آنها از لحاظ اقتصادی مقرون به صرفه نیست. در چنین مواردی، استفاده از کشت بافت و سلول گیاهی ابزار قدرتمندی برای تولید متابولیت‌های ثانویه محسوب می‌شود (Ravishankar and Venkataraman, 1998).

*نویسنده مسؤول: نشانی پست الکترونیک: rasghari@uma.ac.ir، شماره تماس: ۰۴۵۱۵۵۱۲۰۸۹

Archive of SID
www.SID.ir

تولید گیاهان دارویی در سیستم درون شیشه‌ای، مواد گیاهی یک شکل و استریل را فراهم می‌کند (Miura *et al.*, 1987).

جنس Papaver که مهمترین جنس تیره Papaveraceae است، دارای چندین گروه آلکالوئیدی مهم است که در داروسازی اهمیّت زیادی دارند (Furst and Hosztafi, 1998). *P. pseudo-orientale* گیاهی هگزاپلوئید با ۲n=۴۲ کروموزوم است که از تلاقی دو گونه *P. Bracteatum* و *P. orientale* ایجاد شده است که به همراه دو گونه فوق به بخش درون جنسی Oxytona تعلق دارد (Goldblatt, 1974). برگ‌های این گونه در قسمت میانی ساقه قرار گرفته‌اند و گلبرگ‌های آن به رنگ قرمز مایل به نارنجی دیده می‌شود و گل‌ها اغلب دارای براکته هستند (Mihalik, 1998). آلکالوئید اصلی موجود در این گونه ایزوتبائین است که اثر آرام‌بخشی دارد (Sariyar, 2002; Tétényi, 1986). در این گونه آلکالوئیدهای دیگری نظیر اورینتالیدین، مکرانتالین، سلیوتاریدین نیز وجود دارند (Sariyar and Baytop, 1980).

در کشت بافت *Papaver* از محیط کشت‌های MS (Murashige and Skooge, 1962) و B5 (Gamborg *et al.* 1968) استفاده شده است (Daneshvar, 2005; Rostampour *et al.*, 2010). Day و همکاران (۱۹۸۶) به طور موفقیت‌آمیز گیاهانی را از کشت کالوس‌های دو واریته گونه *P. bracteatum* تولید کردند. مطالعات Ilahi و Ghauri (۱۹۹۴) نشان داد که اضافه کردن ۲، ۴ دی کلرو فنوکسی استیک اسید (2,4-D) به مقدار ۱ میلی‌گرم بر لیتر به همراه بنزیل آدنین (BA) به مقدار ۰/۵ یا ۱ میلی‌گرم بر لیتر به محیط کشت نصف MS باعث ایجاد کالوس در *P. bracteatum* می‌شود، اما کالوس‌های ایجاد شده پس از گذشت چند هفته قهوه‌ای شده، اندام‌زایی در آنها صورت نمی‌گیرد.

Kamo و همکاران (۱۹۸۲) در گیاه *P. somniferum* توانستند با استفاده از محیط کشت MS حاوی هورمون IPA (ایزوپنتینل آدنین) یا کینتین (Kin) ساقه و در محیط کشت MS حاوی نفتالین استیک اسید (NAA) و Kin ریشه تولید کنند. آنها همچنین نشان دادند که بافت کالوس کمتر از ساقه‌های باززایی شده دارای آلکالوئیدهای مورفین‌دار بوده، تولید آلکالوئیدها تحت تأثیر بافت و اندام‌های تمایز یافته قرار می‌گیرد؛ به طوری که مورفین فقط در ساقه‌های تمایز یافته ساخته می‌شود.

حضور آلکالوئیدهای مورفین‌دار (مورفین، نیکوتین و تبائین) در کشت بافت *P. somniferum* توسط Galewsky و Nessler (۱۹۸۶) گزارش شده است. Swankar و Bohra (۱۹۸۹) نیز گزارش کردند که 2,4-D از تولید ساقه جلوگیری می‌کند، اما Kin و اندول استیک اسید (IAA) باعث تولید ساقه در *P. somniferum* می‌شوند. Ovecka و همکاران (۱۹۹۸) توانستند جنین سوماتیکی را در *P. somniferum* در محیط کشت پایه MS حاوی ترکیب‌های مختلف از هورمون‌های کینتین و NAA تولید کنند. Kaya و Lockwood (۱۹۹۹) نیز تفاوت بین واریته‌ای را از لحاظ تولید کالوس در محیط کشت‌های MS و گامبورگ حاوی غلظت‌های مختلف Kin و 2,4-D در گونه *P. somniferum* گزارش نمودند.

Archive of SID

www.SID.ir

مشاهدات Abdelmajid و Jacquin (۲۰۰۱) نشان داد که در *P. somniferum* ریزنمونه‌های برگرفته از هیپوکوتیل و کوتیلدون هر دو جنین سوماتیکی تولید می‌کنند، اما در مورد *P. orientale* فقط ریزنمونه‌های برگرفته از کوتیلدون جنین سوماتیکی تولید می‌کنند. سنجش از طریق HPLC نشان داد که ریشه‌های هر دو گونه کدئین، تبائین و پاپاورین می‌سازند، اما مورفین تنها در بخش‌های هوایی ساخته می‌شود.

