بررسی پتانسیل باز زایی استبرق *Calotropis procera* در شرایط کشت درون شیشه‌ای

حجت اله عباسی[۱*]، سارا تساعدی[۲]، محمدعطا میرسلیمانی[۲] و منا مسعودی[۲]

[۱] کرج، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد کرج، باشگاه پژوهشگران و نخبگان

[۲] شیراز، مرکز رشد شیراز

تاریخ دریافت: ۹۳/۷/۲۷ تاریخ پذیرش: ۹۴/۱۱/۱۲

چکیده

استبرق از گیاهان دارویی باارزش است که در بعضی از مناطق کشور ایران می‌روید. خواص دارویی این گیاه و همچنین داشتن مزایایی از جمله مقاومت به دمای بالا،شوری و خشکی بر اهمیت آن افزوده و علاقه به کشت و کار تجاری استبرق را افزایش داده است. از مشکلات گسترش و بهره‌برداری این گیاه نبود یک شیوه تولید انبوه است. برای بررسی پتانسیل باززایی استبرق آزمایش حاضر انجام شد. نخست تاثیر مقادیر مختلف (۰/۱، ۰/۵، ۲،۱ و ۳ میلی‌گرم در لیتر) 2,4-D بر انگیزش کالوس زایی وسپس اثر بنزیل آدنین و نفتالین استیک اسید در پنج سطح (۰/۱، ۰/۵، ۲،۱ و ۳ میلی‌گرم در لیتر) نیز در پرآوری کالوس های تولیدی مورد بررسی قرار گرفت. از محیط MS با تغییرات زیر استفاده شد: نیترات‌آمونیوم، نیترات‌پتاسیم، کلریدکلسیم، تیامین و میواینوزیتول به ترتیب به مقدار ۲۰۰۰، ۲۴۰۰ و ۶۰۰، ۴، ۳۰۰ میلی‌گرم در لیتر و ۳۰ گرم ساکارز و ۳٪ زغال فعال. از جنین‌های بالغ به عنوان ریزنمونه استفاده شده و صفاتی مانند افزایش اندازه جنین‌ها، اندازه کالوس‌های تولید شده، تعداد و اندازه شاخساره و ریشه‌های تولیدی ثبت شد. اثر 2,4-D بر افزایش حجم و واتمایزیابی جنین‌های کشت شده در سطح ۵٪ معنی‌دار شد. بیشترین میزان افزایش حجم جنین‌ها در تیمار ۳ میلی‌گرم در لیتر2,4-D مشاهده شد. بیشترین کالوس تولیدشده در تیمار ۱ میلی‌گرم در لیتر NAA به ثبت رسید. تأثیر مقادیر متفاوت BA و NAA برشاخه زایی معنی‌دار شد و بالاترین میزان این شاخص در تیمار ۱ میلی‌گرم در لیترBA و ۲ میلی‌گرم در لیتر NAA مشاهده شد. بیشترین مقدار و اندازه ریشه تولیدشده در محیط کشت حاوی ۱ میلی‌گرم در لیتر NAA به دست آمد.

واژه های کلیدی: استبرق، بنزیل آدنین، نفتالین استیک اسید، کالوس زایی و ریشه زایی

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۸۳۴۲۲۶۲۲۶۲ ، پست الکترونیکی: hojatabasi@ut.ac.ir

