Archive of SID

مجله بیوتکنولوژی کشاورزی

علمی-پژوهشی و ISC

باززایی گیاه ازمک (*Cardaria draba* L.) از طریق کشت بافت

سپیده قطب‌زاده کرمانی[1*]، شهرام پورسیدی[2]، غلامعباس محمدی[3]، احمد معینی[4]، امین باقی‌زاده[5]

[1] دانش آموخته دانشگاه تحصیلات تکمیلی صنعتی و فناوری پیشرفته

[2] استادیار گروه بیوتکنولوژی، دانشگاه شهید باهنر کرمان

[3] دانشیاردانشگاه علوم پزشکی کرمان

[4] دانشیار گروه بیوتکنولوژی کشاورزی و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس

[5] دانشیار گروه بیوتکنولوژی، پژوهشگاه علوم و تکنولوژی پیشرفته و علوم محیطی، دانشگاه تحصیلات تکمیلی صنعتی و فناوری پیشرفته

تاریخ دریافت: ۱۳۹۱/۰۱/۲۰، تاریخ پذیرش: ۱۳۹۱/۱۰/۱۱

چکیده

کشت بافت روشی مفید و کاربردی در جهت ریزازدیادی و تولید انبوه گیاهان در یک دوره کوتاه بدون در نظر گرفتن فصل کاشت و رویش می‌باشد علاوه بر این کشت بافت روشی جدید و مؤثر برای اصلاح گیاهان از طریق انتقال ژن است. با این حال عدم وجود یک سیستم کشت بافت و باززایی مؤثر برای بسیاری از گیاهان احساس می‌شود. ازمک با نام علمی *Cardaria draba* از جمله این گیاهان است، این گیاه با داشتن ترکیب شیمیایی سولفورافان جزو گیاهان دارویی محسوب می‌شود که ضرورت دستیابی به دستورالعمل مناسب کشت بافت و باززایی مؤثر برای این گیاه به شدت احساس می‌شود. در این پژوهش توانایی گیاه برای کالزایی و شاخه‌زایی مستقیم در محیط کشت بافت به صورت دو آزمایش فاکتوریل جداگانه در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی با دو فاکتور BAP در۷ سطح و NAA در ٤ سطح که در آزمایش اول بر روی نمونه‌های برگ لپه و در آزمایش دوم روی محور زیر لپه در سه تکرار مورد مطالعه قرار گرفت. با توجه به آنالیز آماری در سطح ۵ درصد، تیمار با غلظت هورمونی سه میلی‌گرم در لیتر BAP به همراه نیم میلی‌گرم در لیتر NAA و تیمار هورمونی با سه میلی‌گرم در لیتر BAP و یک میلی‌گرم در لیتر NAA به ترتیب بهترین کالزایی در ریزنمونه‌های برگ لپه‌ای و مناسب‌ترین تعداد شاخه در ریزنمونه‌های محور زیر لپه را نشان دادند. بهترین ریشه‌زایی برای ریزنمونه‌های محور زیر لپه و برگ‌های لپه‌ای به ترتیب در تیمارهای با غلظت هورمونی نیم میلی‌گرم در لیتر BAP به همراه یک میلی‌گرم در لیتر NAA و تیمار هورمونی با غلظت یک میلی‌گرم در لیتر NAA به تنهایی انجام گرفت. سپس گیاهان به مدت ۲ هفته در محیط کشت پایه MS بدون هورمون و ٤ هفته در گلدان‌های حاوی پیت‌ماس استریل در شرایط گلخانه نگهداری شدند و ۹۰ درصد موفقیت در باززایی گیاهان مشاهده شد.

واژه‌های کلیدی: *ازمک، کشت بافت، کالزایی و شاخه‌زایی مستقیم*

[*] نویسنده مسئول: سپیده قطب‌زاده کرمانی تلفن:۰۳٤۲-٦۲۲۸۰۱٤ Email: sp.ghotbzadeh@gmail.com

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

ازمک با نام علمی *Cardaria draba* گیاهی علفی، دو لپه از خانواده شب بو (Crucifereae) است. گیاهی چند ساله، پایا با ارتفاع متوسط ٦٠ سانتیمتر می‌باشد که توسط بذر و ریزوم تکثیر می‌گردد. جوانه زنی بذور آن در پائیز صورت می‌گیرد و زمستان و اوایل بهار را به صورت روزت سپری می‌کند (Mozafarian, 2005). این گیاه در سال اول رویش قادر به تولید گل نیست و فقط به تقویت و گسترش ریشه‌ای خود می‌پردازد و در بهار مجدداً جوانه زده و در اردیبهشت تا اوایل مرداد ماه سال دوم به گل می‌نشیند. ازمک اولین بار در سال ١٨٦٢ از شمال آمریکا گزارش شد و اکنون در اکثر نقاط دنیا یافت می‌شود (Gaskin *et al.*, 2005).

ارزش معرفی و استفاده از این گیاه به علت داشتن دو ویژگی است ویژگی اول داشتن ترکیبی بسیار ارزشمند به نام سولفوروفان[1] از دسته گلوکوزینولات‌ها[2] است. سولفوروفان عموماً بدلیل خاصیت ضد میکروبیش از ازمک جداسازی می‌شود. سولفوروفان از رشد گروهی از میکرواورگانیسم‌ها حتی برخی از پاتوژن‌های انسانی جلوگیری می‌کند. خواص توأم ضد باکتریایی[3] و ضد سرطانی[4] سولفوروفان باعث حذف هلیکوباکتر[5] شده و در نتیجه شیوع امراض گوارشی را کاهش می‌دهد (Fahy *et al.*, 2002). سولفوروفان با اثر بر روی آنزیم‌های مختلف موجب کاهش فشار خون و کاهش ابتلا به سرطان می‌شود (Powell *et al.*, 2004). تحقیقات انجام شده در کانادا مشخص کرده است که می‌توان سولفوروفان را با کیفیت و کمیت بالا از علف هرز ازمک استخراج کرد. یکی از مشکلات اصلی در استخراج سولفوروفان از گیاهان غنی از این ماده وجود انواع مختلف گلوکوزینولات‌ها در گیاه و در نتیجه وجود مشکل جداسازی آنها از یکدیگر است در حالی که ازمک فقط شامل دو نوع گلوکوزینولات در مقدار زیاد است که یکی از آنها گلوکورافانین است و این موجب کاهش مشکلات وابسته به جداسازی گلوکورافانین از دیگر گلوکوزینولات‌ها می‌شود. این پتانسیل می‌تواند ازمک را از یک علف هرز مزاحم به گیاهی مفید تبدیل کند (Powell *et al.*, 2005).

ویژگی دوم اینکه ازمک گیاهی با قابلیت انباشت فلزات سنگین است به طوری که بر اساس تحقیقی که نوری و همکاران در همدان انجام دادند مشخص شد که ازمک میزان جذب خوبی از نظر عناصر سرب، روی، منگنز و آهن دارد و به جز برای عنصر روی، بیشترین تجمع فلز در ساقه آن می-

1-Sulforaphane
2-Gulocosinolates
3-Antibacterial
4-Anticancer

5-Helicobacter

www.SID.ir

Archive of SID

باشد (Nouri *et al.*, 2011). چراغی و همکاران نشان دادند که ازمک مقدار غیر معمول و زیادی از فلز مس را می‌تواند در اندام هوایی خود متجمع کند و می‌تواند به عنوان یک فوق تجمع کننده این فلز معرفی شود (Cheraghi *et al.*, 2011). در گزارشی دیگر نیز بیان شد که ازمک نسبت به ۲۵ گونه مورد مطالعه قادر به جذب و تجمع مقدار بالایی از سرب در بافت‌های خود است (Cheraghi *et al.*, 2007). با توجه به فواید این گیاه تاکنون گزارشی در مورد کشت بافت آن ارائه نشده است بر این اساس آزمایشاتی جهت پیدا کردن سطوح هورمونی مناسب برای کشت بافت آن طراحی شد. تا پس از پیدا کردن دستورالعمل مناسب کشت بافت این گیاه بتوان با انتقال ژن از منابع دیگر به آن و افزایش مزایای آن، تنوع سوماکلونال و حتی استخراج سولفوروفان از بافت‌ها در محیط کشت بافت بهره برد.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری و کشت بذور

بذرهای ازمک به صورت نمونه‌های تصادفی از شهرستان کرمان جمع‌آوری شد. بذور یک شکل و سالم انتخاب و در یک توری مناسب ریخته و با آب حاوی مایع ظرفشویی به میزان مناسب به مدت ۵-۳ دقیقه به خوبی شسته شد و پس از شستشوی اولیه، در هیپوکلریت سدیم ۲/۵ درصد به مدت ۱۵ دقیقه قرار گرفتند تا ضدعفونی بذور صورت گیرد. در پایان بذور سه مرتبه، هر بار به مدت ۱۵ دقیقه با آب مقطر استریل شسته شدند. بذور ضدعفونی شده پس از خشک شدن بر روی کاغذ صافی استریل به تعداد ۲۰ بذر در هر ظرف شیشه‌ای حاوی محیط کشت پایه MS با غلظت یک‌دوم که قبلاً اتوکلاو شده بود، کشت شده و در اتاقک رشد با ۱٦ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی و دمای ۲±۲٦ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند.

