اثر نور و تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی بر کالوس‌زایی و تجمع آنتوسیانین در کالوسهای حاصل از جداکشتهای مختلف در رز گالیکا (*Rosa gallica* L.)

فرخنده رضا نژاد* و روشنک طراحی

[۱]**کرمان، دانشگاه شهید باهنر، دانشکده علوم، گروه زیست‌شناسی**

تاریخ دریافت: ۸۸/۹/۹ تاریخ پذیرش: ۹۰/۳/۴

چکیده

تولید کالوس و میزان آنتوسیانین در رز گالیکا (*Rosa gallica* L.) از جداکشتهای رویشی (دمبرگ، برگ و ساقه) و گلی شامل بساک، مادگی و گلبرگ تحت اثر عوامل فیزیکی (نور و تاریکی) و شیمیایی (تنظیم‌کننده‌های رشد شامل 2, 4-D، BAP و GA_3) در زمانهای مختلف بررسی شد. جداکشتها روی محیط کشت موراشیگ و اسکوگ (MS) تغییر یافته واجد ویتامینها و تنظیم کننده‌های رشد لازم کشت شدند و تحت تیمار تاریکی و نیز دوره نوری ۸/۱۶ ساعت با شدتهای نوری۱۰۰۰ و ۲۰۰۰ لوکس قرار گرفتند. جداکشتها هر دو هفته یک بار روی محیط کشت تازه واکشت شدند. نتایج نشان داد که غلظت ۳-۲ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D و ۱ میلی‌گرم در لیتر BAP برای تحریک تولید کالوس در جداکشتهای مختلف بهینه بودند. GA_3 سبب کاهش کالوس‌زایی شد. پس از ۴ روز تولید کالوس در جداکشت ساقه و پس از ۸ روز، القای کالوس در سایر جداکشتها شروع شد و در طی هفته‌های بعد کالوسها بسیار بزرگ و حجیم شدند. اثر تیمارهای نوری (۱۰۰۰ و ۲۰۰۰ لوکس) و تاریکی، اثر معنی‌داری برکالوس‌زایی نشان ندادند اما نور با شدت ۲۰۰۰ لوکس تا حدودی سبب بازدارندگی کالوس‌زایی در جداکشتهای رویشی و بساک شد. کالوسهای ایجاد شده در این گونه در نور، قرمز رنگ و محتوی آنتوسیانین بودند که بالاترین میزان در جداکشتهای برگی با شدت نوری ۲۰۰۰ لوکس مشاهده شد. کالوسهای رشد یافته در تاریکی سفید تا کرم رنگ، نرم و شکننده و محتوی میزان بسیار اندکی آنتوسیانین بودند.

واژه های کلیدی: کالوس‌زایی، آنتوسیانین، تاریکی، نور، تنظیم کننده‌های رشد، *Rosa gallica* L.

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۳۴۱۳۲۲۲۰۳۲ پست الکترونیکی: frezanejad@mail.uk.ac.ir

مقدمه

انواع مختلف رز در صنایع عطرسازی، آرایشی، غذایی و اهداف پزشکی در دنیا کاربرد دارند. گل سرخ گالیکا (Rosa gallica L.) یک گیاه تجاری بسیار معطر با گلهای به رنگ قرمز تند می‌باشد. از این گیاه در صنایع غذایی، آرایشی و درمان برخی بیماریها استفاده می‌شود. این گیاه که یکی از مهم‌ترین گیاهان تجاری و دارویی است، به طور معمول به وسیله روشهای رویشی برای مثال قلمه زدن، لایه بندی، جوانه زنی و پیوند باززایی می شود. در این روشها تولید گیاه سالم (عاری از پاتوژن)، وابستگی به فصل و سرعت کند تکثیر، از عوامل محدود کننده این نوع باززایی هستند (۱۹). تکثیر آزمایشگاهی با استفاده از فنون کشت بافت می‌تواند به عنوان جایگزینی برای روشهای ازدیاد سنتی در نظر گرفته شود. به علاوه باززایی از طریق قطعات جداکشت در جهت حفظ ژنوتیپهای خاص نیز حائز اهمیت است (۲). بنابراین، امروزه این مشکلات توسط کشت بافت حل شده و از این طریق می‌توان گیاهان سالم، گیاهان تراریخت با عمر طولانی‌تر و ظرفیت بالای تکثیر در زمان کوتاه را به دست آورد. به طوری که با استفاده از

Archive of SID
www.SID.ir

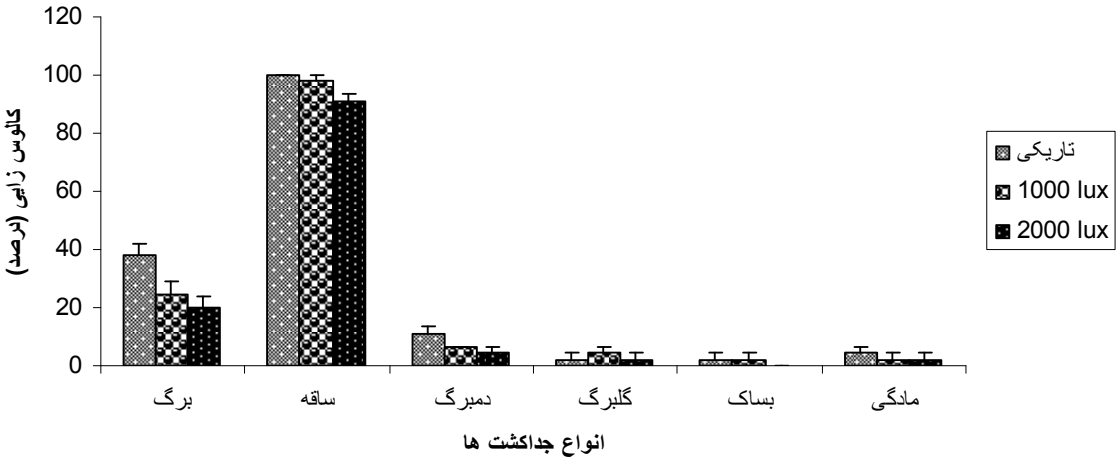
روش کشت بافت، تنها با استفاده از یک گیاه گل سرخ می توان ۴۰۰۰۰۰ گیاه کلون کرد (۱۹). همچنین از کالوسهای به دست آمده از طریق کشت بافت برای تولید میزان بالای متابولیتهای ثانویه مفید از جمله فلاونوئیدها (فلاونها، فلاونولها، آنتوسیانینها و....)، اسانسها و... استفاده می شود که از نظر اقتصادی بسیار به صرفه و مفید هستند.