مقدمه

استبرق با نام علمی [*Calotropis procera* (Aiton)] گیاهی از خانواده *Apocynaceae* است. این گیاه بومی کشورهای جنوب شرقی آسیا (هند، پاکستان، افغانستان، اردن و ایران) و آفریقا (سومالی، مصر، لیبی، جنوب الجزایر، موروکو، موریتانی و سنگال) بوده، همچنین در جزایر کارائیب، آمریکای مرکزی و جنوبی و آفریقای جنوبی نیز یافت می‌شود. این گیاه در مناطق وسیعی از ایران شامل جنوب خراسان، سیستان و بلوچستان (ایرانشهر، سرباز، چابهار، وایرندگان)، جنوب کرمان، هرمزگان، بوشهر و خوزستان بصورت خودرو می‌روید که در مناطق مختلف آن را با نام‌های متفاوتی از جمله کرک، استبرق، سیب تلخ و... می‌شناسند. استبرق مقاومت بالایی به شرایط شوری خاک داشته و قادر است در خاک‌هایی که از سنگ‌های مادری اشباع از سدیم تشکیل‌شده‌اند نیز به زندگی خود ادامه دهد (۱۴). این گیاه از گیاهان دارویی باارزش است که در درمان بسیاری از بیماری‌ها مورداستفاده قرار می‌گیرد. در موارد زیادی عصاره این گیاه خواص ضد باکتریایی (۱۹)، ضد کرم آسکاریس و حشره

Archive of SID
www.SID.ir

کشی داشته همچنین به‌عنوان بادشکن و درمان سوءهاضمه (۱۰)، ضد سرطان (۹)، ضد تشنج (۱۶؛ ۶) کاربرد دارد. به همین دلیل میزان تقاضا برای استفاده از آن در بین دانشمندان و داروسازان افزایش‌یافته و در حال حاضر دانشمندان بر این باور هستند که *Calotropis procera* یکی از منابع امیدبخش از داروهای مسکن (۱۶) درمان‌کننده زخم (۵،۷) ضد اسهال و لارو کش بوده و در مواردی نیز اثر ضد آلزایمر داشته و به بیماران آلزایمری کمک شایانی نموده است. مواد مختلفی ازجمله گلیکوزیدهای قلبی مانند فروگوسید (Frugoside)، پروسراسید A (Proceraside A) و کالوتروپین (Calotropin)(۱۰)، استرهای نوردی‌ترپن، آلکالوئیدها، فلاونوییدها، استرول‌ها و انواع زیادی از کاردیونولین‌ها (۱۱) در این گیاه وجود دارد که ساختار و اثرات زیستی هرکدام مورد بررسی و تأیید قرارگرفته است. علاوه بر این، کرک‌های آن در صنعت نساجی کاربرد دارد و روزبه‌روز بر موارد استفاده از آن افزوده می‌شود. بر طبق تحقیقات کاروترز و همکاران این گیاه منبع مناسبی از هیدروکربن‌ها بوده و به این دلیل در تولید سوخت‌های زیستی گزینه مناسبی است. این گیاه به شرایط نامساعد محیطی مانند خشکی و شوری مقاومت داشته و علاوه بر آن به گرما نیز مقاومت خوبی نشان می‌دهد (۱۵). از جمله مشکلات پیش روی گسترش و بهره‌برداری از این گیاه نبود یک شیوه کارای تکثیر و تولید انبوه است زیرا تکثیر استبرق از دو روش زایشی و رویشی صورت می‌گیرد که در روش رویشی به دلیل استفاده از قلمه ریشه و یا قلمه ساقه‌ای امکان انتقال بیماری‌های ویروسی افزایش یافته و این امر باعث کاهش عملکرد گیاه خواهد شد. از طرف دیگر تکثیر زایشی مشکل انتقال ویروس‌های گیاهی را نداشته اما به دلیل عدم تولید گیاهان شبیه به والد استفاده از این روش نیز توصیه نمی‌شود. جهت برطرف کردن این مشکلات استفاده از روش کشت درون شیشه‌ای گیاهان توسعه پیدا کرده است. از زمان کشف این موضوع که گیاهان را می‌توان از طریق روش‌های کشت درون شیشه‌ای بسیار سریع‌تر از روش‌های سنتی تکثیر نمود، تکثیر رویشی درون شیشه‌ای توسعه یافته که این موضوع در گیاهان مناطق معتدل، نیمه گرمسیری و نیز گرمسیری صادق است (۲). از مشکلات کشت درون شیشه‌ای گیاهانی مانند استبرق که در بافت‌های خود لاتکس تولید می‌کنند، ترشح مواد فنولی در محیط کشت است که این مواد در اکثر موارد باعث از بین رفتن ریز نمونه‌ها می‌شوند. از نمونه‌های مورد استفاده در کشت بافت گیاهانی مانند استبرق، رویان‌های نابالغ است که در این روش به دلیل اینکه از نمونه‌هایی استفاده می‌شود که در مراحل اولیه رشد قرار دارند مشکل تولید و ترشح مواد فنولی را نخواهند داشت. استفاده از این نمونه‌ها در موارد زیادی نتایج امیدوارکننده‌ای را به نمایش گذاشته که در این زمینه گیاهانی مانند Euphorbia (۱۳)، Araujia(۱۹)، Asclepias (۱۳)، Tilophora(۱۴) و Hevea (۲۲) را می‌توان نام برد. وانگ و همکاران تأثیر2,4-D و BAP (بنزیل آمینو پورین) بر کالوس زایی گیاه دارویی آلاماندا را مورد مطالعه قرار دادند در این آزمایش مشخص شد که از بین غلظت‌های مختلف (۰/۵، ۱ و ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D (۰/۵، ۱ و ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر) BAP بهترین کالوس زایی در غلظت‌های ۱ میلی‌گرم در لیتر-2,4 D و ۱ میلی‌گرم در لیترBAP مشاهده شد (۲۸). همچنین در تحقیقی که بر روی ریز ازدیادی آنتوریوم صورت گرفت، بهترین محیط کشت برای انگیزش کالوس محیط کشت تغییریافته با غلظت ۱ و ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر BA به همراه ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D گزارش شد(۳). در تحقیقی که بر روی بنت القنسول انجام شد جنین‌های کشت‌شده در محیط کشت حاوی ۱ میلی‌گرم در لیتر NAA و ۲ میلی‌گرم در لیتر BA بیشترین مقدار باززایی را نشان دادند (۸). دیپش و آشیس (۱۹۹۰) برای تکثیر *Calotropis gigantea*از جنین‌های نارس بر روی محیط کشت MS تغییریافته استفاده کردند. در این آزمایش از جنین‌های نابالغ که مدت ۳۰ تا ۳۵ روز از گرده‌افشانی

