زیست‌شناسی گیاهی ایران، سال هفتم، شماره بیست و پنجم، پاییز ۱۳۹۴، صفحه ۲۹-۴۲
تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۲/۱۱/۲۱
تاریخ بررسی مجدد: ۱۳۹۳/۰۵/۱۴
تاریخ بررسی مجدد: ۱۳۹۳/۱۱/۱۹
تاریخ بررسی مجدد: ۱۳۹۴/۰۷/۰۷
تاریخ پذیرش نهایی: ۱۳۹۴/۰۷/۱۲

بررسی تأثیر نوع ریزنمونه، مواد تنظیم‌کننده رشد گیاهی و زغال فعال بر القای کالوس شقایق سیاه (*Papaver bracteatum*)

بهمن حسینی [۱]*، عطا سلیمی [۱] و علی شرفی [۲]
[۱] گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران
[۲] مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی دارویی، دانشگاه علوم پزشکی زنجان، زنجان، ایران

چکیده

کشت کالوس مقدمه تولید سوسپانسیون سلولی است که به طرق مختلف به منظور مطالعات اصلاح گیاهی مورد استفاده قرار می‌گیرد. با توجه به اهمیت گیاه شقایق سیاه (*Papaver bracteatum*) در تولید آلکالوئید دارویی بنزوفنانتریدین، بررسی حاضر به منظور شناسایی بهترین ترکیب هورمونی و ریزنمونه جهت القای حداکثر کال‌زایی، وزن تر کالوس و القای جنین‌زایی سوماتیک انجام شد. بدین منظور، از ریزنمونه هیپوکوتیل در محیط کشت حاوی زغال فعال (۲ و ۴ گرم در لیتر) و غلظت‌های (۰، ۱، ۲، ۳ و ۵ میلی‌گرم در لیتر) از 2,4-D و نفتالین استیک اسید، هر یک به تنهایی و در ترکیب با غلظت‌های مختلف بنزیل آمینو پورین (۰، ۰/۱ و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر) و همچنین ریزنمونه بذری در محیط کشت فاقد زغال فعال و حاوی غلظت‌های مختلف هورمونی مشابه بالا استفاده گردید. القای جنین سوماتیک در ریزنمونه‌های بذری در ترکیبات مختلف هورمونی نیز بررسی شد. نتایج نشان داد که بیشترین درصد کالوس‌زایی (۴۳/۶ درصد) در ریزنمونه هیپوکوتیل در محیط حاوی ۲ گرم در لیتر زغال فعال و ۲ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D و حداکثر القای کالوس (۵۴ درصد) در ریزنمونه هیپوکوتیل، در تیمار ۵ میلی‌گرم در لیتر نفتالین استیک اسید در ترکیب با ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر بنزیل آمینو پورین حاصل شد. در ریزنمونه بذری در محیط فاقد زغال فعال، تیمار ۱ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D بالاترین درصد کالوس‌زایی (۸۴ درصد) را نشان داد. بیشترین وزن تر کالوس (۰/۳۵ گرم) در تیمار ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D و بالاترین درصد القای جنین سوماتیک (۷۷ درصد) در تیمار ۱ میلی‌گرم در لیتر کدر ترکیب با ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر بنزیل آمینو پورین در ریزنمونه بذری ثبت گردید.

واژه‌های کلیدی: القای کالوس، جنین‌زایی سوماتیک، شقایق سیاه، زغال فعال

مقدمه

شقایق سیاه (*Papaver bracteatum*) گیاهی علفی و چند ساله متعلق به تیره خشخاش (Papaveraceae) است. منشأ این گیاه نواحی شمالی ایران و قفقاز

* نگارنده مسؤول: نشانی پست الکترونیک: b.hosseini@urmia.ac.ir، شماره تماس: ۰۴۴۳۲۷۷۹۵۵۸

Copyright©2015, University of Isfahan. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (http://creativecommons.org/licenses/BY-NC-ND/4.0), which permits others to download this work and share it with others as long as they credit it, but they cannot change it in any way or use it commercially.

Archive of SID

www.SID.ir

گزارش شده است (Ilahi and Ghauri, 1994). این گیاه به دلیل داشتن آلکالوئیدهای بنزوفنانتریدین از نظر دارویی دارای اهمیت است (Kaya, 1999). آلکالوئیدهای مورفین و نوسکاپین (با خاصیت ضدتوموری) به مقدار فراوان در مجاری لاتکس شقایق سیاه وجود دارند و به میزان اندک به همراه آلکالوئیدهای دیگر مانند سانگوینارین در ریشه این گیاهان نیز تجمع می‌یابند (Phillipson, 1983). شقایق سیاه به جهت دارا بودن مواد دارویی نظیر: مورفین، کدئین و به ویژه تبائین دارای اهمیت است (Zargari, 1989). با توجه به این که میزان تولید متابولیت‌های ثانویه در گیاهان دارویی بسیار اندک است، تاکنون راهکارهای مختلفی جهت تجاری کردن استحصال آنها به کار گرفته شده است (Omidi *et al*., 2011).

امروزه تحقیقات فراوانی در زمینه استفاده از تکنولوژی کشت سلول و بافت‌های گیاهی در شرایط درون شیشه، به عنوان سیستم جایگزین برای تولید مواد مؤثره با ارزش صورت گرفته است (Leonard *et al*., 2009). کشت کالوس از جمله روش‌های مؤثر کشت بافت گیاهی است. کالوس در شرایط درون شیشه، در محیط غذایی و تحت تأثیر کاربرد خارجی مواد تنظیم‌کننده رشد گیاهی شکل می‌گیرد (Smith, 2002). تغییر نسبت اکسین به سیتوکینین در محیط کشت می‌تواند به توسعه شاخه‌ها، ریشه‌ها یا رویان‌های سوماتیک از کالوس منجر گردد که به منظور تولید گیاهان کامل استفاده می‌گردد. همچنین، تولید کالوس می‌تواند به منظور ایجاد سوسپانسیون سلولی که لازمه مطالعات اصلاح گیاهی است، به کار رود (Gupta, 2000). نوع، مقدار و رنگ کالوس ایجاد شده در گیاهان مختلف به ژنوتیپ، میزان هورمون‌های درون‌زا و برون‌زا و ترکیب محیط کشت وابسته است (Kumari *et al*., 2006). در میان این عوامل مؤثر، تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی به ویژه اکسین و سیتوکینین نقش بسیار حیاتی در فرآیند القای کالوس دارند (Mungole *et al*., 2011). نوع تنظیم‌کننده رشد و غلظت‌های آن به محیط و خصوصاً گونه گیاهی بستگی دارد. اکسین به تنهایی (به ویژه برای تک‌لپه‌ای‌ها) و سیتوکینین به تنهایی یا در ترکیب با اکسین می‌توانند جهت القای کالوس مورد استفاده قرار گیرند (Smith, 2002). در بررسی انجام شده روی گیاه *Papaver somniferum*، غلظت‌های مختلف از دو هورمون 2,4-D و بنزیل آدنین استفاده شد که در نهایت، تیمار ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D و بنزیل آدنین، حداکثر درصد تشکیل کالوس را حاصل نمود (Kaya, 1999). تیمار ۱ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D در ترکیب با ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر بنزیل آدنین مناسب‌ترین غلظت‌های هورمونی به منظور کالوس‌زایی در گیاه *Lilium martagon* بود (Kedra and Bach, 2005). تولید بیشترین وزن کالوس مستلزم استفاده از اکسین به عنوان بخش جدایی‌ناپذیر تولید کالوس است. در برخی از بررسی‌های انجام شده، وجود اکسین به تنهایی باعث تولید حداکثر میزان وزن کالوس گردید، در حالی که در برخی دیگر، وجود سیتوکینین برای تولید بیشترین وزن کالوس ضروری است (Zare *et al*., 2010). در تحقیق انجام گرفته روی گیاه شقایق شرقی (*Papaver oreintale*)، حداکثر وزن تر کالوس در تیمار ۰/۵

Archive of SID

www.SID.ir

میلی‌گرم در لیتر نفتالین استیک اسید و بنزیل آدنین حاصل شد (Zakaria *et al*., 2011). بیشترین مقدار وزن کالوس گیاه *Cassia obtusifolia* در تیمار ۲ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D گزارش شده است (Hasan *et al*., 2008). زغال فعال ماده‌ای بی‌مزه، نافذ و دارای سیستم بسیار مناسبی از منافذ با سطح داخلی زیاد است که قابلیت جذب بسیاری از مواد همانند: فنل‌ها، تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی، ویتامین‌ها، عناصر معدنی، ترکیبات سمّی و کلوئیدهای جامد و گازها را دارا است. عوامل متعددی همانند: خلوص و غلظت زغال فعال و اسیدیته محیط تأثیر بسزایی را در ظرفیت جذب زغال دارند (Fernando *et al*., 2010). غلظت ۱ گرم در لیتر زغال فعال باعث بهبود کالوس زایی در گیاه *Cypripedium formosanum* شده است (Lee and Lee, 2003).