Rout و همکاران (۱۹۹۲) گزارش کردند که نسبت تنظیم کننده‌های رشد BAP (۰/۵ میلی‌گرم در لیتر) و NAA (۰/۱ میلی‌گرم در لیتر) القاء کالوس در قطعات برگ *Rosa hybrida* را القاء می‌کند (۲۸). در گزارش دیگری توسط Lloyd و همکاران (۱۹۸۸) تولید کالوس در قطعات برگی *Rosa persica×xanthiana* با استفاده از ۲-۱ میلی‌گرم در لیتر BAP و ۰/۳-۰/۱ میلی‌گرم در لیتر NAA تحریک شد (۲۱). به علاوه، القای کالوس از قطعات برگی Hybrid Tea rose با غلظت ۵-۰/۰۵ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D و شیر نارگیل توسط Hill (۱۹۶۷) گزارش شده است (۱۲). مطالعات Hsia و Korban (۱۹۹۶) نشان داد که کالوس‌زایی در غلظت ۲۲/۱-۲/۲ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D یا ۲۰-۲ میلی‌گرم در لیتر NAA از قطعات برگی و ساقه‌ای *Rosa hybrida* cv. Carefree Beauty القاء شد (۱۳). در گزارشی از Gasper و همکاران (۱۹۸۵) آمده است که نور فعالیت IAA اکسیداز را افزایش می‌دهد که باعث تغییر تعادل اکسین/سیتوکینین و متعاقباً کاهش بنیان‌گذاری و رشد کالوس می‌شود (۱۰).

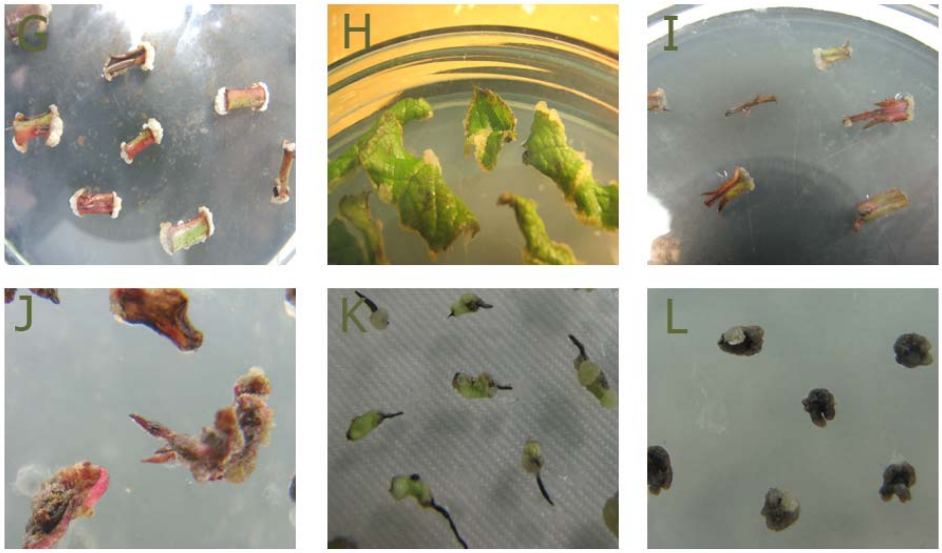
رز گالیکا مقوی و قابض بوده در درمان خونریزی داخلی، آب‌ریزش بینی، بیماریهای روده‌ای و چشمی مورد استفاده قرار می‌گیرد. معجون این گیاه برای درست کردن قرص استفاده می‌شود که اگر آهن به آن اضافه شود یک قرص سیاه سخت تشکیل می‌دهد که بدون تغییر از مجرای غذایی رد می‌شود (۹). آنتوسیانینها بزرگترین زیرگروه فلاونوئیدهای گیاهی هستند و در بیشتر موارد ایجاد دامنه رنگی از قرمز تا بنفش را در گل و دیگر اندامهای گیاه می‌کنند (۳۷). آنتوسیانینها به طور گسترده به منظور رنگ دهندگی به غذا مورد استفاده قرار می‌گیرند و دارای خواص آنتی‌اکسیدانی (۲۵، ۳۱)، ضد سرطانی (۱۷، ۱۸) و ضد جهشی (۳۳، ۳۴) نیز هستند. بنابراین تولید آنها از طریق کشت بافت بسیار مهم است زیرا استخراج آنتوسیانین از گیاه به صورت تازه دارای محدودیتهایی از جمله فصل است، به علاوه استخراج از گیاه خشک (ذخیره)، باعث کاهش آنتوسیانین می‌شود (۲۴). با توجه به اهمیت کشت در شیشه در تکثیر گیاهان و نیز استخراج متابولیتهای ثانویه از کالوس، در مقاله حاضر با استفاده از روش کشت در شیشه، کالوس‌زایی و استخراج آنتوسیانین مطالعه و بررسی شد.

Archive of SID
www.SID.ir

شکل ۱- القای کالوس در جداکشتهای مختلف رز گالیکا (*Rosa gallica* L.) در ۴ روز پس از کشت. A-C: جداکشتهای رویشی (ساقه، برگ و دمبرگ) و D-F: جداکشتهای گلی (گلبرگ، مادگی و بساک).



شکل ۲- درصد کالوس‌زایی جداکشتهای مختلف *Rosa gallica* L تحت تیمار تاریکی و شدت‌های نوری ۱۰۰۰ و ۲۰۰۰ لوکس ۴ روز پس از کشت.