www.SID.ir

آن‌ها گذشته بود استفاده شد و نشان داده شد که استفاده از فیتوهورمون‌ها برای کالوس‌زایی لازم بوده و بدون استفاده از این مواد کالوس‌زایی انجام نخواهد شد. در این آزمایش استفاده از زآتین، کایتین و بنزیل آمینو پورین به‌صورت منفرد باعث عدم کالوس زایی شد و کالوس فقط هنگامی تولید شد که مقادیر مشخصی از هر دو هورمون سایتوکینین و اکسین به محیط کشت اضافه شد. بیشترین باز زایی کالوس در محیط کشت حاوی یک میلی‌گرم در لیتر 2,4-D انجام شد اما در این محیط در مرحله ریشه دهی ریشه‌ای تولید نشد. بیش‌ترین شاخه دهی و رشد شاخه ها در محیط حاوی ۱/میلی‌گرم در لیتر NAA و دو میلی‌گرم در لیتر BA انجام شد و بهترین ریشه‌زایی نیز هنگامی انجام شد که بیش‌ترین غلظت اکسین اعمال‌شده و یا هنگامی‌که نمونه‌ها به محیط MS ۱\۲ انتقال داده شدند. پژوهش حاضر اولین تحقیق انجام‌گرفته درزمینه کشت بافت گیاه استبرق از جنین های بالغ در دنیا بوده و با هدف بررسی توانایی باز زایی استبرق در محیط کشت درون شیشه‌ای و به دست آوردن شرایط بهینه محیط کشت این گیاه انجام گرفت.