کشت ریزنمونه‌ها در محیط با غلظت‌های مختلف هورمونی

پس از ۱۱ روز از گیاهچه‌های جوان، ریز نمونه‌های برگ لپه‌ای و محور زیر لپه تهیه شد به این صورت که ابتدا جوانه انتهایی از بین دو برگ لپه‌ای جدا و محور زیر لپه نیز به قطعات ۷ تا ۱۰ میلی‌متری تقسیم و سپس قطعات محور زیر لپه و هر برگ لپه‌ای به محیط کشت حاوی سطوح هورمونی مختلف منتقل شدند. هورمون‌های مورد استفاده نفتالین استیک اسید[1] به عنوان اکسین و ٦-بنزیل آمینوپورین[2] به عنوان

1-NAA=Naphthalene Acetic Acid
2-BAP=6-Benzyl Amino Purine

www.SID.ir

Archive of SID

سیتوکینین بودند، غلظت‌های انتخابی NAA ۰/۲، ۰/۵ و ۱ میلی گرم در لیتر و برای BAP ۰/۵، ۱، ۲، ۳، ٤ و ٤/۵ میلی گرم در لیتر به تنهایی و یا در ترکیب با یکدیگر در محیط کشت پایه MS کامل به همراه ساکارز با غلظت ۳۰ گرم در لیتر به عنوان منبع کربن و آگار با غلظت ۸ گرم در لیتر به عنوان فاکتور منعقد کننده، بودند که با شاهد (محیط بدون هورمون) مقایسه شدند. پس از افزودن هورمون‌ها pH محیط کشت روی ۵/۸ ±۰/۰۵ تنظیم و عمل استریل کردن در دمای ۱۲۱ درجه سانتیگراد و فشار یک اتمسفر به مدت ۲۰ دقیقه انجام شد. ۷ میلیمتر از هر محیط کشت در سه تکرار داخل پتری دیش‌های یک بار مصرف استریل با ابعاد ۱/۲ × ۸ سانتی‌متر توزیع، و در هر پتری‌دیش ۸ ریزنمونه برگ لپه‌ای و یا ۸ ریزنمونه از محور زیر لپه به طور جداگانه کشت داده شد. نمونه‌ها در اتاقک رشد در شرایط نوری ۲٤۰۰ لوکس با دوره ۱٦ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی در دمای ۲±۲٦ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت البته لازم به ذکر است که هر دو هفته یک بار نمونه‌ها به محیط کشت جدید با شرایط قبلی منتقل می‌شدند.

اندازه‌گیری صفات مورد نظر

پس از یک ماه نمونه‌ها برای شمارش و محاسبه درصد پاسخ‌دهی، شاخص کالوس‌دهی، شاخص شاخه‌زایی و شاخص ریشه‌زایی به زیر هود لامینار آزمایشگاه تحت شرایط استریل منتقل شدند. صفات مورد نظر با استفاده از فرمول‌های زیر محاسبه شد و قابل ذکر است که برای محاسبه دو شاخص ریشه‌زایی و شاخه‌زایی سه ریز نمونه از هر پتری به طور تصادفی انتخاب و شمارش در آنها انجام شد.

$$\text{درصد پاسخ‌دهی} = \frac{\text{تعداد ریز نمونه‌های رشد کرده}}{\text{تعداد کل ریز نمونه‌های کشت شده در پتری}} \times 100$$

$$\text{شاخص کالوس‌دهی} = \frac{\text{تعداد ریزنمونه‌های کال داده}}{\text{تعداد کل ریز نمونه‌های کشت شده در پتری}} \times 100$$

$$\text{شاخص شاخه‌زایی} = \frac{\text{تعداد شاخه تولید شده در هر ریز نمونه}}{\text{تعداد ریز نمونه انتخاب شده}}$$

$$\text{شاخص ریشه‌زایی} = \frac{\text{تعداد ریشه تولید شده در هر ریز نمونه}}{\text{تعداد ریز نمونه انتخاب شده}}$$

تحریک ریشه‌زایی بیشتر و تطابق سازی با محیط

ریز نمونه‌هایی که اندام زایی داشتند به قطعات کوچکتر تقسیم و به مدت ۲ ساعت در سطح محیط القا ریشه که محیط MS مایع با غلظت یک‌دوم و هورمون IBA با غلظت ۲ میلی گرم در لیتر بود، به مدت ۲ ساعت قرار گرفتند. پس از آن نمونه‌ها جهت توسعه ریشه و رشد بیشتر ساقه نوپدید خود به

www.SID.ir

Archive of SID

محیط بدون هورمون حاوی MS کامل، ساکارز و آگار با همان نسبت‌های قبل منتقل شدند و به مدت ۲ هفته در شرایط نوری و دمایی قبل قرار گرفتند. گیاهچه‌هایی که در محیط توسعه قادر به تشکیل ریشه بودند و به خوبی بلند شده بودند به گلدان‌های حاوی پیت ماس استریل منتقل شدند و در گلخانه قرار گرفتند. در ابتدا گلدان‌ها با روکش پلاستیکی شفاف پوشیده و پس از یک هفته روکش پلاستیکی سوراخ شد. در طول این مدت گلدان‌ها یک روز در میان با آب مقطر و هر سه روز یک بار با MS مایع با غلظت X ۰/۲۵ آبیاری شدند. هر هفته تعداد سوراخ‌های بیشتری در پوشش پلاستیکی ایجاد شد تا پس از ٤ هفته که پلاستیک کاملاً برداشته شد و درصد گیاهانی که سالم و زنده مانده بودند محاسبه شد.

آنالیز آماری

داده‌های مربوط به هر ریز نمونه در دو آزمایش فاکتوریل در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی و در سه تکرار آنالیز شدند. سپس نرمال سازی در محیط نرم افزاری Minitab و تبدیل سینوسی انجام و در نهایت آنالیز داده‌ها در محیط نرم افزاری SAS انجام پذیرفت. نمودارها در محیط Excel و با میانگین داده‌های بدون تبدیل رسم شد.

نتایج و بحث

امروزه تکثیر درون شیشه‌ای یکی از جنبه-های تجاری تکثیرخزانه‌ای بسیاری از گیاهان بوده و روند رو به افزایشی دارد (Khoshkhoi, 1999). تاکنون در زمینه ریزازدیادی گیاهان دارویی متعددی مانند آلوئه‌ورا (Garro-Monge *et al.*, 2008; Hashemabadi *et al.*, 2008)، استویا (Sivaram *et al.*, 2003)، سیر (Khan *et al.*, 2004)، یام (Kadota *et al.*, 2004)، سرخدار (Chang *et al.*, 2001)، بارهنگ (Barna *et al.*, 1988) و مورد (Khosh-Khui *et al.*, 1984) تحقیقات متعددی انجام شده و امکان تکثیر سریع و انبوه برخی از گونه‌های آنها فراهم گردیده است. گیاهان خانواده براسیکاسه معمولاً در کشت درون شیشه استفاده می‌شوند (Zhang *et al.*, 2006) و گزارش‌های متعددی برای استفاده از تکنیک‌های کشت بافت مانند اندام‌زایی و جنین‌های سوماتیکی برای باززایی گونه‌های مختلف براسیکا وجود دارد (Antonio *et al.*, 1987; Jain *et al.*, 1988; Ono *et al.*, 1994; Koh *et al.*, 2000; Khan *et al.*, 2002). مؤثرترین فاکتورها در پاسخ‌دهی ریزنمونه‌ها به محیط کشت بافت ژنوتیپ، سن گیاه دهنده، نوع ریزنمونه و ترکیب محیط کشت است و می‌توان گفت اولین مرحله برای پیدا کردن روش مناسب کشت بافت انتخاب ریزنمونه و ترکیب هورمونی مناسب است (Sanjida *et al.*, 2011). تاکنون در کشت بافت و مهندسی ژنتیک بسیاری از گیاهان

www.SID.ir

Archive of SID

مانند کلزا از ریزنمونه‌های مختلفی استفاده شده است که از مهمترین آنها می‌توان برگ لپه و محور زیر لپه را نام برد، گزارش شده است که ریزنمونه برگ لپه‌ای دارای بالاترین باززایی است (Kahrizi *et al.*, 2010). اطلاعات موجود نشان می‌دهد باززایی و اندام‌زایی در بافت‌های مختلفی مثل برگ لپه (Hachey *et al.*, 1991; One *et al.*, 1994) محور زیر لپه (Khehra *et al.*, 1992; Phogat *et al.*, 2000) ساقه اصلی (Eapen *et al.*, 1997) برگ‌ها (Radke *et al.*, 1988) لایه نازکی از اپیدرم (Klimaszewska *et al.*, 2002) پروتوپلاست (Hu *et al.*, 1999) انجام شده است. در حالی که بر روی برخی گیاهان از جمله ازمک با وجود خاصیت دارویی مفید آن هیچ گونه تحقیقی در زمینه کشت بافت صورت نگرفته است. در تحقیق حاضر گیاه دارویی ازمک قابلیت جوانه زنی مستقیم و تولید کالوس خوبی در محیط کشت بافت از هر دو ریزنمونه کشت شده نشان داد به طوری که درصد پاسخ‌دهی ریزنمونه‌های محور زیر لپه بین ۳۵ تا ۱۰۰ و برای برگ‌های لپه‌ای ۰ تا ۱۰۰ درصد بوده است. در حالی که برای گیاه خردل که در خانواده براسیکاسه شبیه به ازمک است ۲۲/۳۱، ٤۱/٦، ٦۷/۹ درصد و در برخی از واریته‌ها تا ۸۳ درصد گزارش شده است (Guo *et al.*, 2005; Bano *et al.*, 2010; Sanjida *et al.*, 2011) و همانطور که مشخص است پاسخ‌دهی ازمک بسیار بالاتر است.