شکل ۳- مقایسه پینه‌زایی جداکشتهای مختلف *Rosa gallica* L. در ۸ روز پس از کشت. A-C: جداکشتهای رویشی (ساقه، برگ و دمبرگ) و D-F: جداکشتهای گلی (گلبرگ، مادگی و بساک).

www.SID.ir

مواد و روشها

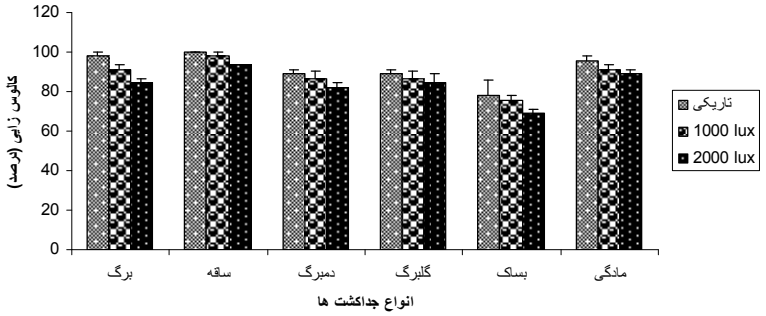
جمع آوری، آماده‌سازی و سترون‌سازی جداکشتها: بخشهای رویشی شامل ساقه، برگ، دمبرگ و گلی شامل گلبرگ، ، بساک و مادگی، از گیاهان سالم رز گالیکا (*Rosa gallica* L.) رشد یافته در منطقه لاله زار کرمان جمع‌آوری شدند. سترون‌سازی بخشهای حاصل به صورت زیر انجام شد: شستشو با مایع ظرف شویی به مدت ۱۵ دقیقه، قرار گرفتن در آب جاری به مدت ۳۰ دقیقه، تهیه جداکشتهای ۱-۰/۵ سانتیمتری با اسکالپل استریل، قراردادن جداکشتها در اتانول ۷۰ درصد به مدت ۱ دقیقه، هیپوکلریت سدیم ۱۰ درصد همراه با چند قطره Tween 20 (برای نفوذ بهتر شوینده به جداکشتها) به مدت ۶ دقیقه و کلرور جیوه ۱۰ درصد همراه با Tween 20 به مدت ۶ دقیقه. لازم به ذکر است که جداکشتها پس از انجام هر مرحله سترون سازی، ۳-۵ بار با آب مقطر استریل شستشو داده شدند تا بقایای مواد سترون کننده حذف شود. تمام مراحل توضیح داده شده زیر دستگاه لامینار ایر فلو انجام شد. به منظور رفع آلودگیهای باکتریایی از آنتی بیوتیک آمپی‌سیلین (۵ میلی‌گرم در۱۰۰ میلی لیتر آب مقطر) و تتراسایکلین (۵ میلی‌گرم در۱۰۰ میلی لیتر آب مقطر) به مدت ۳۰-۲۰ دقیقه استفاده شد (می‌توان به جای تتراسایکلین از جنتامایسین استفاده کرد). قبل از استفاده از آنتی بیوتیکها، انتهای جداکشتها با اسکالپل، به منظور جدا کردن بافت مرده و قهوه‌ای شده و دسترسی به آوندهای تازه برای جذب بهینه آنتی بیوتیکها، بریده شد.

کشت ریزنمونه‌ها (جداکشتها): محیط کشت موراشیگ و اسکوگ (MS medium, 1962) (۲۳) ویتامین‌دار همراه با هورمونهای 2,4-D (۱، ۲ و ۳ میلی‌گرم در لیتر)، BAP (۰/۵، ۱ و ۲ میلی‌گرم در لیتر) و GA_3 (۰/۵ میلی‌گرم در لیتر)، ۳ درصد ساکارز و ۰/۱درصد PVP و در برخی موارد از زغال فعال استفاده شد که در این صورت پس از ۳ روز نمونه‌ها باید به محیط بدون زغال فعال واکشت می‌شدند. پس از تنظیم pH محیط در ۵/۷ و قبل از اتوکلاو کردن، آگار (۸ گرم در لیتر) به محیط اضافه گردید. سپس محیط کشت اتوکلاو و پس از سرد شدن در دمای حدود ۴۰ درجه سانتی‌گراد، ۳۰-۲۵ میلی‌لیتر محیط به هر ظرف پتری با ۹ سانتیمتر قطر اضافه شد. ریزنمونه‌های مختلف در شرایط سترون روی محیط کشت قرار داده شدند. برای جلوگیری از آلوده شدن ظروف پتری، درب آنها با پارافیلم یا چسب بسته شد. جداکشتها در تاریکی و نور با شدتهای نوری ۱۰۰۰ و ۲۰۰۰ لوکس (۱۶ ساعت نور سفید فلورسنت و ۸ ساعت تاریکی) قرار گرفتند. برای هر جداکشت سه ظرف پتری و در هر ظرف ۱۵ ریزنمونه کشت شد. دمای نگهداری ظروف ۲±۲۳ درجه سانتی‌گراد بود. واکشت کردن نمونه‌ها هر دو هفته یک بار روی محیط جدید با همان غلظت هورمونی انجام شد.

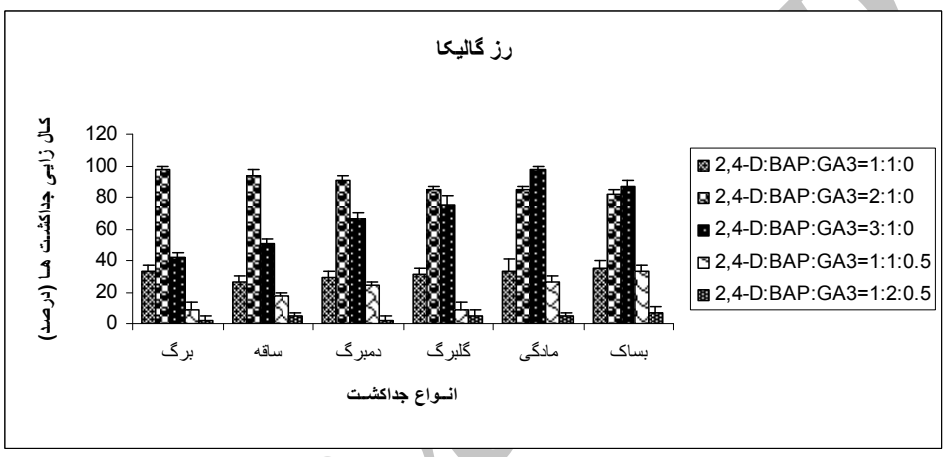
استخراج و بررسی آنتوسیانین: در زمانهای مختلف ۱۵، ۳۰، ۴۵ و ۶۰ روز پس از کشت ریزنمونه‌ها، جمع‌آوری کالوس از جداکشتهای مختلف انجام گرفت. به منظور اندازه‌گیری مقدار آنتوسیانین کالوسهای مختلف، از روش وانگر استفاده شد (۳۳). مطابق این روش، ۰/۱ گرم کالوس را درهاون چینی با ۱۰ میلی لیتر متانول اسیدی (متانول خالص و اسید کلریدریک خالص به نسبت حجمی ۹۹ به ۱) به طورکامل ساییده و عصاره حاصل در لوله‌های آزمایش درپیچ دار ریخته شد و به مدت ۲۴ ساعت در تاریکی و دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. سپس به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۴۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ و جذب روشناور در طول موج ۵۵۰ نانومتر خوانده شد.