پژوهش حاضر به منظور شناسایی عوامل مؤثر در القای کالوس به منظور گزینش کالوس‌های پر رشد و در نهایت انتخاب لاین‌های سلولی جهت تولید و استخراج تبائین به عنوان یک آلکالوئید پر مصرف در تولید مشتقات نارکوتیک‌ها و همچنین امکان باززایی از طریق جنین‌زایی سوماتیک انجام گردید.

مواد و روش‌ها

بذور گیاه شقایق سیاه پس از جمع‌آوری از اطراف سد شهرستان مهاباد در عرض جغرافیایی ۴۶ و ۳۶ شمالی و طول جغرافیایی ۴۳ و ۴۵ شرقی و ارتفاع ۱۳۸۵ متر از سطح دریا، به مدت دو روز در دمای چهار درجه سانتیگراد به منظور رفع نیاز سرمایی نگهداری شد. سپس، بذور توسط اتانول ۷۰ درصد به مدت یک دقیقه و محلول هیپوکلریت سدیم ۲/۵ درصد به مدت ۱۰ دقیقه و سه نوبت شستشو با آب مقطر استریل، ضدعفونی سطحی شدند. بذور در محیط کشت MS (Murashige and Skoog, 1962) و در شرایط درون شیشه‌ای کشت شدند و در اتاق رشد با دوره نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی، به منظور رشد و تهیه ریزنمونه در اتاق رشد با دمای ۲±۲۴ درجه سانتیگراد و دوره نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی قرار داده شدند.

بررسی اثر ترکیبات هورمونی بر القای کالوس در ریزنمونه هیپوکوتیلی شقایق سیاه: به منظور تعیین مناسب ترین تیمار هورمونی جهت القای کالوس، در مرحله نخست، ۱۴ روز پس از کشت بذر از ریزنمونه هیپوکوتیلی در اندازه‌های ۲ تا ۳ میلی‌متر در محیط کشت ½MS (نمک‌های MS در نصف غلظت) حاوی زغال فعال (دو غلظت: ۲ و ۴ گرم در لیتر) استفاده شد. تیمارهای هورمونی شامل غلظت های (۰، ۱، ۲، ۳ و ۵ میلی گرم در لیتر) نفتالین استیک اسید به تنهایی و در ترکیب با غلظت‌های (۰، ۰/۱ و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر) بنزیل آدنین و همچنین غلظت‌های (۰، ۱، ۲، ۳ و ۵ میلی‌گرم در لیتر) 2,4-D به تنهایی و در ترکیب با (۰، ۰/۱ و ۰/۵ میلی گرم در لیتر) بنزیل آدنین استفاده گردید.

بررسی اثر ترکیبات هورمونی بر القای کالوس در ریزنمونه بذری شقایق سیاه: در این مرحله، ابتدا در بذرهای استریل شده سطحی در زیر هود لامینار با استفاده از بینوکولار و نوک سرنگ خراش‌های کوچکی

Archive of SID

www.SID.ir

در سطح آن ایجاد شد، سپس ریزنمونه بذری در محیط کشت ½MS فاقد زغال فعال و تیمارهای هورمونی در غلظت‌های (۰، ۰/۵، ۱ و ۲ میلی‌گرم در لیتر) نفتالین استیک اسید به تنهایی و در ترکیب با غلظت‌های (۰، ۰/۵، ۱ و ۲ میلی‌گرم در لیتر) بنزیل آدنین و همچنین تیمارهای هورمونی در غلظت‌های (۰، ۰/۵، ۱ و ۲ میلی‌گرم در لیتر) 2,4-D به تنهایی و در ترکیب با غلظت‌های (۰، ۰/۵، ۱ و ۲ میلی‌گرم در لیتر) بنزیل آدنین کشت شدند. در هر دو آزمایش، واکشت‌ها هر چهار هفته یکبار و پس از انجام سه واکشت، درصد القای کالوس‌زایی در هر تیمار ثبت شد.

جهت بررسی وزن تر کالوس، از ریزنمونه بذری در محیط فاقد زغال فعال استفاده گردید. در این بخش از آزمایش، از تیمارهای هورمونی: نفتالین استیک اسید در غلظت‌های (۰، ۰/۵، ۱ و ۲ میلی‌گرم در لیتر) به تنهایی و در ترکیب با غلظت‌های (۰، ۰/۵، ۱ و ۲ میلی‌گرم در لیتر) بنزیل آدنین و همچنین 2,4-D در غلظت‌های (۰، ۰/۵، ۱ و ۲ میلی‌گرم در لیتر) به تنهایی و در ترکیب با غلظت‌های (۰، ۰/۵، ۱ و ۲ میلی‌گرم در لیتر) بنزیل آدنین استفاده شد. واکشت‌ها به فاصله هر چهار هفته یکبار و وزن تر کالوس پس از سومین واکشت یادداشت‌برداری شد. برای محاسبه وزن تر کالوس تعدادی نمونه از هر تکرار در هر تیمار انتخاب و با استفاده از ترازوی حساس با سه رقم اعشار وزن کالوس در هر تیمار سنجش گردید.

بررسی اثر ترکیبات هورمونی بر القای کالوس‌های جنین‌زا در ریزنمونه بذری شقایق سیاه: به منظور بررسی اثر غلظت‌های مختلف هورمون‌های اکسینی (2,4-D و نفتالین استیک اسید) بر القای جنین‌های سوماتیک در ریزنمونه بذری، اثر غلظت‌های ۰، ۰/۵، ۱ و ۲ میلی‌گرم در لیتر از دو هورمون 2,4-D و نفتالین استیک اسید در ترکیب با ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر بنزیل آدنین بررسی شد. ریزنمونه‌ها در شرایط نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی در محیط کشت ½MS قرار گرفتند. واکشت‌ها به فاصله هر چهار هفته یکبار انجام و میزان القای جنین‌زایی سوماتیک پس از پنجمین واکشت، یادداشت‌برداری شد. به منظور شناسایی کالوس‌های جنین‌زا از رنگ‌آمیزی هیستوشیمیایی استفاده گردید. پس از تعیین کالوس‌های جنین‌زا، تعداد کالوس‌های جنین‌زا به کل کالوس‌های تیمار هورمونی به عنوان درصد کالوس‌های جنین‌زا ثبت گردید.

تحلیل داده‌ها: تمامی آزمایش‌ها به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی و با سه تکرار انجام گردید. تحلیل آماری داده ها با نرم‌افزار آماری SAS و مقایسه میانگین داده‌ها توسط آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ۱ درصد انجام گرفت.