مواد و روشها

بذرهای گیاه استبرق بعد از بلوغ از محل‌های رشد طبیعی آن برداشت شده و نگهداری شدند. این بذرها با آب مقطر شسته شده و با محلول هیپوکلرید سدیم ۵٪ به مدت ۱۵ دقیقه و سپس با اتانول ۷۰٪ به مدت ۲ دقیقه تیمار شدند و درنهایت پنج بار توسط آب مقطر شستشو شدند. بعد از شکافتن پوسته بذر جنین‌ها بیرون آورده شده و به‌عنوان ریز نمونه مورداستفاده قرار گرفتند. محیط کشت مورد استفاده در این آزمایش محیط کشت MS(موراشیگ و اسکوک) تغییر داده‌شده با تغییرات زیر بود: نیترات‌آمونیوم، نیترات‌پتاسیم، کلریدکلسیم، تیامین و میواینوزیتول به ترتیب به مقدار ۲۰۰۰، ۲۴۰۰ و ۶۰۰، ۴، ۳۰۰ میلی‌گرم در لیتر و ۳۰ گرم ساکارز و ۳٪ زغال فعال (جهت خنثی نمودن مواد فنولی). از هورمون‌های گیاهی NAA، BA و 2,4-D (از دو شرکت سیگما و مرک) به‌صورت جداگانه و یا ترکیب باهم در این محیط کشت استفاده شد. قبل از اضافه کردن آگار PH محیط کشت توسط KOH و HCl، در محدوده ۵/۷ تنظیم شده و جهت جامد کردن محیط کشت ۸ گرم آگار به آن اضافه شد. محیط کشت تهیه شده در پتری دیش‌های پیرکس توزیع‌شده و در هر پتری ۲۵ میلی‌لیتر محیط کشت ریخته شده و جهت استریل کردن به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد و فشار یک اتمسفر اتوکلاو شدند. پس از کاهش دمای محیط کشت و رسیدن آن به ۴۰ درجه سانتی‌گراد هورمون‌های NAA و BA در مقادیر موردنظر اضافه شد. در هر پتری ۵ عدد جنین کاشته و برای هر تیمار سه تکرار در نظر گرفته شد. برای انگیزش کالوس و واتمایزیابی سلول‌ها، جنین‌های در محیط حاوی 2,4-D کشت شد و در دمای ۲± ۲۷ درجه سانتی‌گراد، رطوبت نسبی ۶۰٪ و تحت شرایط تاریکی مطلق به مدت ۸ روز قرار گرفتند. پس از روز هشتم این جنین‌ها به محیط کشت حاوی NAA منتقل شد و تمام پتری‌ها به شرایط نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی انتقال یافتند. پس از ۵ هفته، جهت باززایی کالوس‌ها از آن‌ها نمونه‌هایی به وزن تقریبی ۲۰۰ میلی‌گرم انتخاب شده و به محیط کشت حاوی مقادیر متفاوت BA و NAA انتقال داده شدند. بعد از گذشت شش هفته مشخصات مورفولوژیکی ریز نمونه‌ها مانند طول ریشه، تعداد ریشه و شاخه تولید شده از هر نمونه و اندازه ساقه‌چه‌های تولیدی ثبت شد. در انتهای آزمایش گیاهچه‌های به‌دست‌آمده جهت ریشه‌زایی در محیط حاوی مقادیر متفاوت NAA کشت شدند و در این محیط ریشه‌دار شدند. گیاهان ریشه‌دار شده از محیط کشت درون شیشه‌ای خارج و ریشه‌ها با آب مقطر شسته شد و جهت سازگاری به محیط گلخانه انتقال یافتند.