آنالیز آماری : پس از تعیین نتایج خام اولیه، برای تفسیر نتایج از محاسبات آماری استفاده شد. برای تجزیه داده‌ها از نرم افزار آماری SPSS (نسخه شماره ۹) و آزمون دانکن در سطح ۹۵ در صد برای تعیین میانگین، انحراف معیار و آنالیز واریانس سه عاملی استفاده شد.

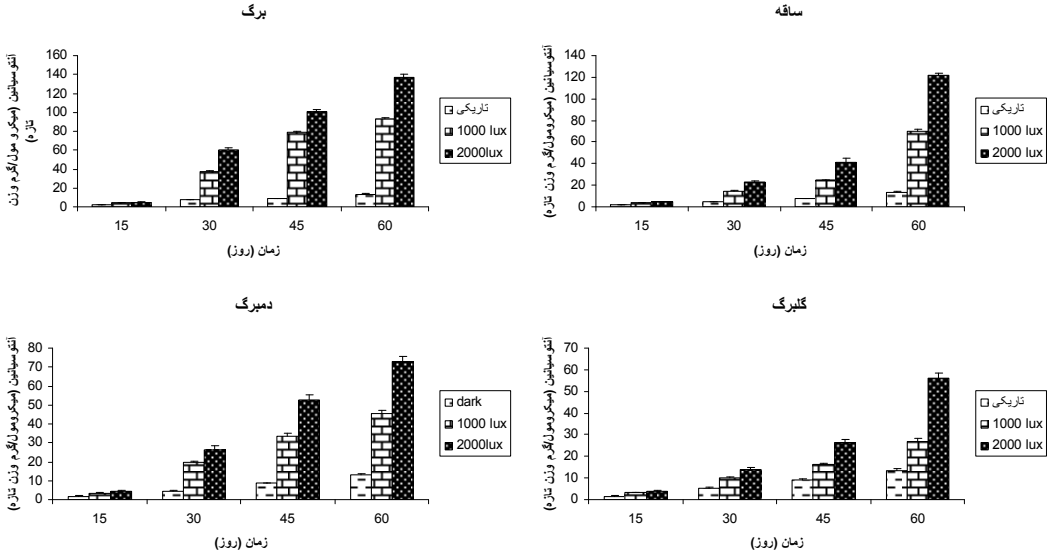
Archive of SID
www.SID.ir



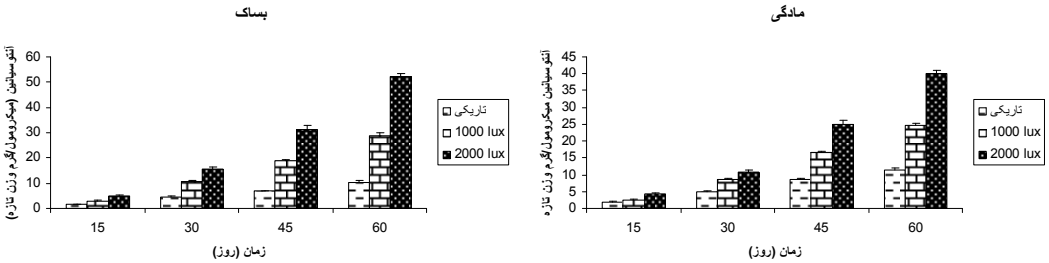
شکل ۴- درصد کالوس‌زایی جداکشتهای مختلف *Rosa gallica* L تحت تیمار تاریکی و شدتهای نوری ۱۰۰۰ و ۲۰۰۰ لوکس در ۸ روز پس از کشت.



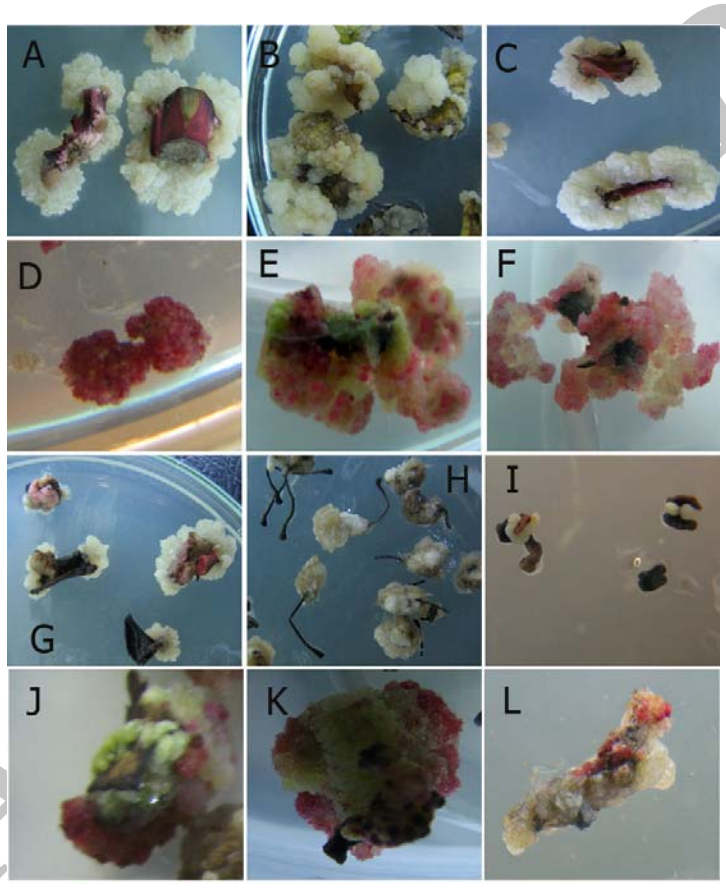
شکل ۵- درصد کالوس زایی جداکشتهای مختلف *Rosa gallica* L در نسبتهای هورمونی مختلف.



www.SID.ir

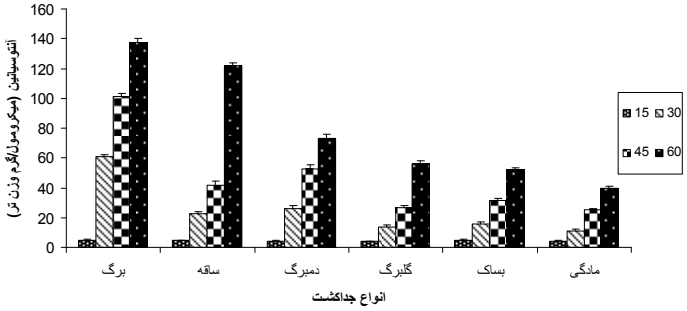


شکل ۶- میزان تولید آنتوسیانین در کالوسهای ۱۵، ۳۰، ۴۵ و ۶۰ روزه حاصل از جداکشتهای مختلف در رز گالیکا تحت تیمار تاریکی و نور (۱۰۰۰ و ۲۰۰۰ لوکس).