در حال حاضر، استفاده بی‌رویه از ذخایر ژنتیکی، به ویژه گیاهان دارویی به آسیب‌پذیری منابع طبیعی منجر شده است. یکی از راهکارهای امیدبخش و موفق در این زمینه تولید متابولیت‌های ثانویه و ترکیبات دارویی گیاهی در شرایط آزمایشگاهی و سیستم راکتورهای زیستی گیاهی است، که با فراهم آوردن امکان کنترل دقیق‌تر عوامل مؤثر در تولید بیشتر این متابولیت‌های ثانویه در موارد متعددی به تولید اقتصادی ترکیبات مهم گیاهی منتج شده است (Tisserat and Berhow, 2009; Paek *et al.*, 2005). علاوه بر این، مهندسی ژنتیک گیاهی ابزار مفیدی را برای مهندسی مسیرهای متابولیکی در جهت افزایش تولید متابولیت‌های مهم گیاهی فراهم می‌کند. پیش نیاز اصلی و مهم در همه این موارد، وجود یک سیستم بهینه کالوس‌زایی و باززایی در هر یک از اکوتیپ‌های گیاه مورد نظر است. با توجه به مطالعات محدود در مورد کالوس‌زایی و باززایی گیاه دارویی *P. pseudo-orientale* در شرایط درون شیشه‌ای، به ویژه در مورد توده‌های بومی ایران، این پژوهش با هدف ارزیابی اثر محیط‌های مختلف کشت و نوع و غلظت‌های مختلف تنظیم‌کننده‌های رشد بر کالوس‌زایی و باززایی این گیاه دارویی انجام گرفت. یافته‌های این مطالعه می‌تواند در استحصال آلکالوئید ایزوتبائین تحت شرایط آزمایشگاهی مفید باشد.

مواد و روش‌ها

بذرهای گونه *P. pseudo-orientale* جمع‌آوری شده از اطراف شهرستان خلخال استان اردبیل (N ۳۷° ۳۵´ ۱۲"، E ۴۸° ۳۷´ ۵۰") پس از شستشو با آب معمولی به مدت چند دقیقه، با آب مقطر شستشو داده شدند. سپس به مدت ۳۰ ثانیه در الکل ۷۰ درصد غوطه‌ور شده، ۳ بار با آب مقطر استریل شسته شدند. سپس در محلول هیپوکلریت سدیم ۱ درصد به مدت ۳۰ دقیقه ضدعفونی سطحی شدند و در پایان ۳ بار با آب مقطر استریل شستشو داده شدند. سپس بذرها در محفظه هود و تحت شرایط استریل ۵ بار با آب مقطر استریل شستشو داده شده، در محیط کشت MS کشت شدند. ظروف، پس از پوشش در اتاقک رشد در شرایط دمایی ۲۰ درجه سانتیگراد و ۱۶ ساعت روشنایی با شدت نور ۵۰ میلی‌مول بر متر بر ثانیه و ۸ ساعت تاریکی قرار داده شدند.

پس از اینکه گیاهچه‌های بذری به اندازه ۲۰ میلی‌متر رشد کردند، برای انتقال به محیط‌های کشت MS (Murashige and Skooge, 1962) و B5 (Gamborg *et al.*, 1968) حاوی ۳۰ گرم بر لیتر سوکروز، ۱۵ میلی‌گرم بر لیتر آسکوربیک اسید و ۸ گرم بر لیتر آگار به همراه غلظت‌های مختلف هورمون‌های اکسین و سیتوکینین، pH=۵/۷ (جدول ۱) برای کالوس‌زایی انتخاب شدند. بخش هیپوکوتیل-کوتیلدون گیاهچه به عنوان ریزنمونه استفاده شد؛ به این ترتیب که قسمت بالای گیاهچه که شامل هیپوکوتیل و کوتیلدون بود، در

Archive of SID

www.SID.ir

ظروف پتری حاوی ترکیب‌های هورمونی مختلف کشت شد. سپس اطراف ظروف پتری با پارافیلم پوشانده شده، به اتاقک رشد منتقل شدند و بازکشت هر ۲۰ روز یک بار انجام شد. شایان ذکر است که محیط‌کشت پایه MS و B5 بدون هورمون نیز به عنوان شاهد در آزمایش استفاده شد که ریزنمونه های مورد استفاده کالوس تولید نکرده، پس از دو هفته از بین رفتند.

پس از تولید کالوس، درصد کالوس‌زایی در محیط‌های مختلف کشت محاسبه شد و پس از اینکه کالوس‌ها به حد کافی رشد کردند (پس از گذشت دو ماه) وزن تر کالوس‌ها اندازه‌گیری شد. در مراحل بعدی درصد ساقه‌دهی، وزن ساقه، درصد ریشه‌دهی و وزن ریشه اندازه‌گیری شد.

تجزیه و تحلیل داده‌ها در مرحله تولید کالوس به صورت آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با حداقل ۳ تکرار و مقایسه میانگین صفات به روش SNK (Student-Newman, Keuls test) انجام شد. به علت عدم تولید ساقه و ریشه در تعداد زیادی از محیط‌های کشت و عدم امکان توزیع نرمال داده‌ها، در تجزیه واریانس صفات درصد ساقه‌زایی، وزن تر ساقه، درصد ریشه‌زایی و وزن تر ریشه، فقط محیط‌های کشتی که ساقه یا ریشه در آنها تولید شده بود، به صورت طرح کاملاً تصادفی استفاده شد. نرم‌افزارهای آماری Excel و SPSS نسخه ۱۶ برای تجزیه آماری استفاده شدند.