آزمایش حاضر به صورت فاکتوریل در قالب طرح کامل تصادفی با سه تکرار انجام شد. برای اعمال تیمار های مورد بررسی ابتدا اثر مقادیر مختلف (۰/۱، ۰/۵، ۱، ۲ و ۳

www.SID.ir

Archive of SID

میلی‌گرم در لیتر) 2,4-D بر انگیزش کالوس و سپس تاثیر متقابل غلظت هورمون اکسین (NAA) و بنزیل آدنین (BA) هر کدام در پنج سطح (۰/۱، ۰/۵، ۱، ۲ و ۳ میلی‌گرم در لیتر) بر پرآوری و باززایی ریزنمونه ها مورد بررسی قرار گرفت. در نهایت جهت به دست آوردن غلظت هورمون اکسین مورد نیاز در فرایند تولید ریشه تاثیر مقادیر متفاوت NAA بر ریشه زایی گیاهچه ها مورد ارزیابی قرار گرفت. آزمون مقایسه میانگین ها بر مبنای آزمون چند دامنه ای دانکن و توسط نرم‌افزار آماری SPSS در سطح ۰/۰۵ مورد تجزیه‌وتحلیل قرار گرفتند و نمودارها با نرم‌افزار excel 2013 رسم شدند.

نتایج

تأثیر مقادیر متفاوت 2,4-D برافزایش اندازه جنین: نتایج تجزیه آماری نشان داد که اثر غلظت‌های مختلف 2,4-D در افزایش عرضی جنین‌های کشت‌شده پس از ۸ روز در سطح ۵٪ معنی‌دار بوده اما برافزایش طولی آن‌ها تأثیر معنی‌داری را نشان نداد (شکل ۱). بیشترین افزایش اندازه عرضی جنین‌ها در بالاترین میزان 2,4-D یعنی غلظت ۳ میلی‌گرم در لیتر مشاهده شد که با نتایج آشیس و دپس (۱۹۹۰) مغایرت داشت. این محققین گزارش کردند که از بین غلظت‌های متفاوت به‌کاررفته (۰/۰۱، ۰/۱، ۱، ۵ و ۱۰ میلی‌گرم در لیتر) بهترین نتیجه در غلظت ۱ میلی‌گرم 2,4-D مشاهده شد که می‌تواند به دلیل ماهیت بالغ بودن ریز نمونه‌های مورداستفاده در این آزمایش باشد؛ اما نتایج به دست آمده با تحقیقات تاهیر و همکاران (۲۰۱۱) مطابقت داشت.

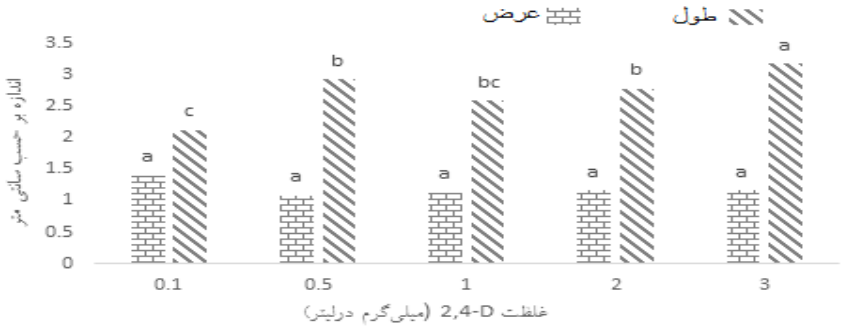
تأثیر غلظت هورمون NAA بر کالوس زایی و افزایش اندازه کالوس های تولید شده: نتایج به‌دست‌آمده از این تحقیق نشان داد که مقدار هورمون اکسین به کار رفته در محیط کشت استبرق بر کالوس زایی و افزایش اندازه این کالوس ها تأثیر معنی‌داری داشته است. هنگامی که ریزنمونه ها در محیط کشت MS بدون اکسین کشت شدند کالوس زایی صورت نگرفت اما با افزودن هورمون NAA کالوس زایی انجام شد. نتایج نشان داد که با افزایش NAA از ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر تا ۱ میلی‌گرم در لیتر اندازه کالوس‌های تولید شده افزایش یافت به صورتی که بیشترین اندازه ثبت شده کالوس‌های تولیدی در غلظت ۱ میلی‌گرم در لیتر مشاهده شد (شکل ۲) اما با افزایش غلظت این هورمون از ۱ میلی‌گرم به ۲ و ۳ میلی‌گرم در لیتر اندازه کالوس های تولید شده کاهش پیدا کرد که نتایج مشابه این تحقیق در مطالعات دیگر نیز گزارش شده است (۹). در بین غلظت های مورد استفاده در این تحقیق بیشترین کالوس تولید شده در غلظت ۱ میلی‌گرم در لیتر NAA به ثبت رسید و میتوان گفت بهترین غلظت NAA در تولید کالوس از جنین های بالغ تیمار ۱ میلی گرم در لیتر NAA می‌باشد زیرا با افزایش بیشتر غلظت NAA از ۱ میلیگرم در لیتر میزان تولید کالوس به صورت نزولی کاهش پیدا کرد.