شکل A-L۷- تولید آنتوسیانین در کالوسهای جداکشتهای مختلف ۶۰ روزه در تاریکی و شدت نوری ۲۰۰۰ لوکس در *Rosa gallica* L. A-C: جداکشتهای رویشی در معرض تاریکی (به ترتیب برگ، ساقه و دمبرگ). D-F: جداکشتهای رویشی در معرض نور (به ترتیب برگ، ساقه و دمبرگ). G-I: جداکشتهای گلی در معرض تاریکی (به ترتیب گلبرگ، بساک و مادگی). J-L: جداکشتهای گلی در معرض نور (به ترتیب گلبرگ، بساک و مادگی).

www.SID.ir



شکل ۸- میزان آنتوسیانین در جداکشتهای مختلف رز گالیکا در زمانهای متفاوت (۱۵،۳۰، ۴۵ و ۶۰ روز) تحت تیمار نوری ۲۰۰۰ لوکس

نتایج

مطالعه فراوانی کالوس‌زایی نشان داد که که در ۴ روز پس از کشت، تنها جداکشتهای ساقه کالوس‌زایی بالایی (بالاتر از ۹۰ درصد) داشتند اما در سایر جداکشتهای ۴ روزه درصد تولید کالوس بسیار پایین بود اگر چه در جداکشتهای رویشی برگ و دمبرگ هم تا حدودی کالوس‌زایی دیده شد (شکلهای ۱ و ۲). ۸ روز پس از کشت، همه جداکشتها، تولید کالوس بالاتر از ۹۰ درصد را داشتند به جز بساکها که در آنها میزان تولید کالوس مقداری کمتر و حدود ۸۵-۸۰ درصد دیده شد (شکلهای ۳ و ۴). جالب توجه اینکه بررسی اثر تیمارهای تاریکی و روشنایی در کالوس‌زایی ریزنمونه‌های مختلف تفاوت آشکاری را بین جداکشتهای مختلف نشان نداد اما مقایسه آماری نمونه‌ها نشان می‌دهد که در جداکشتهای رویشی شامل برگ ، ساقه و دمبرگ و نیز بساک از جداکشتهای زایشی، نور ۲۰۰۰ لوکس تا حدودی بازدارنده است (شکلهای ۲ و ۴).

نتایج حاصل از بررسی غلظتهای مختلف تنظیم‌کننده‌های رشد نشان داد که 2, 4-D و BAP در تولید کالوس موثر بودند و GA_3 سبب کاهش کالوس‌زایی می‌شود (شکل ۵). به علاوه، کالوس‌زایی جداکشتهای مختلف به غلظت و نیز نسبت 2, 4-D و BAP، بستگی داشت (شکل ۵). بهترین غلظت تنظیم کننده‌های رشد برای کالوس زایی جداکشتهای رویشی و گلبرگ، ۲ میلی‌گرم در لیتر 2, 4-D و ۱ میلی‌گرم در لیتر BAP بود. اگر چه در مادگی و نیز بساک تفاوت آشکار ظاهری بین غلظت ۲ و ۳ میلی‌گرم در لیتر 2, 4-D همراه با غلظت ۱ میلی‌گرم در لیتر BAP دیده نمی‌شود، اما این تفاوت در سطح ۰/۰۵ معنی‌دار می‌باشد و به ویژه برای مادگی غلظت ۳ میلی‌گرم در لیتر اثر تحریکی دارد (شکل ۵).

مطالعه تولید آنتوسیانین در جداکشتها نشان داد با افزایش سن کالوس از ۱۵ به ۶۰ روز، میزان این رنگیزه در کالوس‌حاصل از جداکشتهای مختلف افزایش معنی‌داری نشان می‌دهد به طوری‌که بیشترین میزان آنتوسیانین در کالوسهای ۶۰ روزه دیده شد (شکل ۶). تیمار تاریکی سبب ایجاد کالوسهای سفید تا کرم رنگ شد که میزان آنتوسیانین در این کالوسها کم بود (شکلهای ۶ و ۷) در صورتی‌که نور به ویژه شدت ۲۰۰۰ لوکس آن سبب ایجاد رنگ قرمز در کالوسها و افزایش معنی‌دار آنتوسیانین در آنها شد (شکلهای ۶ و ۷). مقایسه میزان آنتوسیانین جداکشتهای مختلف درکالوسهای ۱۵، ۳۰، ۴۵ و ۶۰ روزه در شدت نوری ۲۰۰۰ لوکس (به دلیل میزان بالای رنگیزه در شدت نوری ۲۰۰۰ لوکس (مطابق شکل ۶)، مقایسه جداکشتهای مختلف، در این شدت نوری انجام شد) نشان داد که بیشترین میزان آنتوسیانین در کالوس القاء شده از برگ به دست آمد اما به ترتیب در جداکشتهای ساقه، دمبرگ، گلبرگ، بساک و مادگی کاهش نشان داد (شکلهای ۷ و ۸).

Archive of SID
www.SID.ir

بحث

کالوس‌زایی در جداکشتهای مختلف .*Rosa gallica* L بسیار زود شروع شد به طوری که ۸ روز پس از کشت، همه‌ی جداکشتها به جز بساک با اندکی اختلاف، تولید کالوس بسیار بالایی نشان دادند. در جداکشتهای گلی ۴ روزه، فراوانی کالوس‌زایی بسیار پایین و کمتر از ۱۰ درصد بود، اما میزان آن در جداکشتهای رویشی به ویژه ساقه افزایش یافت به طوری که جداکشتهای ساقه‌ای ۴ روزه درصد کالوس‌زایی بالایی مشابه نمونه‌های ۸ روزه داشتند. تولید زود هنگام کالوس در این گیاه جالب توجه می‌باشد به طوری که می‌توان در دوره زمانی کوتاهی تولید انبوه کالوس داشت و از آنها در تولید فراورده‌های ثانویه یا اهداف دیگر کشت بافت استفاده نمود. بررسی اثر تیمارهای تاریکی و روشنایی در کالوس‌زایی جداکشتهای مختلف تفاوت آشکاری را بین آنها نشان نداد.