جدول ۱- نوع محیط‌کشت و ترکیب هورمونی استفاده شده برای تولید کالوس، ساقه و ریشه

محیط‌کشت MS حاوی				محیط‌کشت B5 حاوی			
شماره	BA (mg/l)	Kin (mg/l)	NAA (mg/l)	شماره	BA (mg/l)	Kin (mg/l)	NAA (mg/l)
۱	۰/۵	۰	۰/۵	۱	۰/۵	۰	۰/۵
۲	۰/۵	۰	۱	۲	۰/۵	۰	۱
۳	۱	۰	۰/۵	۳	۱	۰	۰/۵
۴	۱	۰	۱	۴	۱	۰	۱
۵	۰	۰/۵	۰/۵	۵	۰	۰/۵	۰/۵
۶	۰	۰/۵	۱	۶	۰	۰/۵	۱
۷	۰	۱	۰/۵	۷	۰	۱	۰/۵
۸	۰	۱	۱	۸	۰	۱	۱

نتایج

ریزنمونه‌های کشت شده پس از گذشت یک هفته در تعدادی از محیط‌های کشت شروع به تولید کالوس کردند. در محیط‌کشت MS حاوی ۱ میلی‌گرم بر لیتر BA یا Kin و ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر NAA و محیط‌کشت B5 حاوی ۱ میلی‌گرم بر لیتر Kin و ۱ میلی‌گرم بر لیتر NAA کالوس تولید نشد و ریزنمونه‌ها پس از گذشت چند روز از بین رفتند. تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که اختلاف معنی‌داری از لحاظ درصد کالوس‌زایی بین غلظت‌های مختلف اکسین (NAA در غلظت‌های ۰/۵ و ۱ میلی‌گرم بر لیتر)، نوع و غلظت‌های متفاوت سیتوکینین (Kin و BA در غلظت‌های ۰/۵ و ۱

Archive of SID

www.SID.ir

میلی‌گرم بر لیتر) و همچنین تأثیرات متقابل آنها در سطح احتمال یک درصد وجود دارد (جدول ۲). محیط‌کشت MS حاوی ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر BA و ۰/۵ یا ۱ میلی‌گرم بر لیتر NAA با حدود ۷۰ درصد و محیط‌کشت B5 حاوی ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر Kin و ۱ میلی‌گرم بر لیتر NAA با ۷۵/۵ درصد کالوس‌زایی، محیط‌های کشت مناسبی برای کالوس‌زایی بودند (جدول ۴). برای تولید کالوس بین محیط‌کشت‌های MS و B5 تفاوت معنی‌داری وجود نداشت، ولی کاربرد ۱ میلی‌گرم بر لیتر NAA نسبت به ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر NAA، ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر Kin نسبت به ۱ میلی‌گرم بر لیتر Kin و ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر BA نسبت به ۱ میلی‌گرم بر لیتر BA تأثیر بیشتری برای تولید کالوس در این گونه داشتند. رشد کالوس‌ها در محیط‌های مختلف کشت متفاوت بود و در برخی از محیط‌ها رشد بیشتری نسبت به محیط‌های دیگر مشاهده شد. محیط‌کشت MS حاوی ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر BA و ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر NAA و محیط‌کشت B5 دارای ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر Kin و ۱ میلی‌گرم بر لیتر NAA بهترین محیط‌کشت برای رشد کالوس بودند (جدول ۴).

پس از گذشت دو ماه از کشت، کالوس‌های تولید شده در برخی از محیط‌های کشت، شامل محیط‌های کشت $B5_5$، $B5_4$، $B5_3$، MS_6، MS_5، MS_2 و MS_1 (جدول ۱) ساقه تولید کردند (شکل ۱، ج و د) که درصد ساقه‌زایی در این ۷ محیط‌کشت متفاوت بود. در محیط‌کشت‌هایی که ساقه تولید نشد کالوس‌ها قهوه‌ای شده، از بین رفتند. تجزیه واریانس نشان داد که اختلاف معنی‌داری از لحاظ درصد ساقه‌زایی بین محیط‌های مختلف کشت وجود دارد (جدول ۳). محیط‌کشت B5 حاوی ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر Kin و ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر NAA با ۸۶/۱ درصد ساقه‌دهی و وزن تر ساقه بیشتر، مناسب‌ترین محیط‌کشت برای تولید ساقه در این گونه بود (جدول ۴). در محیط‌کشت MS حاوی ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر Kin و ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر NAA نیز ۷۳ درصد ساقه‌دهی و وزن تر ساقه بیشتری مشاهده شد (جدول ۴).