تأثیر غلظت هورمون‌های NAA و BA در شاخه زایی و افزایش اندازه شاخه‌های تولیدشده: همان‌گونه که در تحقیقات محققینی مانند ردی و همکاران (۲۰۱۲)، ازندگی و همکاران (۱۳۸۷) و توکلی (۱۳۷۹) ثابت شده است، تعادل هورمونی بین اکسین و سایتوکینین در باززایی ریزنمونه های کشت شده در محیط کشت درون شیشه‌ای نقش اساسی را ایفا می‌کند. نتایج حاصل از جدول تجزیه واریانس اثر هورمون‌های گیاهی بر اندازه شاخه‌های تولیدشده (جدول ۱) نشان داد که تأثیر متقابل این هورمون‌ها بر شاخه زایی و افزایش اندازه گیاهچه‌های تولیدی در سطح ۱ درصد معنی‌دار بود. در بین تیمارهای مورد استفاده در این آزمایش تیمار ۱ میلی‌گرم در لیتر BA و ۲ میلی‌گرم در لیتر NAA بهترین نتیجه را نشان داد. بالاترین نرخ باززایی و بیشترین اندازه گیاهچه های تولید شده در این تیمار مشاهده شد و علاوه بر این شاخه‌های تولیدشده در این تیمار از کیفیت بالاتری برخوردار بوده و

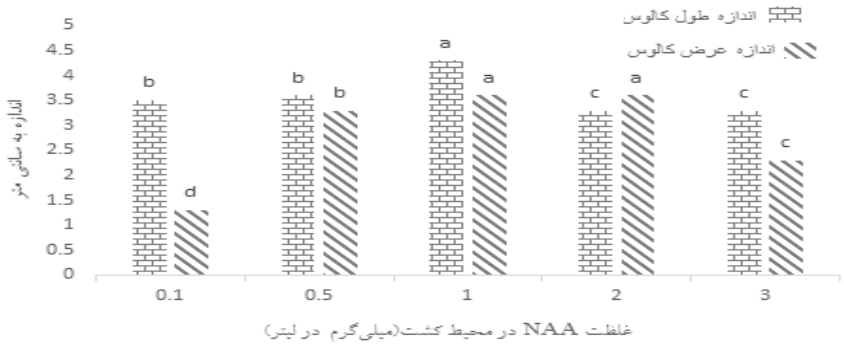
www.SID.ir

در مرحله سازگاری گیاهان در شرایط گلخانه نیز عملکرد بهتری را نشان دادند (شکل ۴).