گزارشهای متعددی در مورد کالوس زایی جداکشتهای رویشی در گل سرخ وجود دارد (۷، ۱۵، ۱۶، ۱۹، ۲۱، ۲۷) که در اغلب آنها با استفاده از دست‌کاری محیط، این جداکشتها قادر به تولید کالوس و نیز باززایی شده‌اند اما مطالعات مروری این تحقیق نشان داد که در این گیاه از جداکشتهای گلی (زایشی) برای تولید کالوس به میزان کم استفاده شده است به جز مطالعات طبائی‌زاده و خوش‌خویی که این محققین تنها از جداکشتهای بساک برای تولید کالوس استفاده نموده‌اند (۳۰). به هر حال نتایج این پژوهش نشان داد که همه جداکشتهای گلی قادر به تولید کالوس هستند و حتی کالوس‌زایی گلبرگ و مادگی مشابه جداکشتهای رویشی بود (در بساک میزان کالوس‌زایی مقداری کمتر بود). استفاده از کالوسهای گلی به ویژه پرچم و مادگی در تولید کالوس و سپس باززایی گیاهان هاپلوئید ارزشمند می‌باشد، به علاوه در برخی گیاهان به تبعیت از گیاه مادر، کالوسهای گلی قابلیت تولید آنتوسیانین بیشتر دارند (۳، ۵) که البته نتایج تحقیق حاضر این ویژگی را نشان نداد.

در بسیاری از مطالعات اثر القایی تاریکی بر تولید کالوس گزارش شده است (۴، ۲۰، ۲۴) اما در این مطالعه کالوس‌زایی اختلاف چشمگیری را در نور و تاریکی نشان نداد. نوع، غلظت و نسبت تنظیم‌کننده‌های رشد در تولید کالوس مؤثر بودند، به طوری که نسبت ۳-۲ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D به غلظت ۱ میلی‌گرم در لیتر BAP، برای تحریک کالوس‌زایی جداکشتهای مختلف مؤثر بودند. GA_3 نیز سبب کاهش معنی‌داری در تولید کالوس شد.

مطالعات متعدد نشان می‌دهد که اکسینها و سیتوکینینها به عنوان مهم‌ترین هورمونها مطرح هستند که نوع و غلظت مؤثر آنها در جداکشتها و نیز در جنسها، گونه‌ها و رقمهای مختلف متفاوت است (۱، ۱۲،۱۳، ۲۱، ۲۸، ۲۹). اغلب مطالعات نشان می‌دهد که هورمونهای گروه اکسین به ویژه 2, 4-D در تمایززدایی و تولید کالوس نقش مهمی دارند، همچنین این هورمونها همراه با سیتوکینین‌هایی از جمله BAP در تولید و رشد کالوس مؤثرند (۸). افزایش سن کالوس باعث افزایش معنی‌دار میزان تولید رنگیزه آنتوسیانین در جداکشتهای مختلف شد به طوری‌که بیشترین میزان آنتوسیانین در کالوسهای ۶۰ روزه در مقایسه با کالوسهای ۱۵، ۳۰ و ۴۵ روزه دیده شد. مطابق نتایج این مطالعه، تحقیقات Blando و همکارانش در سال ۲۰۰۵ نشان دادند که در *Prunus cerasus* این رنگیزه در روزهای اول تولید کالوس ایجاد نمی‌شود اما پس از آن توسط محرکهایی مانند نور و عوامل تغذیه‌ای و زمان، در کالوسهای ۲۰-۱۵ روزه به حداکثر میزان خود می‌رسد در صورتی که مقدار این رنگیزه در کالوسهای در معرض تاریکی بسیار پایین‌تر و در حدود ۱/۴۰ کالوسهای در معرض نور بود (۶). کالوسهای تحت تیمار تاریکی دارای طیف رنگی سفید تا کرم رنگ بودند که میزان آنتوسیانین در این کالوسها بسیار کم بود اما قرارگیری در معرض نور