نتایج

بررسی اثر غلظت های مختلف 2-4-D و بنزیل آدنین در محیط حاوی زغال فعال بر القای کالوس در ریزنمونه هیپوکوتیل: نتایج تحلیل داده‌ها نشان داد که اثر متقابل زغال فعال و بنزیل آدنین، زغال فعال و 2,4-D همچنین بنزیل آدنین و 2,4-D در سطح احتمال ۱ درصد اختلاف معنی دار دارند. بررسی مقایسه میانگین ترکیبات 2,4-D و بنزیل آدنین بر درصد کالوس زایی

Archive of SID

www.SID.ir

ریزنمونه هیپوکوتیل در شقایق سیاه نشان داد که بالاترین درصد کالوس‌زایی (۳۵/۲ درصد) در تیمار ۲ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D فاقد هورمون بنزیل آدنین و کمترین میزان القای کالوس (۷/۱ درصد) در تیمار ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر بنزیل آدنین فاقد هورمون 2,4-D مشاهده شد (شکل ۱). در بررسی تأثیر غلظت‌های مختلف 2,4-D و زغال فعال بر درصد کالوس‌زایی ریزنمونه هیپوکوتیل نیز بیشترین درصد کالوس‌زایی (۴۳/۶ درصد) در تیمار ۲ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D در محیط حاوی ۲ گرم در لیتر زغال فعال و کمترین درصد کالوس زایی (۴ درصد) در تیمار ۳ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D در محیط حاوی ۴ گرم در لیتر زغال فعال حاصل شد (شکل ۲). بالاترین درصد کالوس زایی (۶/۶۸ درصد) در تیمار بدون هورمون بنزیل آدنین و در غلظت ۲ گرم در لیتر زغال فعال بود (شکل ۳). به طور کلی، حداکثر القای کالوس در ریزنمونه هیپوکوتیلی در محیط حاوی ۲ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D، ۲ گرم در لیتر زغال فعال و فاقد هورمون بنزیل آدنین مشاهده شد.

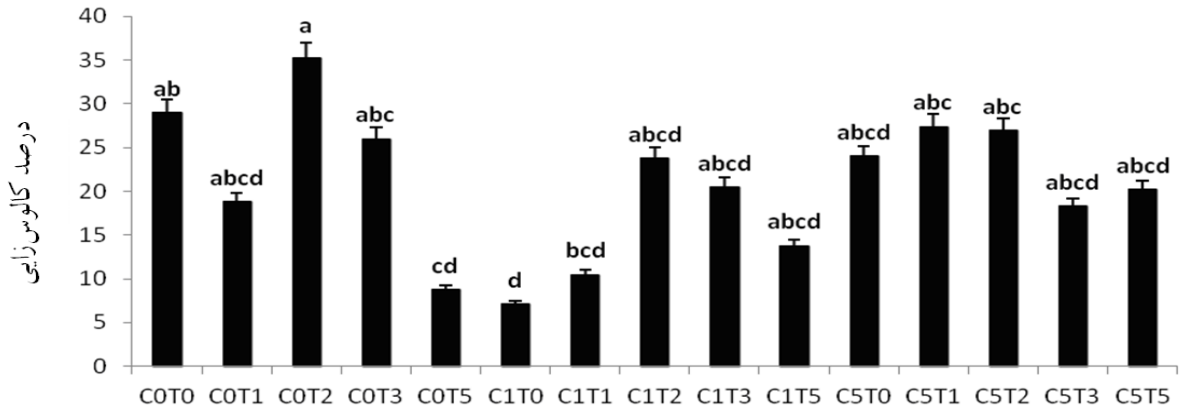
بررسی اثر غلظت‌های مختلف نفتالین استیک اسید و بنزیل آدنین در محیط حاوی زغال فعال بر القای کالوس در ریزنمونه هیپوکوتیل: نتایج تحلیل داده‌ها نشان داد که اثر متقابل بین بنزیل آدنین و نفتالین استیک اسید، همچنین زغال فعال و نفتالین استیک اسید معنی‌دار است. حداکثر القای کالوس (۵۴ درصد) در ریزنمونه هیپوکوتیل در تیمار ۵ میلی‌گرم در لیتر نفتالین استیک اسید در ترکیب با ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر بنزیل آدنین و حداقل میزان القای کالوس در تیمارهای ۲ و ۵ میلی‌گرم در لیتر نفتالین استیک اسید و نیز تیمار ۲ میلی‌گرم در لیتر نفتالین استیک اسید در ترکیب با ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر بنزیل آدنین مشاهده شد (شکل ۴). همچنین، نتایج نشان داد که غلظت ۲ گرم در لیتر زغال فعال کالوس‌زایی بهتری در مقایسه با غلظت ۴ گرم در لیتر زغال فعال حاصل نمود (شکل ۵).

بررسی اثر غلظت‌های مختلف 2,4-D و بنزیل آدنین در محیط فاقد زغال فعال بر القای کالوس در ریزنمونه بذر: در نتایج حاصل از القای کالوس در ریزنمونه بذری و در محیط فاقد زغال فعال اثر متقابل معنی‌داری بین غلظت‌های مختلف 2,4-D و بنزیل آدنین مشاهده نشد و حداکثر القای کالوس (۸۴ درصد) در تیمار ۱ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D در ریزنمونه بذری مشاهده شد، اگرچه بین تیمارهای ۰/۵، ۱ و ۲ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D تفاوت آماری معنی‌داری مشاهده نشد، در تیمار حاوی بنزیل آدنین کالوس تولید نگردید (شکل ۶).

بررسی اثر غلظت‌های مختلف نفتالین استیک اسید و بنزیل آدنین در محیط فاقد زغال فعال بر القای کالوس در ریزنمونه بذری: اثر متقابل نفتالین استیک اسید و بنزیل آدنین در القای کالوس در ریزنمونه بذری معنی‌دار نبود. نتایج آزمایش نشان داد که غلظت ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر بنزیل آدنین در مقایسه با غلظت‌های ۰ و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر دارای اثر قابل توجهی در القای کالوس بود اگرچه تفاوت معنی‌داری با تیمار بدون حضور بنزیل آدنین مشاهده نگردید (شکل ۷). همچنین، حداکثر القای کالوس (۷۴ درصد) در تیمار ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر نفتالین استیک اسید در ریزنمونه بذری مشاهده گردید، در تیمارهای فاقد نفتالین استیک اسید کالوس‌زایی رخ نداد (شکل ۸).