تأثیر تیمارهای مختلف ریشه‌زایی بر اندازه ریشه‌های تولیدی: با توجه به نتایج به‌دست‌آمده از آزمایش حاضر (شکل ۳) می‌توان نتیجه گرفت که از بین غلظت‌های به‌کاربرده شده هورمون NAA جهت ریشه‌زایی گیاهچه‌های تولیدی بهترین نتیجه با کاربرد ۱ میلی‌گرم در لیتر حاصل می‌شود؛ و در این تیمار بیشترین حجم ریشه تولیدشده (۳/۳ سانتی‌متر) مشاهده شد در حالی است که کمترین میزان ریشه‌های تولیدی به مقدار (۰/۷ سانتیمتر) در تیمار ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر NAA به ثبت رسید.



شکل ۱- تأثیر غلظت‌های مختلف2,4-D برافزایش اندازه جنین‌های کشت‌شده پس از ۸ روز



شکل ۲- تأثیر غلظت‌های مختلف NAA برافزایش اندازه کالوس های تولید شده

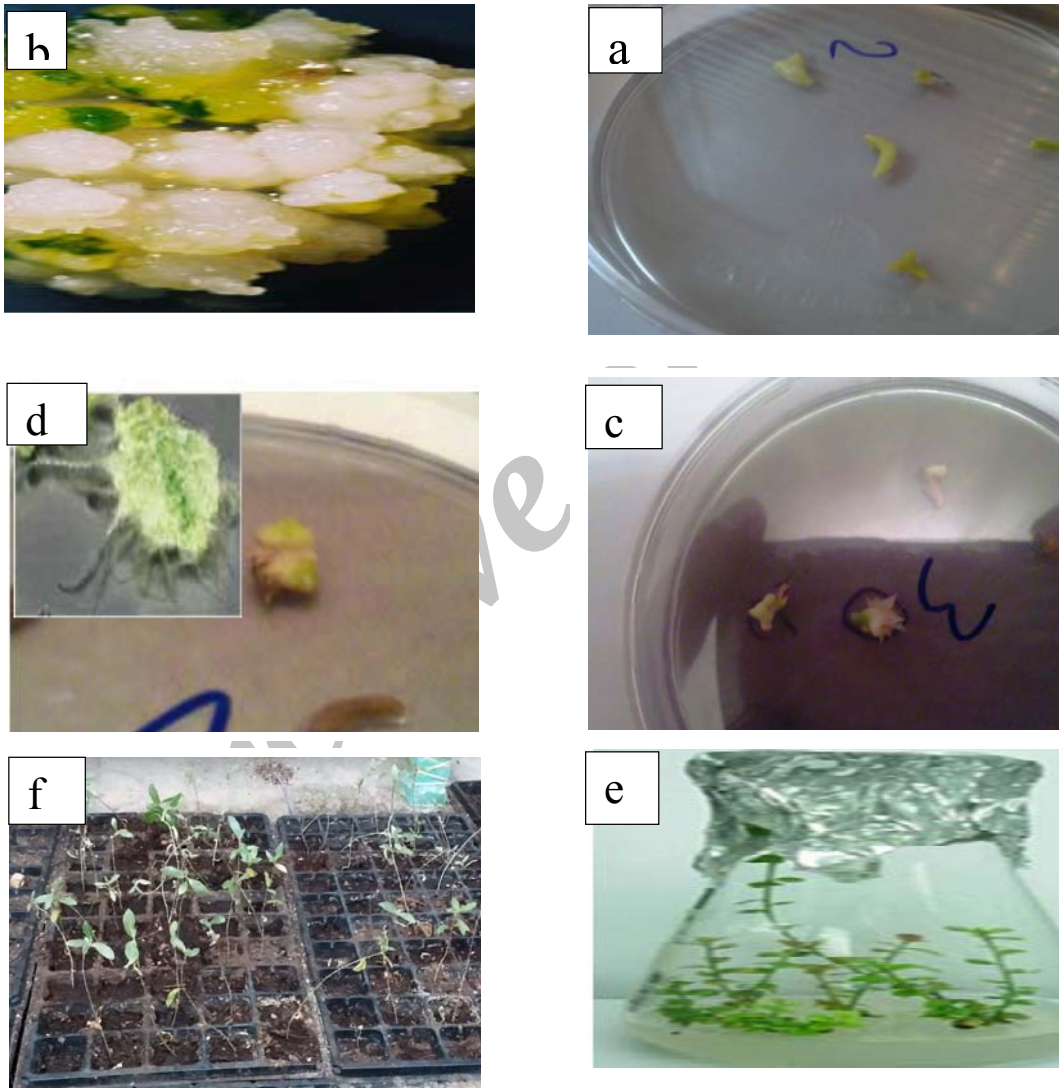
شکل ۳- تأثیر غلظت‌های مختلف NAA بر ریشه‌زایی گیاهچه های تولید شده