به طور معمول نوع ریزنمونه، ظرفیت شاخه‌زایی و باززایی متفاوتی در محیط کشت دارد و برگ لپه در بیشتر موارد شاخه‌زایی بیشتری نسبت به قطعات برگ نشان می‌دهد (Guo *et al.*, 2005) اما نتایج ما نشان داد که ظرفیت بالای تولید ساقه در هر دو ریزنمونه وجود دارد. کهریزی و همکاران نیز اعلام کردند که محور زیر لپه و برگ لپه‌ای کلزا در محیط کشت بافت به ترتیب برای تولید کالوس و باززایی مستقیم مناسب هستند (Kahrizi *et al.*, 2010)، اما در مطالعه حاضر نمی‌توان چنین نتیجه‌ای گرفت و قابل ذکر است که پاسخ‌دهی ریزنمونه‌ها در محیط کشت بافت بسیار به ژنوتیپ بستگی دارد، در خانواده براسیکاسه نیز این مسئله وجود دارد (Dietert *et al.*, 1982; Fazekas *et al.*, 1986; Khehra *et al.*, 1992) و بیان شده است که پاسخ دهی به محیط کشت در این خانواده تحت کنترل ژنتیک است (Cardoza *et al.*, 2004; Bano *et al.*, 2010). در گروه شاهد پاسخ‌دهی ۳۵ و ٥٤ درصد به ترتیب در ریزنمونه‌های محور زیر لپه و برگ-های لپه‌ای مشاهده شد (شکل‌های ۲ و ۳) که این درصد بالای جوانه‌زنی در محیط فاقد هورمون را می‌توان به حضور مقادیر زیادی از کربن، عناصر معدنی و هورمون‌های ذخیره شده در قسمت‌های مختلف گیاه نسبت داد.

جوانه‌های تشکیل شده رشد قابل ملاحظه-ای داشتند و در پایان یک ماه دارای برگ‌های قابل شمارش بودند (شکل ۱–ب)، که اندازه

www.SID.ir

Archive of SID

گیری شاخص تولید ساقه برای آنها امکان پذیر است. تجزیه واریانس این صفت معنی‌دار بودن اثر هورمون‌ها و اثر متقابل آنها را تائید نمود، بطوریکه بیشترین تعداد ساقه تولید شده در ریز نمونه‌های محور زیر لپه و برگ لپه‌ای به ترتیب در تیمارهای با غلظت ۳ میلی گرم در لیتر و یک میلی گرم در لیتر BAP بدون حضور NAA مشاهده شد. گزارش شده است که تعداد شاخه جوانه زده در هر ریزنمونه و محتوای رنگیزه در هر ساقه تولید شده بیشتر تحت تأثیر مقادیر مختلف هورمون‌های سیتوکینین و اکسین قرار می‌گیرد. همانطور که Youssef (1994)، Mohamed-Yasseen (1995)، Mata-Rosas Feng-Feng and (2001) به ترتیب در گیاهان *Acacia salicina*، *Stapela semota*، *Turbinicapus laui* و *Aloe barbebsis* گزارش کردند. Sawsan *et al.* (2004) گزارش کردند که غلظت‌های مختلف BAP و NAA اثرات معنی-داری بر سرعت شاخه‌زایی ریز نمونه‌ها دارد. آزمایشات نشان داده است که استفاده از مقدار کم NAA در محیط‌های کشت برای القای نوساقه‌ها مؤثر است و مانع از نکروزه شدن بافت‌ها می‌شود (Wahlroos *et al.*, 2003; Guo *et al.*, 2005; Ghasemi *et al.*, 2007). به همین دلیل در آزمایش حاضر نیز برای کمک به اثر سیتوکینین از اکسین NAA در غلظت‌های کمتر از BAP برای القا شاخه و در غلظت‌های بالاتر آن برای القا کالوس استفاده شد. این نتایج با گزارشات قبلی در مورد اثر مثبت مقادیر جزئی NAA همراه با سیتوکینین‌ها در محیط‌های کشت تولید شاخه در گیاهان متعلق به تیره‌های دیگری نظیر داتوره، بارهنگ و میخک مطابقت دارد (Debnath *et al.*, 2006). حضور BAP شاخه‌زایی و تشکیل ساقه-های متعدد را در تحقیق حاضر، تحریک نمود، این یافته‌ها در مورد باززایی ساقه‌ها، تحقیقات Nikolic *et al.* (1997) را تایید می‌کند.

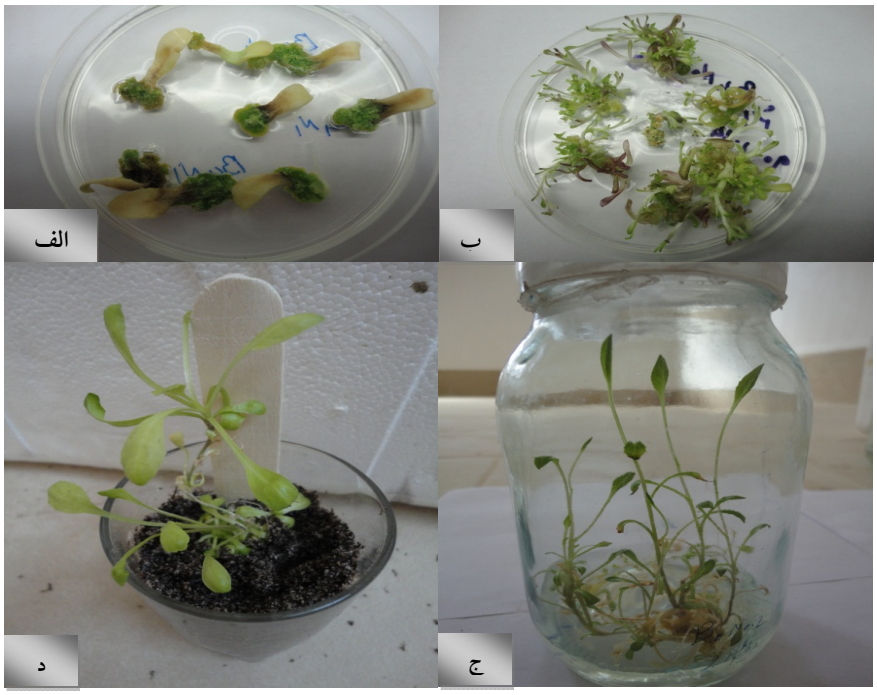
بیشترین درصد شاخه‌زایی در ریز نمونه‌های محور زیر لپه و برگ‌های لپه‌ای در تیمارهایی دیده شد که سطح متوسط از BAP بدون حضور NAA داشتند به طوری که تیمارهای یک و سه میلی‌گرم در لیتر BAP بیشترین تعداد شاخه را به ترتیب در ریز نمونه‌های برگ لپه و محور زیر لپه ایجاد کردند (شکل‌های ٤ و ٥) و این حاکی از نقش زیاد BAP در شاخه‌زایی است. در پژوهشی دیگر نیز بیشترین درصد باززایی نوساقه‌ها در گیاه کلزا را در غلظت ٤ میلی‌گرم BAP بدون حضور اکسین مشاهده کردند (One *et al.*, 1994).

اما Guo *et al.* (2005) معتقدند که حضور اکسین در کنار سیتوکینین باعث باززایی بهتر بر روی ریز نمونه‌های برگ لپه‌ای می‌شود. Ghasemi *et al.* (2007) نیز بیان می‌کنند که حضور NAA با غلظت یک میلی‌گرم در لیتر در محیط کشت باعث اندام‌زایی مؤثر کلزا می‌شود. گونه‌های مختلف براسیکا نیز با وجود مقدار بالای سیتوکینین و کم اکسین ساقه‌زایی بهتری داشتند اما در گیاه *Brassica juncea* و *Brassica*

www.SID.ir

Archive of SID

campestris با وجود اکسین در محیط تعداد شاخه به شدت کاهش می‌یافت (Jain *et al.*, 1988) و ترکیب BAP و NAA باعث عدم شاخه‌زایی و یا کم شدن تعداد نوساقه در محیط کشت می‌شود (Fazekas *et al.*, 1986). George *et al.* (1980) گزارش کرد که تولید نوساقه از برگ لپه خردل هندی در محیط کشت با ترکیب تیماری B_1N_1 خیلی کم بوده و این سطح هورمونی مانع ساقه‌زایی می‌شود.