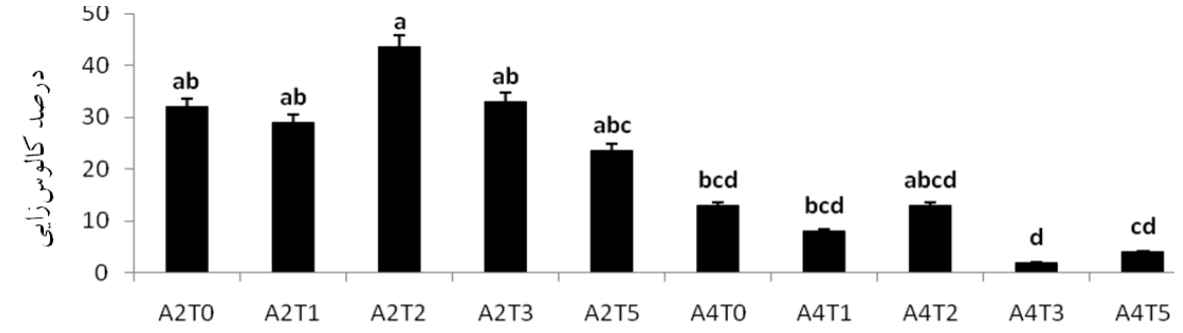
Archive of SID

www.SID.ir



غلظت‌های مختلف 2,4-D و بنزیل آدنین

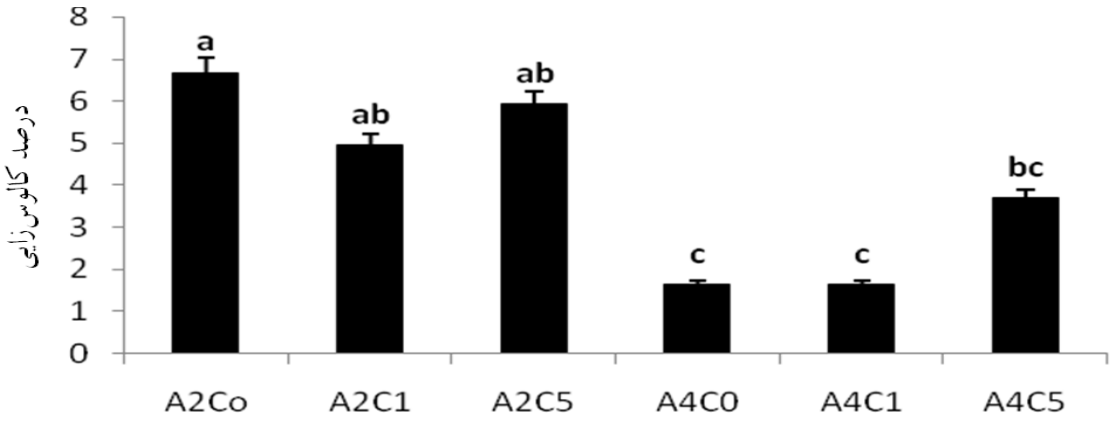
شکل ۱- تأثیر تیمار 2,4-D (T) و بنزیل آدنین (C) بر درصد کالوس‌زایی ریزنمونه هیپوکوتیل در شقایق سیاه. حروف غیرمشابه نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار در سطح احتمال ۱ درصد در آزمون دانکن است. C0T0: بدون هورمون؛ C0T1: غلظت mgL^{-1} ۱ 2,4-D؛ C0T2: غلظت mgL^{-1} ۲ 2,4-D؛ C0T3: غلظت mgL^{-1} ۳ 2,4-D؛ C0T5: غلظت mgL^{-1} ۵ 2,4-D؛ C1T0: غلظت mgL^{-1} ۰/۱ بنزیل آدنین؛ C1T1: غلظت mgL^{-1} ۱ 2,4-D و mgL^{-1} ۰/۱ بنزیل آدنین؛ C1T2: غلظت mgL^{-1} ۲ 2,4-D و mgL^{-1} ۰/۱ بنزیل آدنین؛ C1T3: غلظت mgL^{-1} ۳ 2,4-D و mgL^{-1} ۰/۱ بنزیل آدنین؛ C1T5: غلظت mgL^{-1} ۵ 2,4-D و mgL^{-1} ۰/۱ بنزیل آدنین؛ C5T0: غلظت mgL^{-1} ۰/۵ بنزیل آدنین؛ C5T1: غلظت mgL^{-1} ۱ 2,4-D و mgL^{-1} ۰/۵ بنزیل آدنین؛ C5T2: غلظت mgL^{-1} ۲ 2,4-D و mgL^{-1} ۰/۵ بنزیل آدنین؛ C5T3: غلظت mgL^{-1} ۳ 2,4-D و mgL^{-1} ۰/۵ بنزیل آدنین؛ C5T5: غلظت mgL^{-1} ۵ 2,4-D و mgL^{-1} ۰/۵ بنزیل آدنین.



غلظت‌های مختلف 2,4-D و زغال فعال

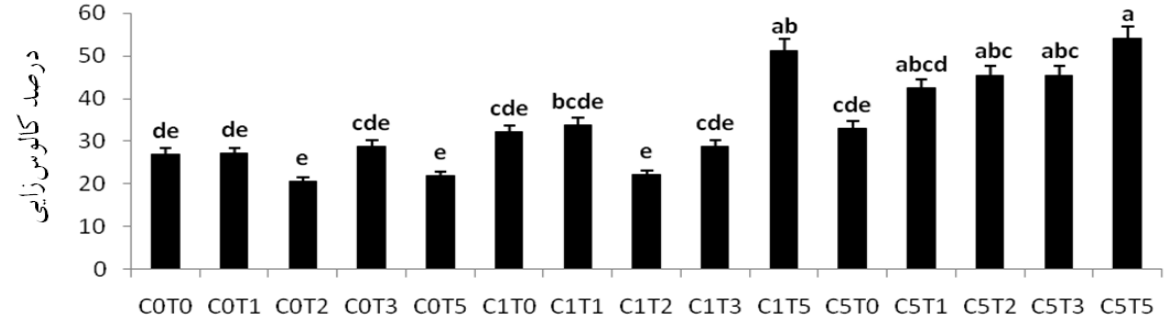
شکل ۲- تأثیر تیمار 2,4-D (T) و زغال فعال (A) بر درصد کالوس‌زایی ریزنمونه هیپوکوتیل در شقایق سیاه. حروف غیرمشابه نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار در سطح احتمال ۱ درصد در آزمون دانکن است. A2T0: gL^{-1} ۲ زغال فعال؛ A2T1: gL^{-1} ۲ زغال فعال و mgL^{-1} ۱ 2,4-D؛ A2T2: gL^{-1} ۲ زغال فعال و mgL^{-1} ۲ 2,4-D؛ A2T3: gL^{-1} ۲ زغال فعال و mgL^{-1} ۳ 2,4-D؛ A2T5: gL^{-1} ۲ زغال فعال و mgL^{-1} ۵ 2,4-D؛ A4T0: gL^{-1} ۴ زغال فعال؛ A4T1: gL^{-1} ۴ زغال فعال و mgL^{-1} ۱ 2,4-D؛ A4T2: gL^{-1} ۴ زغال فعال و mgL^{-1} ۲ 2,4-D؛ A4T3: gL^{-1} ۴ زغال فعال و mgL^{-1} ۳ 2,4-D؛ A4T5: gL^{-1} ۴ زغال فعال و mgL^{-1} ۵ 2,4-D.

www.SID.ir



غلظت‌های مختلف بنزیل آدنین و زغال فعال

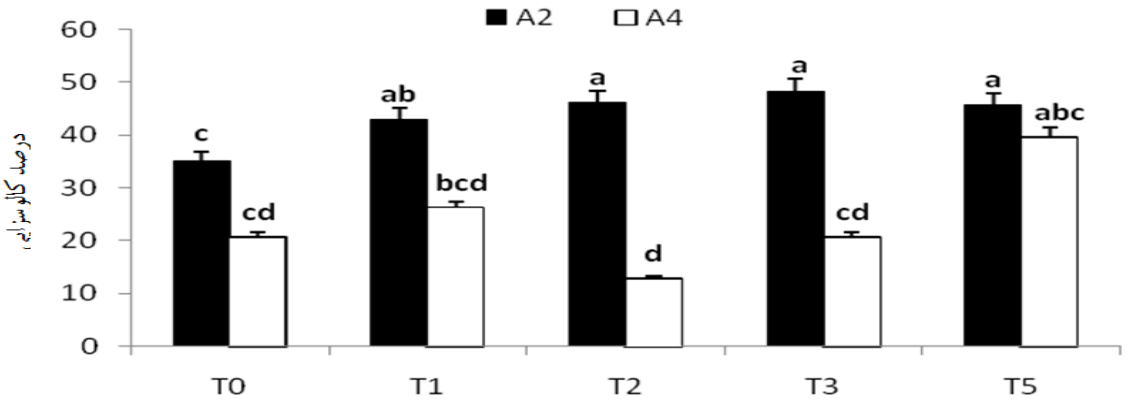
شکل ۳- تأثیر تیماربنزیل آدنین (C) و زغال فعال (A) بر درصد کالوس‌زایی ریزنمونه هیپوکوتیل در شقایق سیاه. حروف غیرمشابه نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار در سطح احتمال یک درصد در آزمون دانکن است. A2C0: ۲ gL^{-1} زغال فعال؛ A2C1: ۲ gL^{-1} زغال فعال و ۰/۱ mgL^{-1} بنزیل آدنین؛ A2C5: ۴ gL^{-1} زغال فعال و ۰/۵ mgL^{-1} بنزیل آدنین؛ A4C0: ۴ gL^{-1} زغال فعال؛ A4C1: ۴ gL^{-1} زغال فعال و ۰/۱ mgL^{-1} بنزیل آدنین؛ A4C5: ۴ gL^{-1} زغال فعال و ۰/۵ mgL^{-1} بنزیل آدنین.