پس از گذشت سه ماه از کشت ریزنمونه، پس از بازکشت کالوس‌های ساقه‌دار، ریشه‌دهی در محیط‌های کشت حاوی غلظت‌های مختلف کینتین شامل محیط‌های کشت $B5_7$، $B5_6$، $B5_5$، MS_6 و MS_5 (جدول ۱) مشاهده شد، اما در محیط‌های کشت دارای هورمون BA ریشه تولید نشد. می‌توان نتیجه گرفت که سیتوکینین مناسب برای تولید ریشه در این گونه، کینتین به مقدار ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر است. تجزیه واریانس نشان داد که اختلاف معنی‌داری از نظر درصد تولید ریشه بین محیط‌های مختلف کشت وجود دارد (جدول ۳). محیط‌کشت B5 حاوی ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر Kin و ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر NAA با ۵۲ درصد ریشه‌دهی و بیشترین وزن تر ریشه، بهترین محیط‌کشت برای تولید ریشه بود (جدول ۴). برگ و ریشه حاصل از کالوس در شکل ۱ (ز و ح) نشان داده شده است. گیاهان باززا شده از نظر مورفولوژیک کاملاً مشابه گیاهان والدی بوده، هیچ گونه خصوصیات ظاهری غیرطبیعی مانند تغییر شکل برگ‌ها، ابلق بودن و غیره نشان ندادند.

Archive of SID

www.SID.ir

بحث

در این مطالعه، NAA به عنوان اکسین در ترکیب با غلظت‌های مختلف سیتوکینین شامل BA و Kin به طور جداگانه برای تولید کالوس و باززایی گیاه *P. pseudo-orientale* استفاده شد. برای تولید کالوس در این گیاه، وجود هورمون‌های گیاهی در محیط‌کشت ضروری است؛ به طوری که در محیط‌های فاقد هورمون ریزنمونه‌های مورد استفاده کالوس تولید نکرده، از بین رفتند. هورمون‌های گیاهی اکسین و سیتوکینین به طور گسترده در کشت بافت گیاهی برای تولید کالوس و باززایی استفاده می‌شوند (Gang *et al*., 2003). وجود اثر متقابل معنی‌دار بین نوع محیط کشت و غلظت و نوع سیتوکینین (جدول ۲) نشان می‌دهد که بسته به نوع محیط‌کشت پایه مورد استفاده، غلظت و نوع سیتوکینین مورد نیاز برای به دست آوردن حداکثر کالوس‌زایی متفاوت است؛ به طوری که در محیط‌کشت MS حاوی ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر BA حداکثر کالوس‌زایی مشاهده شد، در حالی که در محیط‌کشت B5 حداکثر درصد تولید کالوس در محیط حاوی ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر Kin اتفاق افتاد (جدول ۴).

جدول ۲- جدول تجزیه واریانس برای صفات درصد کالوس‌زایی و وزن تر کالوس بر اساس آزمایش فاکتوریل. **: معنی‌دار در سطح احتمال ۱ درصد و ns معنی‌دار نیست.

منابع تغییر	درصد کالوس‌زایی		وزن تر کالوس	
	درجه آزادی	میانگین مربعات	درجه آزادی	میانگین مربعات
محیط‌کشت	۱	۱۳/۵^{ns}	۱	۹۳۵۰۳**
اکسین	۱	۱۹۴۵**	۱	۷۱۱۰۳**
سیتوکینین	۳	۳۹۴۰**	۳	۶۳۰۰۲۳**
محیط‌کشت × اکسین	۱	۲۱۶۲**	۱	۴۰۹۹۸۲**
محیط‌کشت × سیتوکینین	۳	۳۱۸**	۳	۲۷۷۱۸۷**
اکسین × سیتوکینین	۳	۱۵۵۲**	۳	۱۸۰۱۳۳**
محیط‌کشت × اکسین × سیتوکینین	۳	۱۷۹۸**	۳	۳۶۶۴۷۴**
خطا	۳۲	۶۴/۱	۶۴	۲۲۶۱
ضریب تغییرات (٪)		۱۹/۶		۱۰/۹

جدول ۳- جدول تجزیه واریانس محیط‌های مختلف کشت بر اساس طرح کاملاً تصادفی برای صفات مختلف مورد مطالعه در باززایی

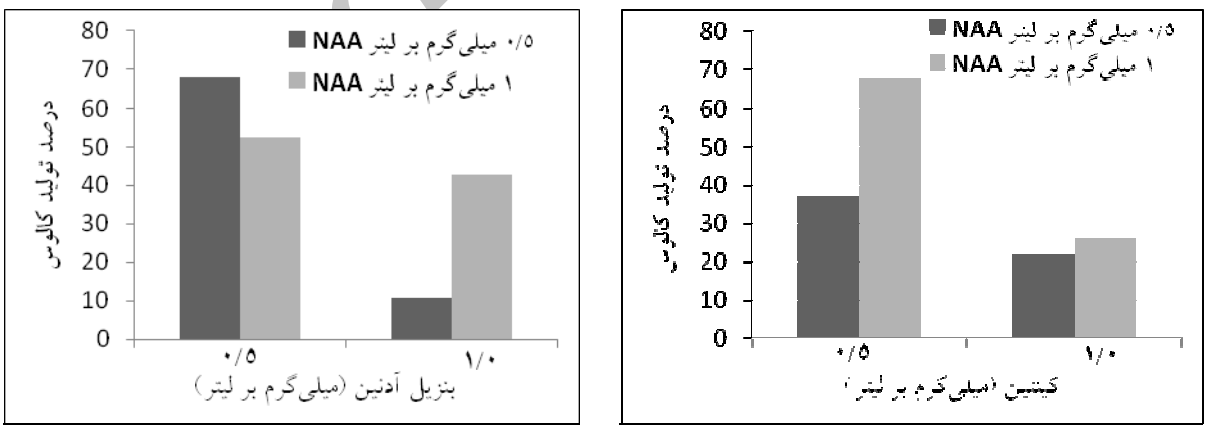
منبع تغییر	درصد ساقه‌دهی		وزن تر ساقه (mg)		درصد ریشه‌دهی		وزن تر ریشه (mg)	
	df	MS	df	MS	df	MS	df	MS
محیط‌کشت	۶	۲۴۳۱**	۶	۱۸۴۲۵**	۴	۵۳۴/۷**	۴	۱۸۵/۸**
خطا	۱۴	۷۵/۸	۲۸	۲۴۷۷	۱۰	۲۲/۵	۲۰	۵/۴
ضریب تغییرات (٪)		۱۷/۸۳		۶/۵۷		۱۳/۷۶		۱۱/۶۶