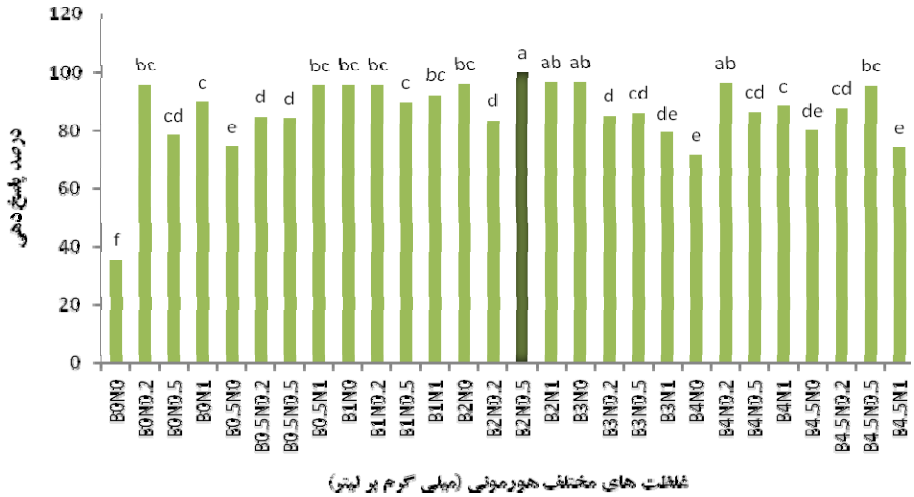


شکل۱- ساقه‌زایی مستقیم و شکل گیری کالوس در گیاه ازمک *Cardaria draba*. الف) تشکیل کالوس از برگ‌های لپه‌ای در محیط کشت با غلظت ٤/٥ میلی‌گرم BAP و یک میلی‌گرم NAA، ب) ساقه‌زایی مستقیم از محور زیر لپه در محیط کشت با غلظت ۱ میلی‌گرم BAP و ۰/۲ میلی‌گرم NAA، ج) گیاه در محیط توسعه، د) گیاه کامل در محیط پیت ماس.

Figure 1- Shoot regeneration and callus induction in *Cardaria draba*. a) Callus formation of cotyledon in $B_{4.5}N_1$, b) Shoot regeneration of hypocotyl in $B_1N_{0.2}$, c) Elongation, d) Plant in peat moss.

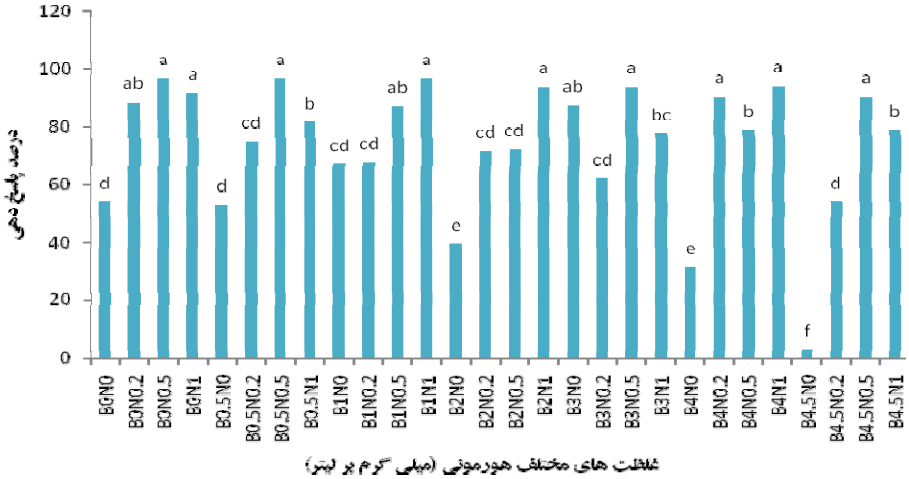
www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۲- نمودار درصد پاسخ‌دهی در ریز نمونه‌های محور زیر لپه. B_i: غلظت هورمون BAP بر حسب میلی‌گرم در لیتر، N_j: غلظت هورمون NAA بر حسب میلی‌گرم در لیتر. حروف روی شکل برحسب آزمون LSD در سطح ۵ درصد می‌باشد.

Figure 2- Graph of Response percent in hypocotyls. B_i: Concentration of BAP (mg L^{-1}), N_j: Concentration of NAA (mg L^{-1}). The letters on columns are based on LSD test ($p \leq 0.05$)

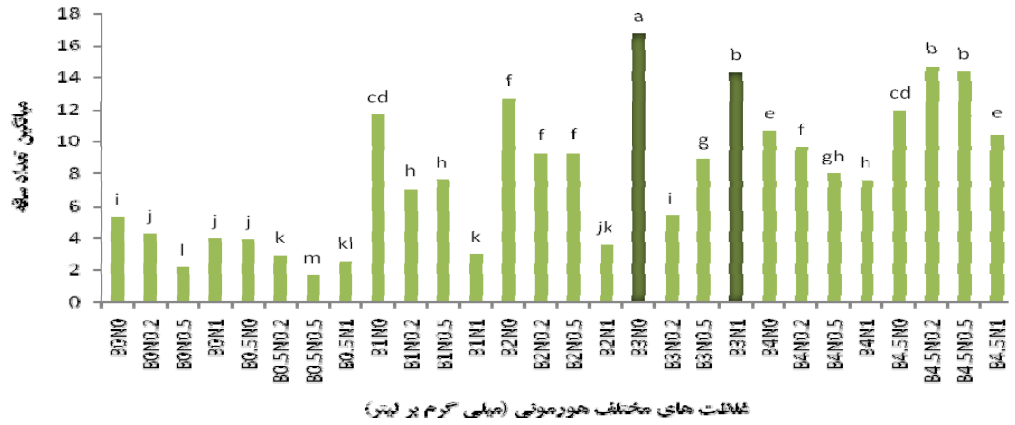


شکل ۳- نمودار درصد پاسخ‌دهی در ریز نمونه‌های برگ لپه‌ای. B_i: غلظت هورمون BAP بر حسب میلی‌گرم در لیتر، N_j: غلظت هورمون NAA بر حسب میلی‌گرم در لیتر. حروف روی شکل برحسب آزمون LSD در سطح ۵ درصد می‌باشد.

Figure 3- Graph of Response percent in cotyledons. B_i: Concentration of BAP (mg L^{-1}), N_j: Concentration of NAA (mg L^{-1}). The letters on columns are based on LSD test ($p \leq 0.05$).

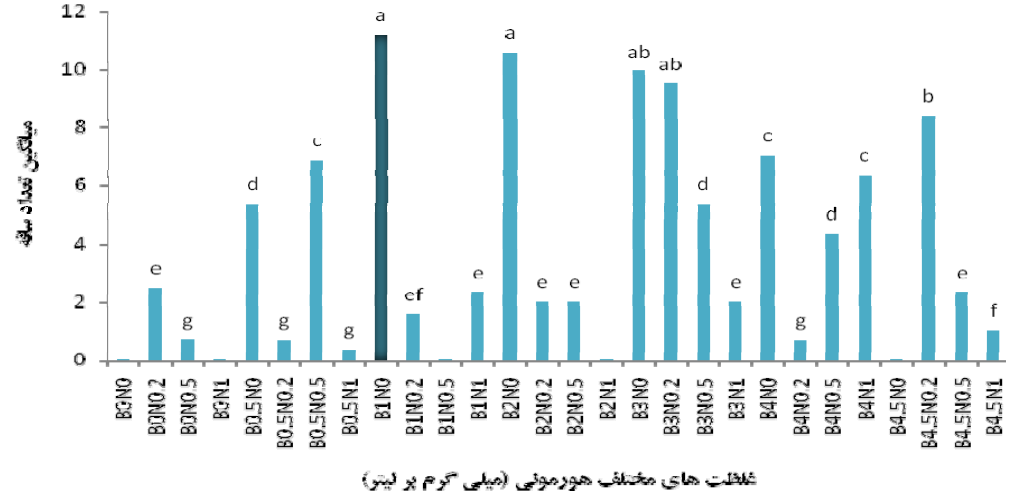
www.SID.ir

Archive of SID



شکل ٤- نمودار میانگین تعداد ساقه نوپدید در ریز نمونه‌های محور زیر لپه. B_i: غلظت هورمون BAP بر حسب میلی‌گرم در لیتر، N_j: غلظت هورمون NAA بر حسب میلی‌گرم در لیتر. حروف روی شکل برحسب آزمون LSD در سطح ۵ درصد می‌باشد.

Figure 4- Graph of shoot generation in hypocotyls. B_i: Concentration of BAP (mg L^{-1}), N_j: Concentration of NAA (mg L^{-1}). The letters on columns are based on LSD test ($p \leq 0.05$).



شکل ۵- نمودار میانگین تعداد ساقه نوپدید در ریز نمونه‌های برگ لپه. B_i: غلظت هورمون BAP بر حسب میلی‌گرم در لیتر، N_j: غلظت هورمون NAA بر حسب میلی‌گرم در لیتر. حروف روی شکل برحسب آزمون LSD در سطح ۵ درصد می‌باشد.