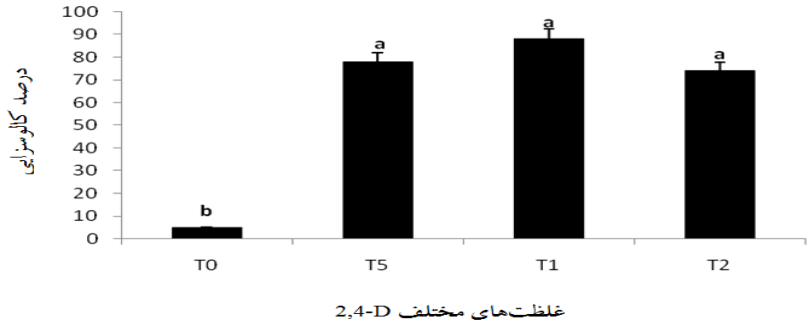
غلظت‌های مختلف نفتالین استیک اسید و بنزیل آدنین

شکل ۴- تأثیر تیمار نفتالین استیک اسید (T) و بنزیل آدنین (C) بر درصد کالوس‌زایی ریزنمونه هیپوکوتیل در شقایق سیاه. حروف غیرمشابه نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار در سطح احتمال یک درصد در آزمون دانکن است. C0T0: بدون هورمون؛ C0T1: ۱ mgL^{-1} نفتالین استیک اسید؛ C0T2: ۲ mgL^{-1} نفتالین استیک اسید؛ C0T3: ۳ mgL^{-1} نفتالین استیک اسید؛ C0T5: ۵ mgL^{-1} نفتالین استیک اسید؛ C1T0: ۰/۱ mgL^{-1} بنزیل آدنین؛ C1T1: ۱ mgL^{-1} NAA و ۰/۱ mgL^{-1} بنزیل آدنین؛ C1T2: ۲ mgL^{-1} NAA و ۰/۱ mgL^{-1} بنزیل آدنین؛ C1T3: ۳ mgL^{-1} NAA و ۰/۱ mgL^{-1} بنزیل آدنین؛ C1T5: ۵ mgL^{-1} NAA و ۰/۱ mgL^{-1} بنزیل آدنین؛ C5T0: ۰/۵ mgL^{-1} بنزیل آدنین؛ C5T1: ۱ mgL^{-1} NAA و ۰/۵ mgL^{-1} بنزیل آدنین؛ C5T2: ۲ mgL^{-1} NAA و ۰/۵ mgL^{-1} بنزیل آدنین؛ C5T3: ۳ mgL^{-1} NAA و ۰/۵ mgL^{-1} بنزیل آدنین؛ C5T5: ۵ mgL^{-1} NAA و ۰/۵ mgL^{-1} بنزیل آدنین.

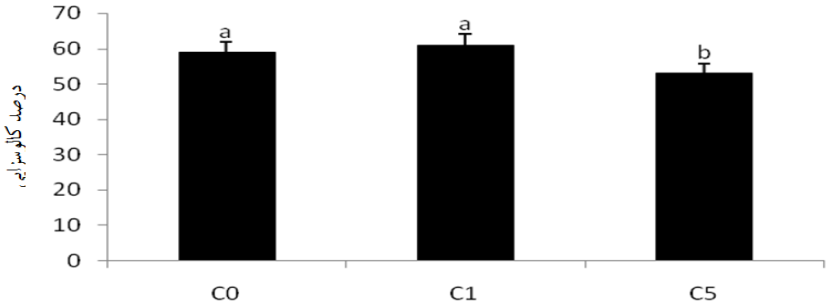
www.SID.ir



شکل ۵- تأثیر تیمار نفتالین استیک اسید (T) و زغال فعال (A) بر درصد کالوس‌زایی ریزنمونه هیپوکوتیل در شقایق سیاه. حروف غیرمشابه نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار در سطح احتمال یک درصد در آزمون دانکن است. T0: بدون هورمون؛ T1: ۱ mgL^{-1} نفتالین استیک اسید؛ T2: ۲ mgL^{-1} نفتالین استیک اسید؛ T3: ۳ mgL^{-1} نفتالین استیک اسید؛ T5: ۵ mgL^{-1} نفتالین استیک اسید.

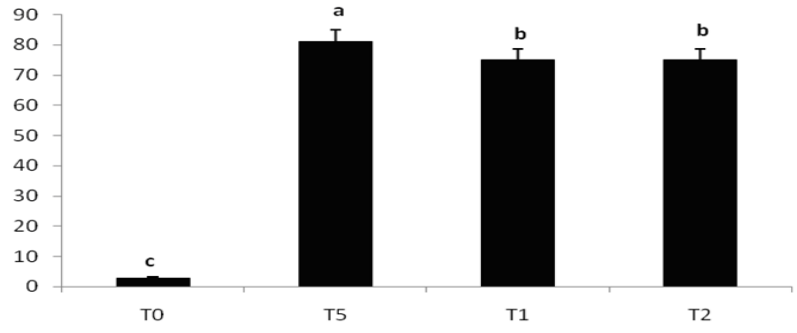


شکل ۶- تأثیر غلظت‌های مختلف 2,4-D بر درصد کالوس‌زایی در ریزنمونه بذر شقایق سیاه. حروف غیرمشابه نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار در سطح احتمال یک درصد در آزمون دانکن است. T0: بدون هورمون؛ T5: ۰/۵ mgL^{-1} 2,4-D؛ T1: ۱ mgL^{-1} 2,4-D؛ T2: ۲ mgL^{-1} 2,4-D.



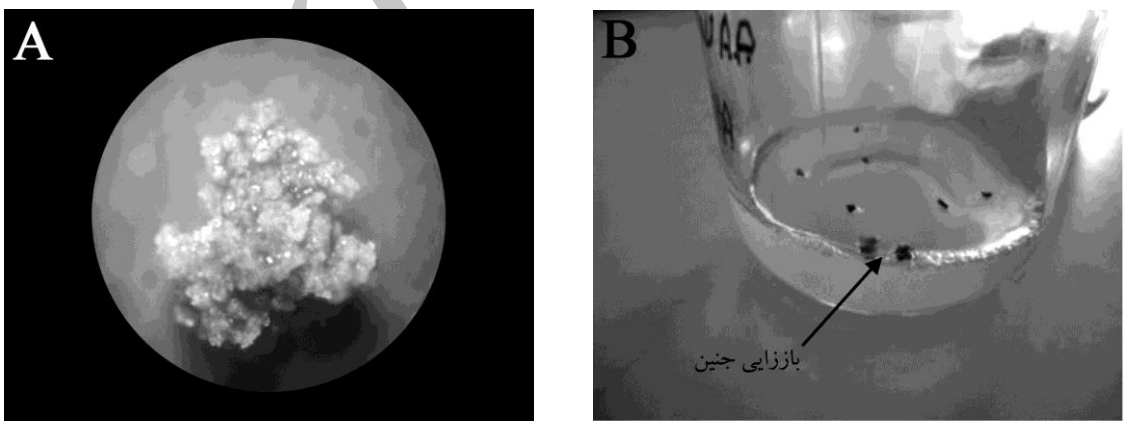
شکل ۷- بررسی مقایسه میانگین غلظت‌های بنزیل آدنین در ریزنمونه‌های بذری بر درصد کالوس‌زایی شقایق سیاه. حروف غیرمشابه نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار در سطح احتمال ۱ درصد در آزمون دانکن است. C نشان‌دهنده بنزیل آدنین است. C0: غلظت بدون هورمون؛ C1: ۰/۱ mgL^{-1} بنزیل آدنین؛ C5: ۰/۵ mgL^{-1} بنزیل آدنین.

www.SID.ir



شکل ۸- بررسی تأثیر غلظت‌های نفتالین استیک اسید بر درصد کالوس‌زایی ریزنمونه‌های بذری شقایق سیاه. حروف غیرمشابه نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار در سطح احتمال یک درصد در آزمون دانکن است. T0: بدون هورمون؛ T5: ۰/۵ mgL^{-1} NAA؛ T1: ۱ mgL^{-1} NAA؛ T2: ۲ mgL^{-1} NAA.