Archive of SID

www.SID.ir

جدول ۴- مقایسه میانگین محیط‌های مختلف کشت با ترکیب‌های هورمونی متفاوت برای صفات درصد کالوس‌زایی، وزن تر کالوس، درصد ساقه‌زایی، وزن تر ساقه، درصد ریشه‌زایی و وزن تر ریشه در گونه *P. pseudo-orientale*

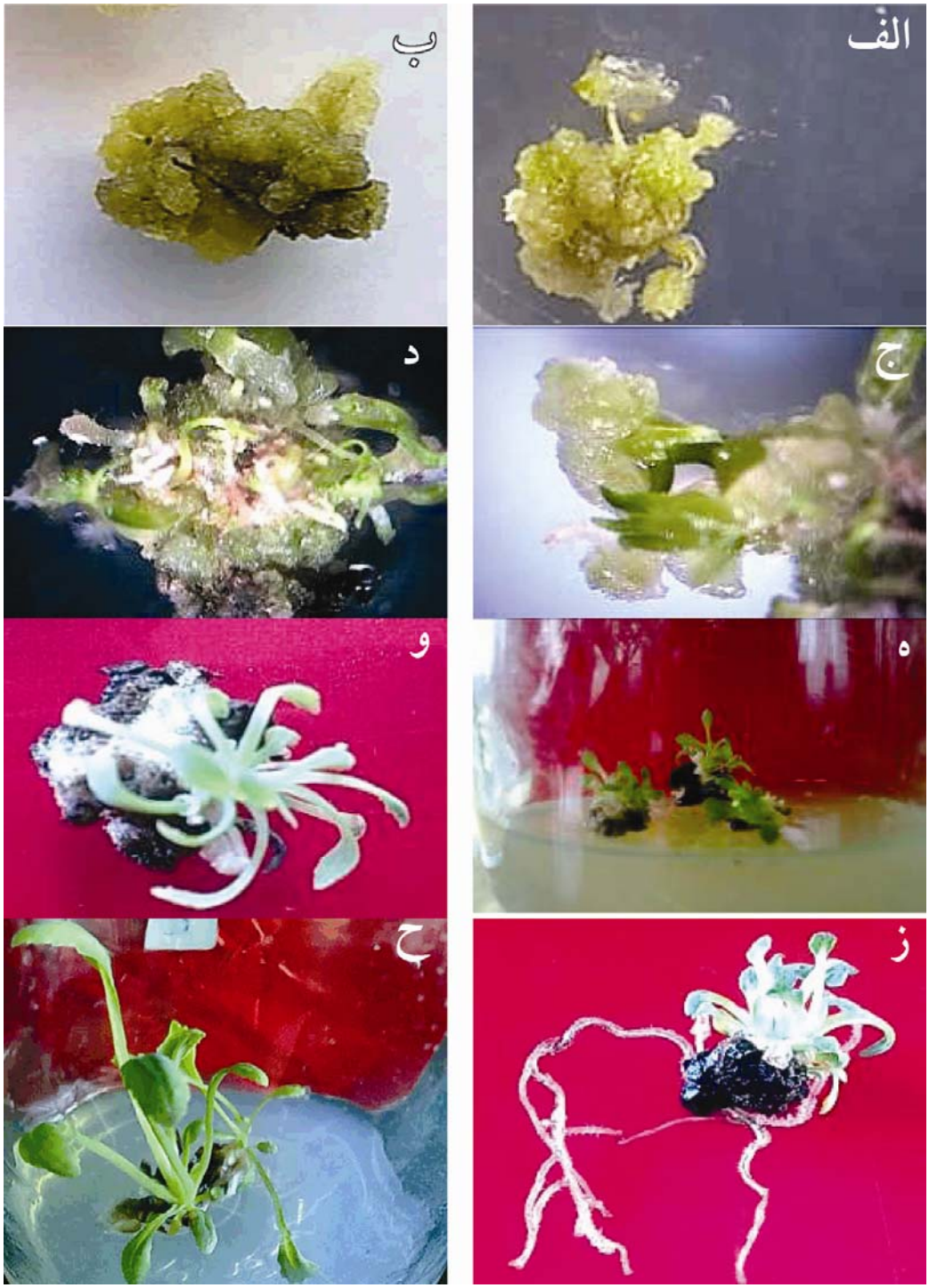
محیط‌های کشت	درصد کالوس‌زایی	وزن تر کالوس (mg)	درصد ساقه‌زایی	وزن تر ساقه (mg)	درصد ریشه‌زایی	وزن تر ریشه (mg)
MS+۰/۵BA+۰/۵NAA	۷۰ a	۸۱۰/۲ a	۱۵/۱ e	۶۸۲/۲ c	۰	۰
MS+۰/۵BA+۱NAA	۶۰/۹ ab	۶۸۷/۲ b	۵۵/۶ c	۷۶۴/۴ bc	۰	۰
MS+۱BA+۰/۵NAA	۰	۰	۰	۰	۰	۰
MS+۱BA+1NAA	۴۱/۱ d	۳۳۰ f	۰	۰	۰	۰
MS+۰/۵Kin+۰/۵NAA	۳۸/۵ d	۳۸۷/۸ ef	۷۳/۳ b	۷۶۲/۸ bc	۱۶/۴ d	۱۵/۴ c
MS+۰/۵ Kin +۱NAA	۵۹/۳ bc	۵۴۰/۶ c	۶۳/۹ bc	۷۶۲/۲ bc	۲۷/۸ c	۱۷/۶ bc
MS+۱Kin +۰/۵NAA	۰	۰	۰	۰	۰	۰
MS+۱Kin +1NAA	۵۱/۸ bcd	۴۵۱/۴ de	۰	۰	۰	۰
B5+۰/۵BA+۰/۵NAA	۶۵/۴ bc	۵۶۶/۲ c	۰	۰	۰	۰
B5+۰/۵BA+۱NAA	۴۳/۹ cd	۴۱۸/۶ de	۰	۰	۰	۰
B5+۱BA+۰/۵NAA	۲۱/۱ e	۴۴۴/۶ de	۱۳/۴ e	۶۹۴/۶ cd	۰	۰
B5+۱BA+1NAA	۴۴/۳ cd	۴۶۹ d	۳۴/۴ d	۷۶۹ b	۰	۰
B5+۰/۵Kin+۰/۵NAA	۳۵/۷ de	۴۵۲/۲ de	۸۶/۱ a	۸۶۸/۲ a	۵۲/۲ a	۳۰/۶ a
B5+۰/۵ Kin +۱NAA	۷۵/۵ a	۸۲۲/۴ a	۰	۰	۳۶/۹ b	۱۹/۴ b
B5+۱Kin +۰/۵NAA	۴۴/۳ cd	۵۸۱/۲ c	۰	۰	۳۸/۹ b	۱۷ bc
B5+۱Kin +1NAA	۰	۰	۰	۰	۰	۰