Figure 5- Graph of shoot generation in cotyledons. B_i: Concentration of BAP (mg L^{-1}), N_j: Concentration of NAA (mg L^{-1}). The letters on columns are based on LSD test ($p \leq 0.05$).

www.SID.ir

Archive of SID

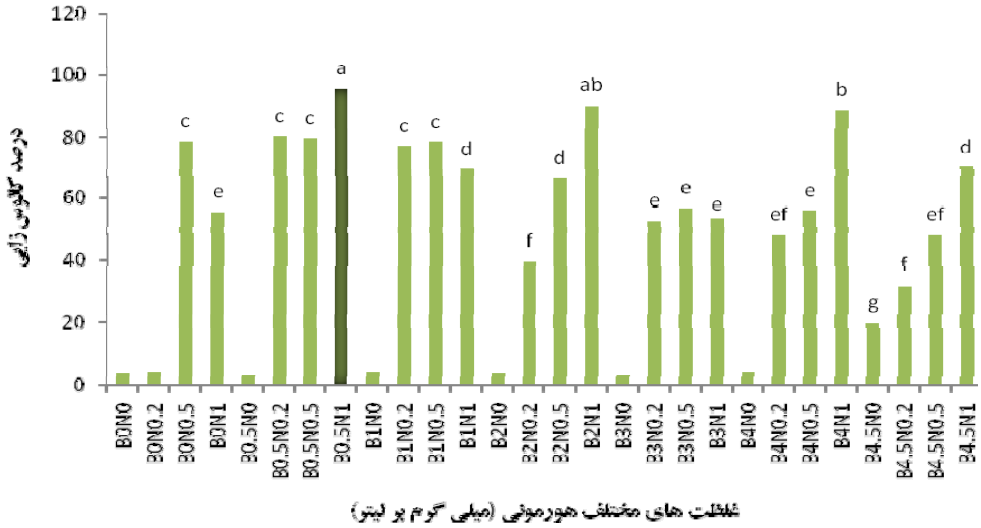
در آزمایشات باززایی کشت بخش‌های هوایی برای تولید شاخه‌های نوپدید رایج‌تر است و نتایج مطلوب‌تری نیز دارد. در این میان قطعات هیپوکوتیل بدلیل قابلیت رشد سریع و عدم تمایزیابی شدید به سمت اندام‌ها بیشتر مورد استفاده قرار می‌گیرند (Dixon *et al.*, 1996; Sama *et al.*, 2012). اما در تحقیق حاضر ریزنمونه‌های محور زیر لپه نتایج خوبی از نظر شاخه‌زایی مستقیم (بدون ایجاد کالوس) نشان دادند، از طرف دیگر مزیت مهم باززایی گیاه از ریزنمونه‌های محور زیر لپه، داشتن پتانسیل تولید انبوه گیاهچه می‌باشد که هدف مذکور در انتقال ژن را به خوبی تأمین می‌کند. در ریزنمونه محور زیر لپه تیمار سه میلی‌گرم در لیتر BAP بدون حضور NAA بیشترین تعداد ساقه را تولید کرد اما اگر هدف باززایی کامل گیاه باشد تیمار سه میلی‌گرم در لیتر BAP به همراه یک میلی‌گرم NAA پیشنهاد می‌شود زیرا علاوه بر شاخه‌زایی خوب، ریشه‌زایی قابل قبولی نیز داشت و در مورد ریزنمونه برگ لپه تیمار یک میلی‌گرم در لیتر BAP بدون حضور NAA بیشترین تعداد ساقه را تولید کرد اما ریشه‌زایی قابل قبولی نداشت بنابراین تیمار دو میلی‌گرم در لیتر BAP بدون حضور NAA با هدف باززایی کامل گیاه پیشنهاد می‌شود.

در بررسی اثر تنظیم کننده‌های رشد بر شاخص کالوس‌دهی، پس از گذشت دو هفته تشکیل کالوس بر روی برگ‌های لپه‌ای در کلیه محیط‌های کشت به کار رفته بجز محیط‌های شاهد فاقد هورمون و در تعداد زیادی از ریزنمونه‌های محور زیر لپه قابل مشاهده بود. درصد بالایی از ریزنمونه‌های مورد مطالعه در گیاه *B. juncea* نیز کال‌زایی قابل قبولی نشان دادند (Muhammad *et al.*, 2002; Moghaieb *et al.*, 2006; Bano *et al.*, 2010). در ریزنمونه-های محور زیر لپه ناحیه کالوس در دو سر برش یافته بود که به تدریج و طی چند روز سر تاسر ریزنمونه را فرا می‌گرفت، برای ریزنمونه‌های برگ لپه‌ای در ابتدا کالوس در نزدیکی دمبرگ و در ادامه روی قسمت‌هایی از برگ که در تماس با محیط کشت بود، دیده شد و در آخر تمامی برگ را پوشانید این یافته‌ها با نتایج محققین دیگر بر روی گیاهانی چون *Brassica napus*، *B. juncea* و *B. campestris* هم‌خوانی دارد (Jain *et al.*, 1988; Guo *et al.*, 2005; Bano *et al.*, 2010). بیشترین کالوس‌دهی در تیمارهای با غلظت ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP به همراه یک میلی‌گرم در لیتر NAA و سه میلی‌گرم در لیتر BAP و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA به ترتیب در ریزنمونه‌های محور زیر لپه و برگ لپه مشاهده شد (شکل‌های ٦ و ۷)، اما شاداب‌ترین کالوس‌ها با رنگ سبز در محیط‌های کشت دارای ترکیب تیماری ۰/۵ میلی گرم بر لیتر NAA و ٤ میلی گرم در لیتر BAP در ریز نمونه‌های برگ لپه

www.SID.ir

Archive of SID

تولید شد (شکل ۱-الف). محاسبه درصد کال‌زایی و تجزیه آماری داده‌ها پس از یک ماه نشان داد که اثر تیمارهای NAA و BAP به تنهایی و همچنین اثرات متقابل آنها معنی‌دار است بنابراین ترکیب مؤثر NAA و BAP در هر دو ریزنمونه موجب کال‌زایی می‌شود در دیگر اعضای خانواده براسیکاسه نیز این مسئله مشاهده شده است به طوری که تیمار هورمونی B_2N_2 برای محور زیر لپه کلزا (Kahrizi *et al.*, 2010) و تیمار $B_2N_{0.2}$ برای برگ لپه *B. juncea* (Jain *et al.*, 1988) تولید کالوس کردند. بیان شده است که *B. juncea* و *B. campestris* در محیط‌های بدون اکسین کالزای کمی داشتند در نتیجه می‌توان گفت اکسین برای کال زایی مفید است (Jain *et al.*, 1988). در مطالعه حاضر ریزنمونه‌های برگ لپه-ای از نظر بیشترین میزان کالوس‌دهی به عنوان ریز نمونه بهتر پیشنهاد می‌شوند. ساقه‌زایی یا کال‌زایی از ریزنمونه‌های مختلف در گونه‌های براسیکا تحت تأثیر تعادل هورمونی استفاده شده است که می‌تواند ناشی از موقعیت متفاوت فیزیولوژیکی ریزنمونه (Dunwell *et al.*, 1976) و یا تحت کنترل ژنتیکی باشد (Jain *et al.*, 1988).

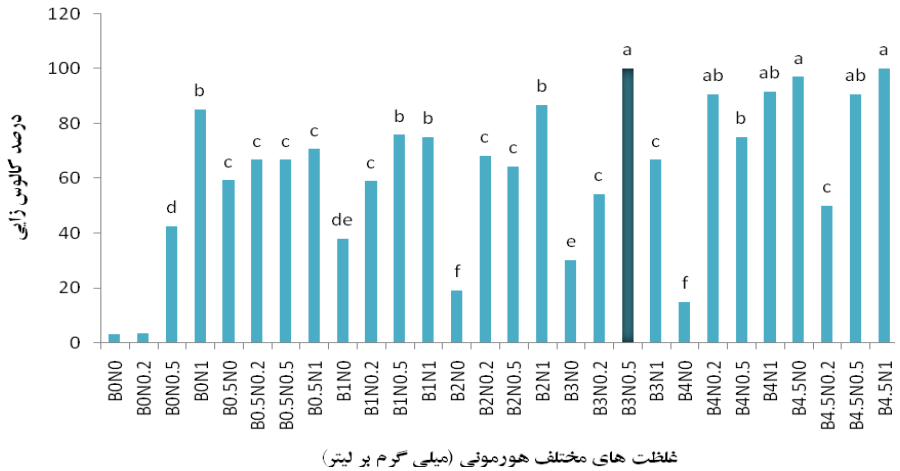


شکل ٦- نمودار میانگین درصد کالوس دهی ریز نمونه‌های محور زیر لپه. B_i: غلظت هورمون BAP بر حسب میلی‌گرم در لیتر، N_j: غلظت هورمون NAA بر حسب میلی‌گرم در لیتر. حروف روی شکل برحسب آزمون LSD در سطح ۵ درصد می‌باشد.