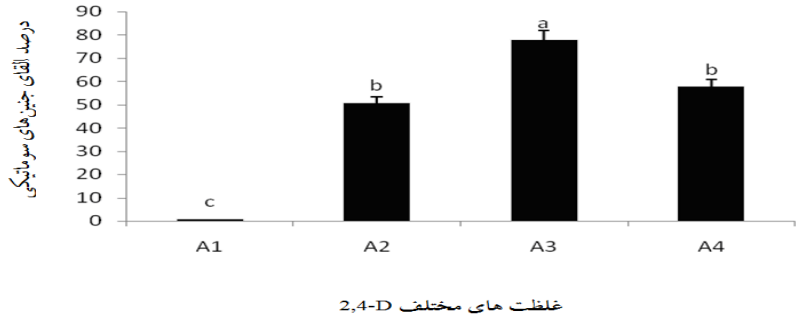
تأثیر غلظت‌های مختلف 2,4-D بر القای جنین سوماتیک در ریزنمونه بذری شقایق سیاه: نتایج حاصل از بررسی تأثیر غلظت‌های مختلف 2,4-D در ترکیب با ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر بنزیل آدنین بر القای جنین سوماتیک در ریزنمونه بذری شقایق سیاه نشان داد که بالاترین درصد القای جنین سوماتیک (۷۷ درصد) در تیمار ۱ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D در ترکیب ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر بنزیل آدنین در ریزنمونه‌های بذری مشاهده شد (شکل ۹). همچنین، نتایج نشان داد که کمترین درصد القای کالوس جنین‌زا در تیمار ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر بنزیل آدنین به دست می‌آید (شکل ۱۰). در بررسی حاضر، حضور نفتالین استیک اسید در ترکیب با بنزیل آدنین به القای کالوس جنین‌زا منجر نگردید (شکل ۹).



شکل ۹- مقایسه تأثیر نوع هورمون اکسینی بر القای جنین سوماتیک. A) جنین سوماتیک حاصل از ریزنمونه بذری در محیط ½MS تکمیل شده با ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر بنزیل آدنین و ۱ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D؛ B) کالوس‌های باززایی شده حاصل از ریزنمونه بذری در محیط ½MS تکمیل شده با ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر بنزیل آدنین و ۱ میلی‌گرم در لیتر نفتالین استیک اسید.

Archive of SID

www.SID.ir



شکل ۱۰- بررسی تأثیر غلظت‌های 2,4-D بر القای جنین سوماتیک در ریزنمونه‌های بذری شقایق سیاه. حروف غیرمشابه نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار در سطح احتمال یک درصد در آزمون دانکن است. A1: بدون هورمون؛ A2: ۰/۵ mgL^{-1} 2,4-D؛ A3: ۱ mgL^{-1} 2,4-D؛ A4: ۲ mgL^{-1} 2,4-D.

بحث

تشکیل کالوس به نوع گونه گیاهی، ترکیب هورمون، مرحله نمو، سن گیاه مادری و نوع ریزنمونه بستگی دارد (Rostami *et al.*, 2002). اکسین در غلظت‌های بالا و سیتوکینین در غلظت‌های پایین باعث تشکیل کالوس می‌شوند (Rostami *et al.*, 2002). تأثیر میزان و نوع تنظیم‌کننده‌های رشد مورد استفاده در گیاهان مختلف، بستگی به وجود هورمون‌های درون‌زای گیاهی دارد (Rao *et al.*, 2005). در مطالعه حاضر، هدف تعیین مناسب‌ترین ترکیب هورمونی برای کالوس‌زایی بود و نتایج بیانگر این مطلب است که در محیط حاوی زغال فعال و بدون زغال فعال، تیمار 2,4-D به تنهایی نسبت به سایر ترکیبات هورمونی مورد استفاده، درصد کالوس زایی بهتری داشت که این نتایج با یافته‌های پژوهشگران دیگر مطابقت داشت (Rao *et al.*, 2005؛ Mungole *et al.*, 2011). نتایج حاصل از تحقیقات مختلف نشان داده است که کالوس‌زایی نیازمند ترکیب اکسین و سیتوکینین است که این امر می‌تواند به دلیل وجود هورمون های درون‌زای گیاهی باشد (Rostampour *et al.*, 2010؛ Rishi, 2011؛ Sridhar and Naidu, 2011). به منظور بررسی اثر تیمارهای هورمونی بر کالوس‌زایی گیاه *Vinga radiate*، هورمون‌های 2,4-D، نفتالین استیک اسید و بنزیل آدنین بررسی شد و نتایج نشان داد که غلظت های پایین 2,4-D و نفتالین استیک اسید در القای کالوس در ریزنمونه‌ها نسبت به غلظت‌های بیشتر تأثیر کمتری داشته است، تیمارهایی که در آنها از 2,4-D استفاده گردید کالوس زایی بهتری نسبت به نفتالین استیک اسید نشان دادند و بیشترین درصد کالوس‌زایی در تیمارهای ۴ و ۵ میلی گرم در لیتر 2,4-D مشاهده شد (Rao *et al.*, 2005). در مطالعه انجام شده در گیاه *Ceasalpinia bonduc*، بنزیل آدنین در ترکیب با 2,4-D و نفتالین استیک اسید عامل حیاتی برای کالوس‌زایی بوده، غلظت‌های بالای 2,4-D و نفتالین استیک اسید مانع تشکیل کالوس شد و به طور کلی، تیمار نفتالین استیک اسید (۱ میلی گرم در لیتر) و بنزیل آدنین (۴ میلی گرم در لیتر) برترین تیمار جهت تولید کالوس در این گیاه شناخته شد (Cheruvathur *et al.*, 2010). در تحقیق انجام شده روی گیاه *Gloriosa supre* از غلظت‌های مختلف هورمون‌های اکسینی (2,4-D و نفتالین استیک