شکل ۲- نمودار تغییرات درصد تولید کالوس در دو غلظت NAA تحت تأثیر نوع و غلظت سیتوکینین

Archive of SID

www.SID.ir



شکل ۱- کالوس‌زایی و باززایی درون شیشه‌ای در *Papaver pseudo-orientale*. الف و ب) کالوس‌های حاصل از ریزنمونه هیپوکوتیل-کوتیلدون در محیط کشت MS حاوی ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر BA و ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر NAA، ج و د) تولید برگ از کالوس در مراحل اولیه در محیط کشت MS حاوی ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر کینتین و ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر NAA، ه و و) برگ‌های حاصل از کالوس پس از گذشت ۴ ماه از کشت در محیط کشت MS حاوی ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر کینتین و ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر NAA، ز و ح) ریشه‌زایی پس از گذشت ۵ ماه از کشت در محیط کشت B5 حاوی ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر کینتین و ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر NAA.

www.SID.ir

غلظت اکسین مورد استفاده در محیط کشت نیز عامل مهمی در القای کالوس‌زایی بود؛ به طوری که درصد تولید کالوس در غلظت ۱ میلی‌گرم بر لیتر NAA به طور معنی‌داری بیشتر از غلظت ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر NAA بود. Rostampour و همکاران (۲۰۱۰) نشان دادند که در کالوس‌زایی گونه *P. bracteatum* غلظت ۱ میلی‌گرم بر لیتر 2,4-D مؤثرتر از غلظت‌های دیگر آن است. به علاوه، اثر متقابل بین غلظت NAA و نوع محیط کشت نیز در کالوس‌زایی ریزنمونه مؤثر بوده و نیز تأثیر غلظت NAA برای کالوس‌زایی در گیاه *P. pseudo-orientale* بسته به نوع و غلظت سیتوکینین متفاوت بود (جدول۲)؛ به طوری که در سطح پایین هورمون BA (۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر BA) غلظت ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر NAA نسبت به غلظت ۱ میلی‌گرم بر لیتر آن کالوس‌زایی بیشتری را نشان داد، در حالی که در سطح بالای هورمون BA (۱ میلی‌گرم بر لیتر BA) غلظت ۱ میلی‌گرم بر لیتر NAA درصد کالوس‌زایی بیشتری از غلظت ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر آن داشت (شکل ۲)؛ حال آن که در مورد کینتین هر چند در سطح پایین آن (غلظت ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر) بین دو غلظت NAA تفاوت قابل ملاحظه‌ای وجود نداشت، ولی این تفاوت در غلظت ۱ میلی‌گرم بر لیتر کینتین قابل ملاحظه بود (شکل ۲). وجود چنین اثر متقابلی در کالوس‌زایی گیاه *Petunia* (Rao *et al.*, 1973) و گیاه Dioscoreophyllum (Oselebe and Ene-Obong, 2007) نیز گزارش شده است.