Figure 6- Graph of callus induction in hypocotyls. B_i: Concentration of BAP (mg L^{-1}), N_j: Concentration of NAA (mg L^{-1}). The letters on columns are based on LSD test ($p \leq 0.05$).

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۷- نمودار میانگین درصد کالوس دهی ریز نمونه‌های برگ لپه. B_i: غلظت هورمون BAP بر حسب میلی‌گرم در لیتر، N_j: غلظت هورمون NAA بر حسب میلی‌گرم در لیتر. حروف روی شکل برحسب آزمون LSD در سطح ۵ درصد می‌باشد.

Figure 7- Graph of callus induction in cotyledons. B_i: Concentration of BAP (mg L^{-1}), N_j: Concentration of NAA (mg L^{-1}). The letters on columns are based on LSD test ($p \leq 0.05$)

در این گیاه ریز نمونه‌های برگ پاسخ‌دهی دیرتری به محیط کشت بافت داشتند برگ‌های لپه در گیاه *Coronopus navasii* نیز در ابتدا فعالیت کمی داشتند و پس از گذشت ۸۰ روز ساقه‌زایی داشتند (Iriondo *et al.*, 1990) اما در این گیاه پس از گذشت ۱۰-۷ روز کالزایی در آنها مشاهده شد. گرچه باززایی از طریق کالوس در تولید انبوه گیاهان اهمیت قابل ملاحظه‌ای دارد اما به دلیل بالا بودن احتمال وقوع تنوع سوماکلونی و صرف زمان نسبتاً طولانی‌تر برای تکثیر رویشی با هدف حفظ ژنوتیپ‌های معین چندان مناسب نیست. روش دیگر که انجام آن در شرایط آزمایشگاهی دشوارتر است، تشکیل مستقیم مریستم‌های شاخه بر روی بافت‌های جداکشت می‌باشد. سرعت تولید شاخه مستقیم بالاتر بوده و در نتیجه با توجه به پایین بودن تغییرات سوماکلونال برای ریزازدیادی، بسیار با ارزش است (Dixon *et al.*, Debnath *et al.*, 2006; 1996). قابل ذکر است که کالوس‌های تولید شده در محیط کشت پس از گذشت زمان، تولید نوساقه می‌کردند، همانطور که در نتایج مشخص است برخی از تیمارهای استفاده شده بر روی هر دو ریزنمونه کالزایی و ساقه‌زایی را با هم نشان دادند (شکل‌های ٤ تا ۷) Singh *et al.* گزارش کردند که تمایز ساقه از کالوس‌های تشکیل شده بر روی برگ لپه در اکثر گونه‌های جنس براسیکا اتفاق می‌افتد، این نتایج توسط محققین دیگر نیز تأئید شده است (Mathews *et al.*, 1990; Guo

www.SID.ir

Archive of SID

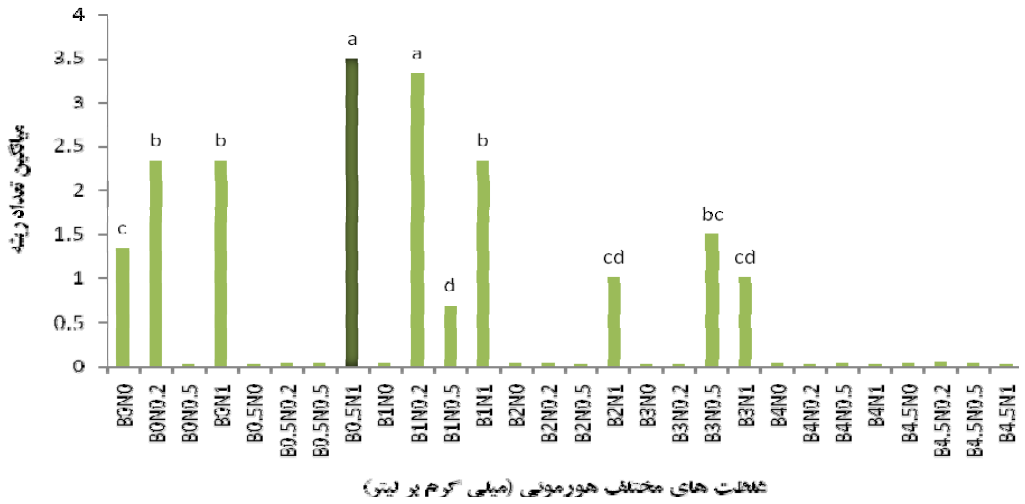
et al., 2005; Bano *et al.*, 2010). بالاترین کال‌زایی ۹۰ و ۱۰۰ درصد به ترتیب در محور زیر لپه و برگ‌های لپه است در حالی که بالاترین درصد کال‌زایی در گیاه *B. juncea* ٦٥/٥ درصد از محور زیر لپه بوده است. از آنجا که تعداد تیمارهای بیشتری ساقه‌زایی مستقیم را نشان داد و اکثر کالوس‌های تولید شده به سمت تولید نوساقه پیش رفتند، می‌توان نتیجه گرفت که گیاه ازمک با سطوح هورمونی آزمایش شده تمایل بیشتری برای تولید نوساقه در محیط کشت دارد و گزینه‌ای مناسب برای استفاده در پروژه‌های انتقال ژن می‌باشد.

هدف از انتقال شاخه به محیط ریشه‌زایی تحریک آنها به ایجاد ریشه و تبدیل به گیاه کامل و کسب شرایط لازم برای انتقال به محیط آزاد است تحریک ساقه به ایجاد ریشه در گونه‌های علفی به سهولت انجام می‌گیرد به همین دلیل در گیاه ازمک ریشه‌زایی به راحتی انجام شد به طوری که در همان سطوح هورمونی قبل تعدادی از تیمارها در هر دو ریز نمونه مورد مطالعه ایجاد ریشه‌های نوپدید کردند (شکل‌های ۸ و ۹)، تولید ریشه‌های نوپدید در محیط‌های اولیه کشت بافت در گیاه آلوئه‌ورا نیز مشاهده شد (Garro-Monge *et al.*, 2008). در سه گونه *B. juncea*، *B. campestris* و *B. carinata* نوساقه‌ها به آسانی در همان محیط‌ها با طولانی کردن کشت ریشه‌دار می‌شدند (Jain *et al.*, 1988).

با این وجود برای تولید ریشه‌های قوی‌تر تحریک قاعده گیاه توسط هورمون IBA انجام شد این هورمون در برخی از گونه‌های براسیکا مانند کلزا تولید ریشه‌های نوپدید می‌کند (Mollika *et al.*, 2001) و برای اینکه حیات ریشه و کارایی آن در شرایط آزاد تداوم داشته باشد باید محیط اطراف ریشه گیاهچه بطور تدریجی تغییر داده شود تا اینکه تنش وارده به گیاهچه غیر قابل تحمل نباشد بنابراین گیاهچه‌ها به مدت دو هفته وارد محیط بدون هورمون با غلظت کامل عناصر معدنی شدند تا ریشه‌ها ضمن تأمین نیاز غذایی خود یک دوره رشد بدون هورمون را نیز طی کنند پس از گذشت این مرحله ریشه‌های رشد یافته به خوبی مشاهده می‌شدند (شکل ۱-ج).

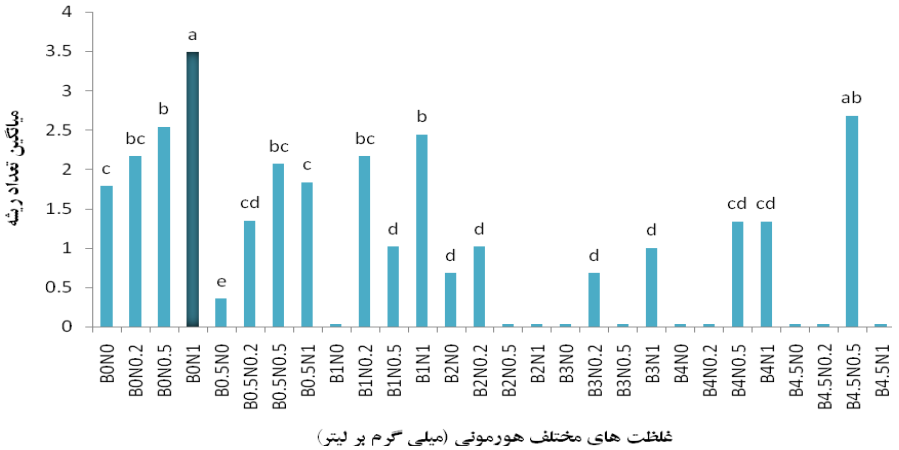
www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۸- نمودار میانگین تعداد ریشه نوپدید در ریز نمونه‌های محور زیر لپه. B_i: غلظت هورمون BAP بر حسب میلی‌گرم در لیتر، N_j: غلظت هورمون NAA بر حسب میلی‌گرم در لیتر. حروف روی شکل برحسب آزمون LSD در سطح ۵ درصد می‌باشد.

Figure 8- Graph of root generation in hypocotyls. B_i: Concentration of BAP (mg L^{-1}), N_j: Concentration of NAA (mg L^{-1}). The letters on columns are based on LSD test ($p \leq 0.05$).