Archive of SID

www.SID.ir

اسید) و سیتوکینینی (بنزیل آدنین و کینتین) جهت القای کالوس استفاده شد و نتایج نشان داد که تیمارهای نفتالین استیک اسید (۳ میلی‌گرم در لیتر) و بنزیل آدنین (۰/۵ میلی گرم در لیتر) حداکثر کالوس‌زایی را حاصل نمودند (Rishi, 2011). در بررسی حاضر، زغال فعال در ریزنمونه های هیپوکوتیلی با جذب ترکیبات فنلی مانع از سیاه شدن ریزنمونه‌ها و موجب القای کالوس در ریزنمونه ها گردید. در برخی از تحقیقات نیز استفاده از زغال فعال در محیط کشت و مهار ترکیبات فنلی ایجاد شده در اثر زخم، سبب کالوس زایی در نمونه‌ها گردید (Lee and Lee, 2003؛ Lazar *et al*., 1990). غلظت ۲ گرم در لیتر زغال در مقایسه با غلظت ۴ گرم در لیتر به کالوس‌زایی بهتر در شقایق سیاه منجر گردید که احتمالاً این امر ناشی از جذب بیشتر هورمون‌ها و مواد معدنی موجود در محیط توسط زغال فعال در غلظت ۴ گرم در لیتر است. در گیاه *Vinga unguiculata*، غلظت ۵ گرم در لیتر زغال فعال به دلیل جذب بیش از حد اکسین‌ها مانع از تشکیل کالوس گردید (Aasim *et al*., 2008). در تحقیق انجام شده روی گیاه *Kurroa picrorhiza* استفاده از ۰/۸ گرم در لیتر زغال فعال مانع تشکیل کالوس گردید (Gupta, 2000). در بررسی تأثیر ترکیبات مختلف هورمونی بر درصد وزنی کالوس در گیاه شقایق سیاه، نتایج مقایسه میانگین داده‌ها نشان داد که بیشترین وزن تر کالوس در تیمار ۰/۵ میلی گرم در لیتر 2,4-D در ریزنمونه بذری مشاهده شد و کمترین وزن تر کالوس در تیمار ۰ میلی گرم در لیتر 2,4-D به دست آمد (شکل ۱۱). اثر متقابل معنی‌داری بین 2,4-D و بنزیل آدنین مشاهده نشد. نتایج به دست آمده از بررسی اثر ترکیبات مختلف هورمونی نشان داد که بهترین تیمار کالوس‌زایی مربوط به تیمار ۱ میلی گرم در لیتر 2,4-D بود. تیمار ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D بیشترین وزن کالوس و تیمار ۱ میلی گرم در لیتر 2,4-D در ترکیب با ۰/۵ میلی گرم در لیتر بنزیل آدنین حداکثر تولید کالوس جنین‌زا را داشت. از عوامل بسیار مهم در تحریک کالوس، منشأ و سن ریزنمونه است، به طوری که اندام‌های در حال خواب و اندام‌های مریستمی که تمایزیابی کمتری یافته‌اند قابلیت برگشت پذیری بهتری را دارند و به همین علت کالوس زایی بهتری را نشان می‌دهند (Arumugan and Gopinath, 2011). در ارتباط با اثر نوع ریزنمونه بر میزان القای کالوس و نوع کالوس تولیده شده مطالعات زیادی انجام شده است. نتایج بررسی های مختلف نشان داده است که ریزنمونه مورد استفاده به دلیل تفاوت‌های مختلف از جمله: سن ریزنمونه، محل قرارگیری آن در گیاه مادری و همچنین وجود هورمون های درون‌زاد در هر ریزنمونه بر موفقیت تولید کالوس تأثیر متفاوتی داشته‌اند. با کاهش سن ریزنمونه یا افزایش میزان هورمون های درونی ریزنمونه نرخ کالوس‌زایی افزایش می‌یابد، به ویژه استفاده از سلول‌های جنینی برای القای کالوس می‌تواند موفقیت تولید کالوس را افزایش دهد. زیرا در این حالت نیازی به برگشت ریزنمونه‌ها به حالت تمایز نیافته وجود ندارد، در نتیجه سرعت تکثیر سلول‌ها با وجود هورمون درونی یا کاربرد بیرونی آن تشدید خواهد شد.

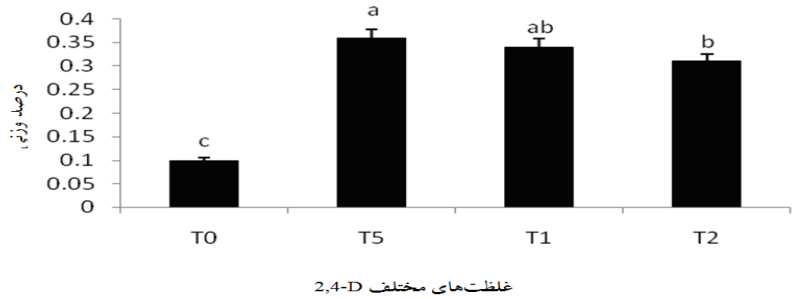
بیشترین وزن تر کالوس در ریزنمونه بذری، در تیمار ۰/۵ میلی گرم در لیتر نفتالین استیک اسید حاصل شد (شکل ۱۲). اثر متقابل معنی‌دار بین نفتالین استیک اسید و بنزیل آدنین مشاهده نشد. در مقایسه بین انواع تیمارهای هورمونی، بیشترین وزن تر کالوس در تیمار ۰/۵ میلی گرم در لیتر 2,4-D حاصل شد که با نتایج سایر پژوهشگران مطابقت داشت (Kaya, 1999؛

Archive of SID

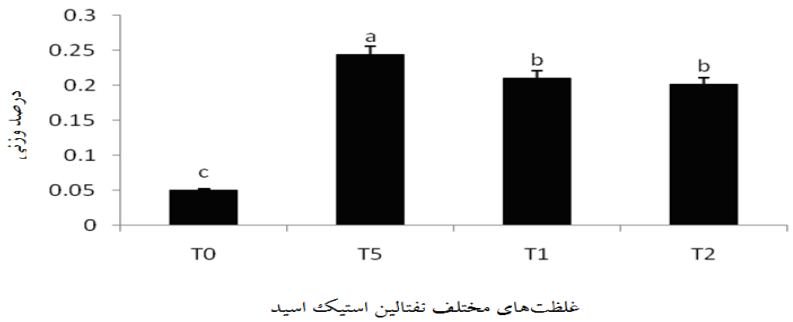
www.SID.ir

Hasan *et al*., 2008؛ Mungole *et al*., 2011). تأثیر وجود اکسین به تنهایی یا در حضور سیتوکینین در افزایش درصد وزنی می‌تواند به علت تفاوت در وجود هورمون‌های درون‌زا در گیاهان مختلف باشد (Sarkhil *et al*., 2002). برخی از گیاهان دارای اکسین درون‌زا (ایندول استیک اسید) هستند و استفاده از اکسین برون‌زا به ویژه 2,4-D باعث تحریک سنتز بیشتر اکسین در گیاه و در نتیجه باعث تولید کالوس بیشتر در ریزنمونه‌ها می‌شود (Rostami *et al*., 2002).

تأثیر موفقیت‌آمیز استفاده از 2,4-D در تولید کالوس جنین‌زا در مطالعات متعددی گزارش شده است که با نتایج حاصل از پژوهش حاضر مطابقت دارد (Yang *et al*., 2011؛ Siang *et al*., 2012). از جمله عوامل مؤثر در تولید کالوس جنین‌زا می‌توان به: ژنوتیپ، ترکیب محیط کشت، فواصل واکشت، نوع ریزنمونه، سن ریزنمونه، نوع تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی و غلظت آنها و نوع آگار اشاره نمود (Sudarmonowati *et al*., 2009). 2,4-D به علت ثبات و ماندگاری در محیط کشت مؤثرترین ماده در جنین‌زایی به شمار می‌رود، در حالی که سایر هورمون‌های اکسینی در محیط کشت فاقد این ویژگی هستند (Piri zirkouhi *et al*., 2009). در ارتباط با مؤثر بودن 2,4-D در القا و تولید کالوس جنین‌زا مشخص گردید که افزایش این هورمون در محیط تا حد آستانه تحمل، به تولید اکسین درون‌زا کمک شایانی می‌کند که این امر به القا و تولید جنین سوماتیک منجر می‌گردد (Rostami *et al*., 2002).



شکل ۱۱- تأثیر غلظت‌های مختلف 2,4-D بر درصد وزنی کالوس ریزنمونه‌های بذر شقایق سیاه. حروف غیرمشابه نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار در سطح احتمال یک درصد در آزمون دانکن است. T0: بدون هورمون؛ T5: ۰/۵ mgL^{-1} 2,4-D؛ T1: ۱ mgL^{-1} 2,4-D؛ T2: ۲ mgL^{-1} 2,4-D.



شکل ۱۲- تأثیر غلظت‌های مختلف نفتالین استیک اسید بر درصد وزنی کالوس ریزنمونه‌های بذر شقایق سیاه. حروف غیرمشابه نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار در سطح احتمال یک درصد در آزمون دانکن است. T0: بدون هورمون؛ T5: ۰/۵ mgL^{-1} 2,4-D؛ T1: ۱ mgL^{-1} 2,4-D؛ T2: ۲ mgL^{-1} 2,4-D.

Archive of SID

www.SID.ir

سپاسگزاری

پژوهش حاضر، با حمایت مالی دانشگاه ارومیه انجام شده است. نگارندگان از حمایت‌های بی‌دریغ مدیریت محترم گروه، جناب آقای دکتر جلیلی و همچنین از زحمات سرکار خانم مهندس آقایی تشکر و قدردانی می‌نمایند.

منابع

Aasim, M., Khawar, K. M. and Ozcan, S. (2008) *In vitro* micro propagation from shoot meristems of Turkish cowpea (*Vinga unguiculata* L.) CV. Babgladesh Journal of Botany 37(2): 149-154.