در محیط‌های کشت حاوی ۱ میلی‌گرم بر لیتر Kin ساقه‌زایی مشاهده نشد، در حالی که در محیط‌های کشت حاوی ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر Kin ساقه‌زایی اتفاق افتاد (جدول ۴). مشخص شده است که در گونه *P. somniferum*، کینتین تولید ساقه را تحریک می‌کند (Swankar and Bohra, 1989). معمولاً زمانی که نسبت سیتوکینین بیشتر از اکسین است، انتظار می‌رود ساقه‌های نابه‌جا ایجاد شوند، اما بر همکنش هورمون‌های درون‌زا و برون‌زا نقش مهمی در تمایز بافت در شرایط درون شیشه‌ای ایفا می‌کند (Rout *et al.*, 2006)؛ به طوری که Rostampour و همکاران (۲۰۱۰) محیط کشت مناسب برای تولید ساقه نابجا در گونه *P. bracteatum* را، محیط کشت MS حاوی ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر BA و ۱ میلی‌گرم بر لیتر NAA گزارش کردند، در حالی که Kaya و Lockwood (۱۹۹۹) در گونه *P. somniferum* توانستند کالوس‌هایی را به طور موفقیت‌آمیز در محیط‌های کشت MS و B5 تولید کنند و گزارش کردند که ساقه‌زایی از بافت کالوس در این گونه، در محیط کشت دارای نسبت مساوی از اکسین و سیتوکینین مشاهده می‌شود. Daneshvar (۲۰۰۵) گزارش کرد که محیط کشت مناسب برای ساقه‌زایی نابجا در گونه *P. bracteatum*، بسته به اکوتیپ متفاوت است؛ به طوری که یک اکوتیپ در محیط کشت MS حاوی ۱ میلی‌گرم بر لیتر Kin، ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر NAA و ۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر GA_3 و اکوتیپ دیگر در محیط کشت MS شامل ۱ یا ۲ میلی‌گرم بر لیتر Kin، ۲ میلی‌گرم بر لیتر NAA و ۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر GA_3 بیشترین ساقه‌زایی را نشان داد و در گونه *P. pseudo-orientale* ساقه‌زایی بدون نیاز به هورمون سیتوکینین در حضور هورمون‌های 2,4-D و NAA انجام می گیرد. در این مطالعه، بیشترین درصد ریشه‌زایی (۵۲ درصد) در محیط کشت B5 حاوی NAA و کینتین مشاهده شد، در حالی که درصد

Archive of SID

www.SID.ir

ریشه‌زایی در گونه *P. pseudo-orientale* در مطالعه Daneshvar (۲۰۰۵) در حدود ۴۰درصد بود که در محیط کشت MS حاوی ۰/۵ میلی‌گرم IBA به دست آمد.

بر اساس اطلاعات به دست آمده، نتایج حاصل از این تحقیق، نخستین گزارش از کالوس‌زایی و باززایی درون شیشه‌ای گونه *P. pseudo-orientale* بومی ایران است. با توجه به اینکه در برخی از محیط‌های کشت مورد استفاده، درصد تولید و رشد کالوس و نیز باززایی مناسب بود، از این محیط‌های کشت می‌توان برای شروع کشت سوسپانسیون به منظور تولید متابولیت‌های ثانویه مهم این گیاه در کالوس و اندام‌های حاصل از کالوس در شرایط درون‌شیشه‌ای استفاده کرد. همچنین، از این محیط‌های کشت می‌توان در استفاده از روش‌های بیوتکنولوژی برای بهبود ژنتیکی و مهندسی مسیرهای متابولیکی این گونه بهره گرفت.

منابع

Abdelmajid, K. and Jacquin, A. (2001) Somatic embryogenesis, rhizogenesis, and morphinan alkaloids production in two species of opium poppy. Biomedicine and Biotechnology 1(2): 70-78.

Constabel, F. (1990) Medicinal plant biotechnology. Planta Medica 56: 421-425.

Daneshvar, Sh. (2005) Adventitius shoot regeneration in *Papaver bracteatum* and *Papaver pseudo-orientale*. MS Thesis, Ankara University, Ankara, Turkey.

Day, K. B., Draper, J. and Smith, H. (1986) Plant regeneration and thebaine content of plants derived from callus culture of *Papaver bracteatum*. Plant Cell 5: 471-474.

Furst, S. and Hosztafi, S. (1998) Pharmacology of poppy alkaloids. 6. Taxonomy. In: Poppy: the genus *Papaver*. (ed. Bernath, J.) 291-319. Harwood Academic Publishers, Australia.

Galewsky, S. and Nessler, C. L. (1986) Synthesis of morphinane alkaloids during opium poppy somatic embryogenesis. Plant Science 45(3): 215-222.

Gamborg, O. L., Miller, R. A. and Ojima, K. (1968) Nutrents requirements of suspension culture pf soybean root cell. Experimental Cell Research 50: 151-158.