شکل ۹- نمودار میانگین تعداد ریشه نوپدید در ریز نمونه‌های برگ لپه. B_i: غلظت هورمون BAP بر حسب میلی‌گرم در لیتر، N_j: غلظت هورمون NAA بر حسب میلی‌گرم در لیتر. حروف روی شکل برحسب آزمون LSD در سطح ۵ درصد می‌باشد

Figure 9- Graph of root generation in cotyledons. B_i: Concentration of BAP (mg L^{-1}), N_j: Concentration of NAA (mg L^{-1}). The letters on columns are based on LSD test ($p \leq 0.05$).

www.SID.ir

Archive of SID

محاسبات آماری نشان داد، اثر متقابل هورمون‌های مورد استفاده در کلیه ریز نمونه‌ها بسیار معنی‌دار است. بیشترین تعداد ریشه نوپدید در تیمارهای با غلظت ۰/۵ میلی گرم در لیتر BAP به همراه یک میلی گرم در لیتر NAA و یک میلی‌گرم در لیتر NAA بدون حضور BAP به ترتیب در ریز نمونه‌های محور زیر لپه و برگ-های لپه‌ای مشاهده شد (شکل‌های ۸ و ۹). در گیاه آرتمیزین بهترین درصد ریشه با تیمار یک هفته‌ای ۰/۰۵ میلی‌گرم بر لیتر NAA صورت گرفت (Chenshu *et al.*, 2003). تیمارهای شاهد در هر دو ریزنمونه ریشه‌زایی خوبی با میانگین تعداد ریشه ۱/۷۹ و ۱/۳٤ داشتند. در گیاه *C. navasii* نیز ریشه‌زایی و توسعه ریشه در محیط بدون هورمون روی داد به طوریکه ۵۲ درصد ریشه‌زایی با میانگین تعداد ریشه ۲/۷ در محیط بدون هورمون بدست آمد (Iriondo 1990). دو وراثیه مورد مطالعه از گیاه *B. juncea* ریشه‌های مناسبی در محیط بدون هورمون تولید کردند، به طوریکه واریته BARI 11 ۹۰ درصد و واریته BARI16 ۸۰ درصد ریشه‌زایی داشتند (Sanjida *et al.*, 2011).

پس از انتقال به محیط بدون هورمون همزمان با رشد ریشه، طول شاخه‌ها شدیداً افزایش یافت (شکل ۱-ج). گاهی هنگام انتقال شاخه‌های نوپدید به محیط‌های کشت بدون سیتوکینین یا با مقدار کم سیتوکینین، استفاده از ژیبرلین‌ها جهت افزایش رشد طولی ضروری است (Dixon *et al.*, 1996). در مورد گیاه ازمک همزمان با رشد ریشه، شاخه‌های نوپدید در محیط‌های بدون هورمون رشد بسیار سریعی نشان دادند به طوریکه نیازی به کاربرد هورمون رشد ژیبرلین نبود. از این رو امکان انتقال سریع به محیط برون شیشه در مدت زمان کوتاهی پس از تشکیل ریشه‌ها امکان پذیر شد. بعد از ریشه‌دار شدن، گیاه برای تبدیل از حالت دگر غذایی به حالت خود غذایی و انتقال به شرایط آزاد خاک آماده می‌شود به همین خاطر شاخه‌های قوی دارای تعداد و سطح برگ کافی و جوانه انتهایی سالم وارد این مرحله شدند تا توانایی لازم برای سازگاری با محیط جدید را داشته باشند، نتایج نشان داد ۹۰ درصد گیاهانی که به این محیط منتقل شده بودند زنده مانده و از رشد قابل قبولی برخوردار بودند (شکل ۱-د). درصد بالای باززایی برای بسیاری از گیاهان موجود در این خانواده از جمله *C. navasii*، *B. napus*، *B. oleracea* و *B. juncea* مشاهده شده است که بیانگر پتانسیل بالای این گیاهان برای تکثیر و ریزازدیادی از طریق کشت بافت است (Iriondo *et al.*, 1990; Cheng *et al.*, 2001; Khan *et al.*, 2002; Guo *et al.*, 2005; Bano *et al.*, 2010).

با توجه به نتایج بدست آمده سعی شد تیمارهایی معرفی شود که علاوه بر میزان شاخه-دهی یا کالوس‌دهی بالا، مقدار هورمون استفاده

www.SID.ir

Archive of SID

شده برای آنها کمتر باشد و ریشه‌زایی قابل قبولی داشته باشند. از آنجا که بر روی کشت بافت گیاه ازمک تاکنون گزارشی ثبت نشده است و با توجه به پتانسیل بالای این گیاه برای باززایی و ساقه-زایی مستقیم در محیط کشت بافت امید است بتوان از این گیاه به عنوان گیاهی مدل در مهندسی ژنتیک و انتقال ژن استفاده کرد از طرف دیگر این گیاه دارای مقدار قابل توجهی سولفورافان است که تکثیر درون شیشه به عنوان روشی مفید برای بدست آوردن مقدار زیادی از این ماده در مدت زمان کوتاهی پیشنهاد می‌شود.

منابع

Khosh-khui M (1999). Plant Propagation, Principles and Practices. Third volume. Shiraz publication 1003-1062 (In Farsi).

Kahrizi D, Salmanian A, Zebarjadi AR (2010). Effect of cultivar and density of cultured cotyledons on shoot regeneration in rapeseed (*Brassica napus* L.). Journal of Agriculture Biotechnology 9: 1-6. (In Farsi).

Mozaffarian V (2005). Plants systematic "second Book: Dicotyledonous. Amir Kabir Institute Publications. (In Farsi).

Antonio BA, Namai H, Kikuchi F (1987). Tissue culture ability of vegetative organs from defferent cultivars of Brassica. Sabrao Journal 19: 73-79.

Bano R, Haroon khan M, Sher khan R, Rashid H, Swati ZA (2010). Development of an Efficient Regeneration Protocol for Three Genotypes of *Brassica juncea*. Pakistan Journal of Botany 42: 963-969.

Barna K, Wakhlu A (1988). Axillary shoot induction and plant regeneration in *Plantago ovate* Forssk. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 15:169-173.

Cardoza V, Stewart CN (2004). *Brassica* biotechnology: progress in cellular and molecular biology. In vitro cellular and Developmental Biology-plant 40: 542-551.

Chang SH, Ho CK, Chen ZZ (2001). Micropropagation of *Taxus mairei* from mature trees. Plant Cell Reports 20:496-502.

Chenshu A, Wang X, Yuan X, Zhao B, Wang Y (2003). Optimization of preservation of *Artemisia annua* L. callus. Biotechnol. Letters 25: 35-38.

Cheraghi A, Lorestani B, Malayeri E (2007). Removal of Heavy Metals by Native Accumulator Plants. International Journal of Agriculture & Biology. 1560-8530. 09-3-462-465.

Cheraghi M, Lorestani B, Yousefi N (2011). Introduction of Hyperaccumulator Plants with Phytoremediation Potential of a Lead- Zinc Mine in Iran. World Academy of Science, Engineering and Technology 77: 163-168.

Debnath M, Malik CP, Bisen PS (2006). Micropropagation: a tool for the production of high quality plant-based medicines. Current Pharmaceutical Biotechnology 7: 33-49.

Dietert MF, Barron SA, Yoder OC (1982). Effects of genotype on *In vitro* culture in the genus *Brassica*. Plant Science Letters 26: 233-240.

Dixon RA, Gonzales RA (1996). Plant cell culture: a practica approach. IRL press, Oxford, UK.

Dunwell JM (1976). A comparative study of environmental and developmental factors which

www.SID.ir

Archive of SID

influence embryo induction and growth in cultured anthers of *Nicotiana tabacum.* Environmental and Experimental Botany 16:109-118

Eapen S, George L (1997). Plant regeneration from peduncle segments of oil seed *Brassica* species: influence of Silver nitrate and Silver thiosulfate. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 51:229-232.

Fahey JW, Xavier H, Dolan PM, Kensler TW, Scholtus I, Stephenson KK, Talalay P, Lozniewsk A (2002). Sulforaphane inhibits extracellular, intracellular,and antibiotic-resistant strains of Helicobacter pylori and prevents benzo[a]pyreneinduced stomach tumors. Medical sciences 99: 7610-7615.

Fazekas GA, Sedmach PA, Palmer MV (1986). Genetic and environmental effects on *In vitro* shoot regeneration from cotyledonary explants of *Brassica juncea***.** Plant Cell, Tissue and Organ Culture 6: 177-180.

Garro-Monge G, Gatica-Arias AM, Valdez-Melara M (2008). Somatic embryogenesis, plant regeneration and acemamnan detection in aloe (*Aloe barbadensis* MILL.). Agronomia Costarricense 32: 41-52.

Gaskin JF, Zhang DY, Claudebon M (2005). Invasion of *Lepidium draba* in the western United States: distributions and origins of chloroplast DNA Haplotypes. Molecular Ecology 14: 2331–2341.

George L, Rao PS (1980). In vitro regeneration of mustard plants *(Brassicajuncea* var.Rai-5) on cotyledon explants from non-irradiated irradiated and mutagen-treated seed. Annals of Botany 46: 107-112.