Arumugan, A. and Gopinath, K. (2011) *In vitro* callus development of different explants used for different medium of *Terminalia arjuna*. Asian Journal of Biotechnology 10: 23-31.

Cheruvathur, M. K., Britto, J. and Thomas, T. D. (2010) Callus induction and shoot regeneration from epicotyls explants of ethno medicinally important *Caesalpinia bonduc* cultivars of *Papaver somniferum*. Agriculture and Forestry 23(99): 377-381.

Fernando, S. C., Vidhanaarachchi, V. R. M., Weerakoon, L. K. and Santha, E. S. (2010) What makes clonal propagation of coconut difficult. Biological and Chemical Sciences 18(1): 163-165.

Gupta, P. K. (2000) Elements of biotechnology. 1st edition, Rastogi Publication, New Dehli.

Hasan, M. F., Das, R., Rahman, M. S., Rashid, M. H., Hossain, M. S. and Rahman, M. (2008) Callus induction and plant regeneration from shoot tips of chakunda (*Cassia obtusifolia* L.). Green World Foundation 3(6): 6-10.

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

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

Kedra, M. and Bach, A. (2005) Morphogenesis of *lilium martagon* L. explants in callus culture. Acta Biologica Cracovinnsia Series Botanica 47: 65-73.

Kumari, B. D. R., Setuu, A. and Sujatha, G. (2006) Somatic embryogenesis and plant regeneration in soybean (*Glycine max*). Indian Journal of Biotechnology 5(2): 243-245.

Lazar, M. D., Schaeffer, G. W. and Baenziger, P. S. (1990) The effects of interactions of culture environment with genotype on wheat (*Triticum aesticum*) anther culture response. Plant Cell Reports 8: 525-529.

Lee, Y. and Lee, N. (2003) Plant regeneration from protocorm-derived callus of *Cypripedium formosanum*. Green World Foundation 39: 475-479.

Leonard, E., Runguphan, W., Connor, S. O. and Prather, K. J. (2009) Opportunity in metabolic engineering to facilitate scalable alkaloid production. Nature Chemical Biology 5(5): 292-300.

Mungole, A. J., Doifode, V. D., Kamble, R. B., Chaturvedi, A. and Zanware, P. (2011) *In vitro* callus induction and shoot regeneration in *Physalis minima* L.. Annals of Biological Research 2(2): 79-85.

Murashige, T. and Skoog, F. (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. Physiologia Planetarium 15: 473-479.

Omidi, M., Kohzad, F., Soloki, M., Tagizadfarid, R. and Alizadeh, H. (2011) Comparison of morphine alkaloids during different stages of growth in *Papaver somniferum* L.. Journal of Medicinal Plants 11(4): 140-148.

Archive of SID

www.SID.ir

Phillipson, J. D. (1983) Intraspecific variation and alkaloids of Papaver species. Plant Medicinal 48: 187-192.

Piri zirkouhi, M., Mashayekhi, K., Kamkar, B., Hemmati, Kh. and F. Vahdatpour. (2009) Embryogenesis of a commercial and a native tomato cultivar using different culture media. Plant Production Research 16(1): 101-114 (in Persian).

Rao, S., Patil, P. and Kaviraj, C. P. (2005) Callus induction and organogenesis from various explants in *Vinga radiata* (L.). Indian Journal Biotechnology 4(4): 556-560.

Rishi, A. (2011) *In vitro* callus induction and regeneration of healthy plants of *Gloriosa superba* Linn. Indian Journal of Fundamental and Applied Life Sciences 1(1): 64-65.

Rostami, R., Abrishamchi, P. and Lahooti, M. (2011) Callus induction and plant regeneration from meristem culture of potato (*Solanum tuberosum* L.) Journal of Science Kharazmi University 10(4): 1011-1032 (in Persian).

Rostampour, S., Hashemi, S. and Dehestani, A. (2010) *In vitro* regeneration of Persian poppy (*Papaver bracteatum*). Section Cellular and Molecular Biology 65(4): 647-652.

Sarkheil, P., Omidi, M., Peyghambari, A. and Davazdahemami, S. (2009) The effects of plant growth regulators and explants on callogenesis, regeneration and suspension culture in *Foeniculum vulgare* Mill. Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants Research 25(3): 364-375 (in Persian).

Siang, T. C., Soong, S. T. and Yien, A. T. S. (2012) Plant regeneration studies of *Jatropha curcas* using induced embryogenic callus from cotyledon explants. African Journal of Biotechnology 11(31): 8022-8031.

Smith, R. H. (2000) Plant tissue culture: techniques and experiments. 2nd edition. Academic Press, San Diego.

Sridhar, T. M. and Naidu, C. V. (2011) An efficient callus induction and plant regeneration of *Solanum nigrum* (L.) an important antiulcer medicinal plant. Journal of Phytology 3(5): 23-28.

Sudarmonowati, E., Fitriani, H. and Ardiyanti, N. (2009) Factors affecting friable embryogenic callus in several plant species. Journal of Biotechnology Reserch in Tropical Region 2(2): 1-5.

Yang, J. I., Niu, Y. D., Yang, C. P., Liu, G. F. and Li, C. H. (2011) Induction of somatic embryogenesis from female flower buds of elite *Schisandra chinensis*. Plant Cell Tissue and Organ Culture 106: 391-399.

Zakaria, R. A., Hour, M. H. and Zare, N. (2011) Callus production and regeneration of the medicinal plant *Papaver orientale*. African Journal of Biotechnology 10(54): 11152-11156.

Zare, A. R., Solouki, M., Omidi, M. and Irvani, N. (2010) Callus induction and plant regeneration in *Ferula assa foetida* L.. Trakia Journal of Sciences 8(1): 11-18.

Zargari, A. (1989) Medicinal plants. 4th edition, Tehran University Press, Tehran (in Persian).

Archive of SID

www.SID.ir

A survey of the effect of explants type, plant growth regulators and activated charcoal on callus induction in *Papaver bracteatum*

Bahman Hosseini [1]*, Ata Salimi [1] and Ali Sharafi [2]

[1] Department of Horticulture, Faculty of Agriculture, Urmia University, Urmia, Iran
[2] Zanjan Pharmaceutical Biotechnology Research Center, Zanjan University of Medical Science, Zanjan, Iran

Archive of SID

Abstract

Callus culture is necessary for production of suspension cell culture in plant breeding programs. Regarding to the application of *Papaver bracteatum* as an important medicinal plant in production of benzophenantridine alkaloids, this study was performed to find the most suitable hormone combination and explant type for achieving to high percentage of callus induction fresh weight and somatic embryogenesis in this plant. For this purpose, hypocotyl explants were cultured in ½MS media containing active charcoal (2 and 4 mgL^{-1}) in combination of different concentrations of NAA, 2,4-D (0, 1, 2, 3 and 5 mgL^{-1}) and BA (0, 0.1 and 0.5 mgL^{-1}). The seed explants were cultured in same treatments without active charcoal. Also, somatic embryogesis induction using seed explants in ½MS media containing different concentrations of NAA and 2,4-D (0, 0.5, 1 and 2 mgL^{-1}) with BA 0.5 mgL^{-1} were investigated. The results showed that the highest percentage of callus induction (43.6%, 54%) in hypocotyls explants were obtained in the ½MS media containing 2 mgL^{-1} active charcoal and 2 mgL^{-1} 2,4-D and 5 mgL^{-1} NAA in companion with BA 0.5 mgL^{-1} respectively. The maximum callus induction (84%) was obtained in ½MS medium with 1 mgL^{-1} 2,4-D without active charcoal. The highest callus fresh weight (0.35%) was obtained in MS media with 0.5 mgL^{-1} 2,4-D andthe maximum rate of somatic embryogenesis induction (77%) was observed in ½MS media containing 1 mgL^{-1} 2,4-D with 0.5 mgL^{-1} BA.

Key words: Active charcoal, Callus induction, *Papaver bracteatum*, Somatic embryogenesis

* Corresponding Author: b.hosseini@urmia.ac.ir

www.SID.ir