Archive of SID

www.SID.ir

به ویژه شدت ۲۰۰۰ لوکس سبب ایجاد رنگ قرمز در کالوسها و افزایش معنی‌دار آنتوسیانین آنها شد. مطالعات Mori و همکاران در ۱۹۹۳ نشان داد که در سلولهای سوسپانسیون بخشهای مختلف گیاه توت فرنگی هیچ آنتوسیانینی در تاریکی مشاهده نشد درحالی‌که تابش نور ۵۰۰۰ لوکس تولید آنتوسیانین را تحریک کرد (۲۲). اغلب این مطالعات نشان می‌دهد که بیوسنتز آنتوسیانین در بافتهای گیاهی یا به نور نیاز دارد یا توسط نور تحریک می‌شود (۳۲). Hennayake و همکاران (۲۰۰۶) در مطالعه‌ای که روی تولید آنتوسیانین در سوسپانسیون سلولی حاصل از کالوس برگ *Rosa hybrida* داشتند اظهار کردند که تجمع آنتوسیانین وابسته به نور است و میزان بالای آنتوسیانین تحت نور سفید تشکیل می‌شود در حالی‌که در تاریکی آنتوسیانین یا تشکیل نمی‌شود و یا به میزان کمی تولید می‌شود (۱۱). آنها بیان نمودند که این یافته می تواند نشان دهنده این موضوع باشد که بیان و یا فعالیت آنزیمهای بیوسنتزی آنتوسیانین به ویژهPAL و CHS در مراحل نهایی توسط نور تحریک می شود. به‌علاوه یافته‌های مشابهی در مورد عدم تشکیل یا میزان بسیار کم آنتوسیانین در تاریکی وجود دارد که همه آنها نشان دهنده ضرورت نور برای پیگمان سازی در تحقیقات کشت درون شیشه روی گونه‌های متفاوت است (۱۴، ۲۶، ۳۵، ۳۶). با توجه به اینکه می‌دانیم توانایی اندامهای مختلف گیاه (رویشی و گلی) در تولید متابولیتهای ثانویه از جمله آنتوسیانین متفاوت است، از طرفی تحقیق شده است که هنگام تشکیل کالوس، آنزیمها و فاکتورهای سلولی از هر اندام وارد پینه‌های حاصل از آن می‌شوند. بنابراین توانایی پینه‌های حاصل از هر بافت یا اندام در فرآیندهای مختلف مانند تولید رنگدانه متفاوت هستند. مقایسه میزان آنتوسیانین کالوس جداکشتهای مختلف نشان داد که بیشترین میزان این رنگیزه در کالوس القا شده از برگ بود اما به ترتیب در جداکشتهای ساقه، دمبرگ، گلبرگ، بساک و مادگی کاهش نشان داد، به عبارتی تولید آنتوسیانین در جداکشتهای رویشی بیش از انواع گلی بود. مطالعات زیادی روی مقایسه‌ی میزان آنتوسیانین جداکشتهای مختلف در شرایط در شیشه انجام نشده است. Asano و همکارن (۲۰۰۱) با استفاده از محیط کشت‌های MS و گمبورگ از قطعات برگی توت فرنگی کالوس قرمزرنگ ایجاد کرده و گزارش کردند که میزان آنتوسیانین در سوسپانسیون سلولی حاصل از آنها ۴ برابر میوه می‌باشد (۴). نتایج Ball و همکاران (۱۹۷۲) در جداکشتهای مختلف *Dimorphotheca sinuate* بر عکس نتایج این تحقیق می‌باشد (۵). آنها گزارش نمودند که میزان آنتوسیانین حاصل از کالوس با آنتوسیانین موجود در گیاه کامل یکسان است که نشان دهنده یکسانی سنتز آن در شرایط در شیشه و در زیوه (شرایط طبیعی) است. مطابق گزارش آنها، اندامهای گلی به ویژه گلبرگها و بساک که در شرایط طبیعی رنگی و محتوی میزان بیشتری رنگیزه از جمله آنتوسیانین هستند، پس از تولید کالوس نیز این توانایی را دارند. همچنین Alemanno و همکاران (۲۰۰۳) گزارش نمودند همه بخشهای گل محتوی ترکیبات پلی‌فنلی می‌باشند و این ترکیبات پس از قرار دادن جداکشتهای گلی در شرایط در شیشه، به میزان زیادی در کالوسها باقی می‌مانند اگر چه ممکن است مقداری نیز تغییر کنند (۳). به هر حال، احتمال می‌رود شاید به دلیل اینکه در این گونه، اندامهای رویشی نیز دارای رنگیزه و به رنگ قرمز می‌باشند، این پتانسیل در کالوسهای حاصل از کشت آنها نیز حفظ شده است و در نتیجه سبب ایجاد آنتوسیانین بیشتر در آنها شده است که در مطالعات بعدی لازم است مقایسه میزان آنتوسیانین در اندامهای گیاه کامل و کالوسهای حاصل از آنها انجام گیرد.

منابع

Archive of SID
www.SID.ir

۱. موافقی، ع.، حبیبی ق.، علی‌اصغرپور م. ۱۳۸۷. باززایی گیاه دارویی کور (Capparis spinosa L.) با استفاده از کشت قطعات هیپوکوتیل. مجله زیست‌شناسی ایران، ۲۱ (۲): ۲۹۷-۲۸۹.

۲. شرفی ع.، هاشمی سهی ه.، جورابچی ع. ۱۳۸۷. بهینه‌سازی شرایط باززایی گیاه دارویی Artemisia annua. مجله زیست‌شناسی ایران، ۲۱ (۴): ۵۷۳-۵۶۵.

3. Alemanno, L., Ramos, T., Gargadenec, A., Andary, C., Ferriere, C., 2003, Localization and identification of phenolic compounds in *Theobroma cacao* L. somatic embryogenesis. *Annals of Botany* 92: 613-623.

4. Asano, S., Ohtsubo, S., Nakajima, M., Kusunoki, M., Kaneko, K., Katayama, H., Nawa, Y., 2001, Production of anthocyanins by habituated cultured cells of nyoho strawberry (*Fragaria ananassa Duch*.). *Food Sci. Technol. Res*. 8 (1): 64–69.

5. Ball, E.A., Harborne, J.B., Arditti, J., 1972, Anthocyanins of *dimorphotheca* (Compositae). I. Identity of pigments in flowers, stems and callus cultures. *American Journal of Botany* 59(9): 924-930.

6. Blando, F., Scardino, A.P., Bellis, L.De., Nicoletti, I., Giovinazzo, G., 2005, Characterization of *in vitro* anthocyanin producing sour cherry (*Prunus cerasus* L.) callus cultures. *Food Research Int.* 38: 937-942.

7. Burger, D.W., Liu, L., Zary, K.W., Lee, K.W., Lee, C.I., 1990, Organogenesis and plant regeneration from immature embryos of *Rosa hybrida* L. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 21: 147-152.

8. Dixon, R.A., Gonzales, R.A., 1996, A practical approach. *Plant Cell Culture*. 2nd Ed. IRL Press, 230 p. ISBN 0-19-963402-5.

9. Felter, H.W., Lloyd J.U., 1898, King's American Dispensatory, 18th ed., reprinted by Eclectic Medical Publications, Portland, OR.

10. Gasper, T., Penel, C., Castillo, F.J., Greppin, H., 1985, A two step control of basic and acidic peroxidases and its significance for growth and development. *Physiol. Plant*. 64: 418-423.

11. Hennayake, C.K., Kanechi, M., Yasuda, N., Uno, Y., Inagaki, N., 2006, Irradiation of UV-B induces biosynthesis of anthocyanins in flower petals of rose, *Rosa hybrida*.cv. 'Charleston' and 'Ehigasa'. *Environmetn Control in Biology*. 44: 103-110.

12. Hill, G., 1967, Morphogenesis of shoot primordia in cultured stem tissue of a garden rose. *Nature* 216: 596-597.

13. Hsia, C., Korban, S.S., 1996, Organogenesis and somatic embryogenesis in callus cultures of *Rosa hybrida* and *Rosa chinensis minima*. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 44: 1-6.

14. Irani, N.G., Grotewold, E., 2005, Light induced morphological alteration in anthocyanin accumulating vacuoles of maize cells. *BMC Plant Biol*. 20(5): 7-22.

15. Ishioka, N., Tanimoto, S.H., 1990, Plant regeneration from Bulgarian rose callus. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 22: 197-199.

16. Jacob, G., Allan, P., Bornman, C.N., 1969, Tissue culture studies on rose: use of shoot tip explants: I Auxin: cytokinin effects. *Agroplantae* 1:179-88.

17. Koide, T., Hashimoto, Y., Kamei, H., Kojima, T., Hasegawa, M., Terabe, K., 1996, Antitumor effect of anthocyanin fractions extracted from grape rinds and red rice. *Cancer Biother. Radiopharm*. 11: 273–277.