Ghasemi BJ, Karlov GI, Ahmadikhah A (2007). Effects of genotype, explant type and nutrient medium components on canola (*Brassica napus* L.) shoot *in vitro* organogenesis. African Journal of Biotechnology 6: 861-867.

Guo DP, Zhu ZJ, Hu XX, Zheng SJ (2005). Effect of cytokinins on shoot regeneration from cotyledon and leaf segment of stem Mustard (*Brassica juncea* var. tsatsai). Plant Cell, Tissue and Organ Culture 83: 123-127.

Hachey JE, Sharma KK, Moloney MM (1991). Efficient shoot regeneration of *Brassica campestris* using cotyledon explants cultured *In vitro*. Plant Cell Reports 9: 549-554.

Hashemabadi D, Kaviani B (2008). Rapid micropropagation of *Aloe vera* L. via shoot multiplication. African Journal of Biotechnology 7:1899-1902.

Hu Q, Anderson SB, Hansen LN (1999). Plant regeneration capacity of mesophyll protoplasts from *Brassica napus* and related species. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 59: 189-196.

Iriondo JM, Perez C (1990). Micropropagation of an endangered plant species: *Coronopus navasii* (Brassicacea). Plant Cell Reports 8: 745-748.

Jain RK, Chowdhury JB, Sharma DR, Friedt W (1988). Genotypic and media effects on plant regeneration from cotyledon explant cultures of some *Brassica* species. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 14: 197-206.

Kadota M, Niimi Y (2004). Improvement of micropropagation of Japanese yam using liquid and gelled medium culture. Scientia Horticulturae 102: 461-466.

Khan MR, Rashid H, Quraishi A (2002). High frequency shoot regeneration from Hypocotyl of Canola (*Brassica napus* L.) cv. Dunkled. Plant Tissue Culture 12(2): 131-138.

Khan N, Alam MS, Nath UK (2004). *In vitro* regeneration of garlic through callus culture. Journal of Biological Sciences 4: 189-191.

Khehra GS, Mathias RJ (1992). The interaction of genotype, explant and media on the regeneration of shoots from complex explants of Brassica napus L. Journal of Experimental Botany 43: 1413-1418.

www.SID.ir

Archive of SID

Khosh-Khui M, Shekafandeh A, Azarakhsh H (1984). Micropropagation of myrtle. Scientia Horticulturae 22: 139-146.

Klimaszewska K, Keller K (2002). High frequency plant regeneration from thin cell layer explants of *Brassica napus*. Plant Cell, Tissue Organ Culture 4: 183-197.

Koh WL, Loh CS (2000). Direct somatic embryogenesis, plant regeneration and *in vitro* flowering in rapid-cycling *Brassica napus*. Plant Cell Reporters 19: 1177-1183.

Mathews VH, Bharathan N, Litz RZ, Rao PS, Bhatia CR (1990). Transgenic plants of mustard *Brassica juncea* L. czern and coss. Plant Science 72: 245–252.

Moghaieb RE, El-Awady MA, Mergawy RG, Youssef SS, El-Sharkawy AM (2006). A reproducible protocol for regeneration and transformation in canola (*Brassica napus* L.). African Journal Biotechnology 5: 143-148.

Mollika SR, Sarker RH, Hoque MI (2001). In vitro plant regeneration in Brassica spp.. Plant Tissue Culture & Biotechology 21: 127-134.

Muhammad RK, Rashid H, Quraishi A (2002). Effects of various growth regulators on callus formation and regeneration in *Brassica napus* Cv. Oscar. Pakistan Journal Biology Science 5: 693-695.

Nikolic R, Mitic N, Neskovic M (1997). Evaluation of agronomic traits in tissueculture-derived progeny of birds-foot trefoil. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 48:67-69.

Nouri J, Lorestani B, Yousefi Khorasani, N, Hasani N, Seif A, Cheraghi F (2011). Phytoremediation potential of native plants grown in the vicinity of Ahangaran lead–zinc mine (Hamedan, Iran). Environmental Earth Science 62: 639–644.

Ono Y, Yoshinito T, Kazuma N (1994). Effect of genotype on shot regeneration from cotyledonary explants of rape seed (*Brassica napus* L.). Plant Cell Reporters 14: 13-17.

Phogat SK, Burma PK, Pental D (2000). High frequency regeneration of *Brassica napus* varieties and genetic transformation of stocks containing fertility restorer genes of two cytoplasmic male sterility systems. Journal of Plan Biochemistry and Biotechnology 9: 73-79.

Powell E, Hill GA, Juurlink BH, Carrier DJ (2004). Glucoraphanin extraction from *Cardaria draba*: Part1.Opti-mization of batch extraction. Journal of Chemical Technology and Biotechnology 80: 985–991.

Powell E, Hill G, Juurlink B, Carrier D (2005). Glucoraphanin extraction from *Cardariadraba*: Part 2. Countercurrent extraction, bioactivity and toxicity testing. Journal of Chemical Technology and Biotechnology 80: 992–997.

Radke SE, Andrews BM, Moloney MM, Crouch ML, Krid JC, Knauf VC (1988). Transformation of *Brassica napus* L., using *Agrobacterium tumefaciens*: developmentally regulated expression of a reintroduced napin gene. Theoretical and Applied Genetics 75: 685-694.

Sama AE, Hughes HG, Abbas MS, Shahba MA (2012). An Efficient In Vitro Propagation Protocol of Cocoyam [*Xanthosoma sagittifolium* (L) Schott]. The Scientific World Journal Article ID 346595, 10 pages doi:10.1100/2012/346595.

Sanjida RM, Sarker RH, Hoque MI (2011). *In vitro* Plant Regeneration in *Brassica spp.* Plant Tissue Culture and Biotechnology 21: 127-134.

Sawsan S, Abou-Dahab T, Youssef E (2004). *In vitro* propagation of cactus *(Cereus peruvianus l.).* Arab Journal of Biotechnology 8:169-176.

Sivaram L, Mukundan U (2003). *In vitro* culture studies on *Stevia rebaudiana*. In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant 39: 520-523.

Wahlroos T, Susi P, Tylkina L, Malyshenko S, Zvereva S, Korpela T (2003). Agrobacterium-mediated transformation and stable expression of the green fluorescent protein in

www.SID.ir

Archive of SID

Brassic arapa. Plant Physiology and Biochemistry 41: 773–778

Zhang Y, Xu J, Han L, Wei W, Guan Z, Cong L, Chai T (2006). Efficient shoot regeneration and Agrobacterium- mediated transformation of *Brassica juncea*. Plant mol. Bio. Rep. 24: 255a-255i.

www.SID.ir

Archive of SID

Regeneration of White top (*Cardaria draba* L.) using Tissue Culture

Ghotbzadeh Kermani S.[1*], Pourseyedi Sh.[2], Mohamadi Gh.A.[3], Moieni A.[4], Baghizadeh A.[5]

[1] M.Sc,Graduate University of Advanced Technology, Kerman.
[2] Assistant Professor ,Department of Biotechnology, Shahid Bahonar University of Kerman , Kerman.
[3] Associate Professor, kerman University of Medical Sciences, Kerman.
[4] Associate Professor, Department of Plant Breeding and Agricultural Biotechnology, Faculty of Agriculture, Tarbiat Modares University,Tehran.
[5] Associate Professor, Department of Biotechnology**,** Institute of Science and High Technology and Environmental Sciences, Graduate University of Advanced Technology, Kerman.

Abstract

Tissue culture is a useful and applicable method in micropropagation and plants mass production in a short period of time irrespective of growing and planting season. Meanwhile it is a new and effective method to breed plants through gene transformation. Despite these advantages, a useful tissue culture system for effective regeneration is required for many plants such as White top (*Cardaria draba*). White top contains a lot of sulforaphan for which it is considered a medicine plant which in turn highly requires a suitable protocol for its effective regeneration. In this study, the samples gathered in Kerman Township were used and the ability of the plant for callus induction and shoot regeneration was studied in vitro in two separate factorial experiments in randomized complete block design, BAP: in 7 levels and NAA in 4 levels. The first experiments were carried on cotyledon explants and the second one on hypocotyl explants with 3 replications in the years 2010 and 2011. Considering the statistical analysis ($p \leq 0.05$), 3 mg/L BAP plus 0.5 mg/L NAA treatment and 3 mg/L BAP plus 1 mg/L NAA hormone treatment had the callus induction and the most suitable number of shoots for cotyledon and hypocotyl explants, respectively. The best root generation was for cotyledon and hypocotyl explants using only 1 mg/L NAA treatment and 0.5 mg/L BAP plus 1 mg/L NAA treatment, respectively. All the samples were placed on MS liquid containing 2 mg/L IBA and then they were elongated in the full strength medium without growth regulators for 2 weeks. After that, they were kept in the pots containing sterilized peat moss under greenhouse conditions for 4 weeks which resulted in 90% success in the plants regeneration.

Key word: *White top, Tissue culture, Callus induction, Shoot regeneration.*

[*] Corresponding Author: Ghotbzadeh Kermani S. Tel: 03426228014 Email: sp.ghotbzadeh@gmail.com

www.SID.ir