Gang Y. Y., Du, G. S., Shi, D. J., Wang, M. Z., Li, X. D. and Hua, Z. L. (2003) Establishment of *in vitro* regeneration system of the *Atrichum mosses*. Acta Botanica Sinica 45: 1475-1480.

Goldblatt, P. (1974) Biosystematic studies in *Papaver* section Oxytona. Annual Missouri Botanical Garden 61: 264-296.

Ilahi, I. and Ghauri, E. G. (1994) Regeneration in cultures of *Papaver bracteatum* as influenced by growth hormones and temperature. Plant Cell 38: 81-83.

Kamo, K. K., Kimoto, W., Hsu, A. F., Mahlberg, P. G. and Bills, D. D. (1982) Morphinan alkaloids in cultured tissues and redifferentiated organs of *Papaver somniferum*. Phytochemistry 21(1): 219-222.

Kaya, N. and Lockwood, B. (1999) A Study of the alkaloids in callusing plant tissues from a range of Turkish cultivars of *Papaver somniferum*. Turk. Journal of Agriculture and Forestry 23: 377-381.

Mihalik, E. (1998) Biology of poppy. 1. Taxonomy. In: Poppy: the genus Papaver (ed. Bernath, J.) 7-47. Harwood Academic Publishers, Australia.

Miura, Y., Fukui, H. and Tabata, M. (1987) Clonal propagation of chemically uniform fennel plants through somatic embryoids. Planta Medica 53: 92-94.

Murashige, T. and Skooge, F. (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays

Archive of SID

www.SID.ir

with tobacco tissue culture. Plant Physiology 15: 473-497.

Oselebe, H. and Ene-Obong, E. E. (2007) Organogenesis in *Dioscoreophyllum cumminsii*. Tropicultura 25(1): 37-43.

Ovecka, M., Bobak, M., Blehova, A. and Kristin, J. (1998) *P. somniferum* regeneration by somatic ambryogenesis and shoot organogenesis. Biologica Plantarum 40(3): 321-328.

Paek, K. Y., Chakrabarty, D. and Hahn, E. J. (2005) Application of bioreactor systems for large scale production of horticultural and medicinal plants. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 81: 287-300.

Rao, P. S., Handro, W. and Harada, H. (1973) Hormonal control of differentiation of shoots, roots and embryos in leaf and stem cultures of *Petunia inflata* and *Petunia hybrida*. Physiologia Plantarum 28: 458-463.

Ravishankar, G. A. and Venkataraman, L. V. (1998) Rapid multiplication of plants from cultured axillary buds of *Mentha piperita*. Philippine Journal of Science 117(2): 121-129.

Rostampour, S., Hashemi Sohi, H. and Dehestani, A. (2010) *In vitro* regeneration of Persian poppy (*Papaver bracteatum*). Biologia 65: 647-652.

Rout, G., Mohapatra, A. and Mohan, S. (2006) Tissue culture of ornamental pot plant: a critical review on present scenario and future prospects. Biotechnology 24: 531-560.

Sariyar, G. (2002) Biodiversity in the alkaloids of Turkish papaver species. Pure Applied Chemistry 74(4): 557-574.

Sariyar, G. and Baytop, T. (1980) Alkaloids from *Papaver pseudo-orientale* (*P. lasiothrix*) of Turkish origin. Planta Medica 46: 378-380.

Swankar, P. L. and Bohra, S. P. (1989) Regeneration of shoots buds from callus cultures of *Papaver somniferum*. Current Science 58: 1382-1384.

Tétényi, P. (1986) Chemotaxonomic evaluation of the *Papaver* section Macrantha. Acta Horticulture 188: 35-47.

Tisserat B. and Berhow M. (2009) Production of pharmaceuticals from *papaver* cultivars *in vitro*. Engineering in Life Science 9 (3): 190-196.

Archive of SID

www.SID.ir

Archive of SID

www.SID.ir

Callus production and regeneration of medicinal plant *Papaver pseudo-orientale* under *in vitro* conditions

Maryam Haghighat Hour, Rasool Asghari Zakaria * and Naser Zare

[1] Department of Crop Production and Breeding, Faculty of Agriculture, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, Iran

Abstract

Papaver pseudo-orientale in section Oxytona of *Papaver* genus is an important source of alkaloids such as isothebaine. In this research, callus production and regeneration of this species from hipocotyl-cotyledon explants under *in vitro* conditions were investigated on Murashige and Skoog (MS) and Gamborg (B5) basic media supplemented with different levels of Kinetin (Kin), Benzyladenine (BA) and Naphthalene acetic acid (NAA) at 16-h photoperiod and 20 °C. Analysis of variance showed significant ($P<0.01$) differences between different culture media for callus induction rate, callus weight, shoot induction rate, shoot weight, root induction rate and root weight. Results showed that the proper media for *P. pseudo-orientale* callogenesis were MS medium supplemented with 0.5 mg/l BA and 0.5 mg/l NAA and B5 medium supplemented with 0.5 mg/l Kin and 1.0 mg/l NAA and the most favorable medium for regeneration of the studied species was B5 medium supplemented with 0.5 mg/l Kin and 0.5 mg/l NAA.

Key words: Regeneration, *In vitro* culture, Phytohormones, Papaveraceae, *Papaver pseudo-orientale*

Archive of SID

***** Corresponding Author: rasghari@uma.ac.ir

www.SID.ir