18. Koide, T., Hashimoto, Y., Kamei, H., Kojima, T., Hasegawa, M., Terabe, K., 1997, Antitumor effect of anthocyanin fractions extracted from red soybean and red beans *in vitro* and *in vivo*. *Cancer Biother. Radiopharm.* 12: 277–280.

19. Kumar Pati, P., Prasad Rath, S., Sharma, M., Sood, A., Singh Ahuja, P., 2005, *In vitro* propagation of rose-a review. Biotech Adv. 24 (1): 94-114.

20. Li, X., Krasnyanski, S., Korban, S.S., 2002, Somatic embryogenesis, secondary somatic embryogenesis and shoot organogenesis in Rosa. *J. Plant Physiol*. 159: 313-319.

21. Lloyd, D., Roberts, A.V., Short, K.C., 1988, The induction *in vitro* of adventitious shoots in *Rosa*. *Euphytica* 37: 31-36.

22. Mori, T., Sakurai, M., Shigeta, J., Yoshida, K., Kondo, T., 1993, Formation of anthocyanins from cells cultured from different parts of strawberry plants. *J. Food Sci*. 58: 788-792.

23. Murashige, T., Skoog, F., 1962, A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant.* 15: 473-497.

24. Nakamura, M., Takeuchi, Y., Miyanaga, K., Seki, M., Furusaki, Sh., 1999, High anthocyanin accumulation in the dark by strawberry (*Fragaria ananassa*) callus. *Biotech Letters* 21: 695-699.

25. Noda, Y., Kaneyuki, T., Igarashi, K., Mori, A., and Packer, L., 1998, Antioxidant activity of

Archive of SID

www.SID.ir

nasunin, an anthocyanin in eggplant. Res. Com. Mol. Pathol. Pharmacol. 102: 175–187.

26. Ramachandra, S.R., Ravishankar, G.A., 2002, Plant cell cultures: chemical factories of secondary metabolites. *Biotechnol. Adv*. 20: 101–153.

27. Rosu, A., Skirvin, R.M., Bein, A., Norton, N.A., Kushad, M., Otterbacher, A.G., 1995, The development of potative adventitious shoots from a chemical thornless rose *in vitro*. *J. Hortic. Sci*. 70: 901-907.

28. Rout, G.R., Debata, B.K., Das, P., 1992, *In vitro* regeneration of shoots from callus cultures of *Rosa hybrida* L. cv. Landora Indian. *J. Exp. Biol*. 30: 15-18.

29. Salehi, H., Khosh-Khui, M., 1996, Micropropagation of miniature rose cultivars. Iran *Agric. Res.* 15: 51-67.

30. Tabaeezadeh, Z., Khosh-Khui, M., 1981, Anther culture of *Rosa*. *Sci. Hortic.* 15: 61-66.

31. Tsuda, T., Horio, F., Osawa, T., 1998, Dietary cyanidin 3-*O*-Diglucoside increases *ex vivo* oxidation resistance of serum in rats. *Lipid* 33: 583–588.

32. Vinterhalter, B Ninkovic, S., Kozomara, B., Vinterhalter, D., 2007, Carbohydrate nutrition and anthocyanin accumulation in light grown and etiolated shoot cultures of carob (*ceratonla siliqual*) *Arch. Biol. Sci.* 59(1): 51-56.

33. Wanger, G.J., 1979, Content and vacuole/extra vacuole distribution of neutral sugars, free amino acids, and anthocyanins in protoplasts. *Plant Physiol*. 64: 88-93.

34. Yoshimoto, M., Okuno, S., Yoshinaga, M., Yamakawa, O., Yamaguchi, M., Yamada, J., 1999, Antimutagenicity of sweet potato (*Ipomoea batatas*) roots. *Biosci. Biotechnol. Biochem***.** 63: 537–541.

35. Zhang, W., Curtin, C., Kikuchi, M., Franco, C., 2002, Integration of jasmonic acid and light irradiation for enhancement of anthocyanin biosynthesis in *Vitis vinifera* suspension cultures. *Plant sci*. 162: 459-468.

36. Zhong, J.J., Yoshida, T., 1995, High-density cultivation of *Perilla frutescens* cell suspensions for anthocyanin production: effects of sucrose concentration and inoculum size. *Enzyme Microbial Technol*. 17: 1079–1087.

37. Zuker, A., Tzfira, T., Ben-Meir, H., Ovadis, M., Shklarman, E., Itzhaki, H., Forkmann, G., Martens, S., Neta-Sharir, I., Weiss, D., Vanstein, A., 2002, Modification of flower colour and fragrance by antisense suppression of the flavanone 3-hydroxylase gene. *Molecular Breeding* 9: 33-41.

Archive of SID

www.SID.ir

The effect of light and plant growth regulators on callogenesis and anthocyanin accumulation in calli of different explants in *Rosa gallica*

Rezanejad F. and Tarrahi R.

[1] BiologyDept., Cell Research Center, Facculty of Science, Shahid Bahounar University, Kerman, I.R. of IRAN

Abstract

Callogenesis and anthocyanin content of vegetative explants such as leaf, stem, petiole and floral ones (petal, pistil, anther) from *Rosa gallica* were investigated under physical (light and dark) and chemical (different combinations of 2, 4-D, BAP and GA_3) factors at different periods. The explants were cultured on the modified MS medium supplemented with vitamins and growth regulators. Cultures were exposed to dark and a 16/8 h (light dark) photoperiod at 1000 and 2000 lux light intensities. The calli (with the original explant) were then routinely subcultured onto fresh medium of the same composition at two weeks intervals. Combinations of 1mg l^{-1} BAP and 2- 3 mg l^{-1} 2, 4-D were the most suitable treatment for callus induction in various explants. GA_3 was resulted in callogenesis reduction. Callogenesis was started after 4 days in stem explants and after 8 days in the other explants. Calli grew and became massive and enlarged in the next weeks. Dark and 1000 and 2000 lux light intensities showed no significant different on callus induction although 2000 lux light intensity somewhat reduced callogenesis in anther and vegetative explants. Calli produced in light were red like and accumulated anthocynin. Anthocynin content was the higher in calli obtained from explants exposed to 2000 lux light intensity. Calli grown in dark were white to cremish, soft, fraible and contained a bit of anthocyanin.

Keywords: Anthocyanin, Calli, Floral explants, Light, Rose

Archive of SID

www.SID.ir