www.SID.ir

جدول ۱- جدول تجزیه واریانس اثر مقادیر مختلف NAA و BA محیط کشت بر رشد شاخه‌های تولید شده

منابع تغییرات	مجموع مربعات	درجه آزادی	میانگین مربعات
هورمون NAA	۴۰/۸۹۴	۴	۱۰/۲۲۴**
هورمون BA	۲۱/۴۵۸	۴	۵/۳۶۵ **
اثر متقابل NAA و BA	۱۷/۲۳۹	۱۶	۱/۰۷۷**
خطای آزمایشی	۰/۷۹۳	۵۰	۰/۰۱۶

**دارای اختلاف معنی‌دار در سطح۵ درصد آزمون چند دامنه‌ای دانکن



شکل ۴- مراحل ریز ازدیادی استبرق. (a) جنین‌های متورم شده پس از ۸ روز قرارگیری در محیط کشت حاوی ۳ میلی‌گرم در لیتر2,4-D ، (b)تولید کالوس بعد از ۲۵ روز از قرارگیری نمونه‌ها در محیط کشت حاوی ۱ میلی‌گرم در لیتر NAA، (c) زیر کشت کالوس های تولیدی در محیط کشت حاوی ۱ میلی‌گرم در لیتر NAA، (d) تولید ریشه‌های اولیه از کالوس، (e) شاخه زایی در محیط کشت حاوی ۱میلی‌گرم BA و ۲ میلی‌گرم در لیتر NAA

www.SID.ir

بحث

امروزه استفاده از گیاهان دارویی یا فراورده‌های آن‌ها در معالجه و یا پیشگیری از بیماری‌های گوناگون افزایش یافته است. دلایلی ازجمله اثرات جانبی کمتر و داشتن منشأ طبیعی این فراورده‌ها نسبت به داروهای شیمیایی توجه محققان زیادی را به خود معطوف ساخته است. امروزه تقاضای رو به گسترش مصرف گیاهان دارویی فشار زیادی را به عرصه‌های طبیعی وارد نموده و برداشت بی‌رویه گیاهان دارویی خودرو این گیاهان را در معرض نابودی قرار داده است. برای اینکه بتوان از یک‌سو به نیاز مصرف‌کنندگان گیاهان دارویی پاسخ داده و درعین‌حال از نابودی این گیاهان جلوگیری نمود باید از تکنیک‌های جدید تولید گیاهان مانند کشت بافت و ریزازدیای استفاده نمود. استفاده از این روش‌ها باعث شده که بشر بتواند در فضای محدود و در طول مدت‌زمان نسبتاً کم گیاهان دارویی مورد نیاز خود را تولید نماید. گیاه استبرق به دلیل داشتن مواد دارویی گوناگون و مقاومت به شرایط نامساعد محیطی به عنوان یکی از گیاهان دارویی باارزش شناخته می‌شود که در این پژوهش سعی شده که شرایط بهینه هورمون‌های مورد نیاز محیط کشت این گیاه به دست آمده تا در تحقیقات بعدی مورد استفاده قرار گیرد.

از بین غلظت‌های مورد استفاده 2,4-D غلظت ۳ میلی‌گرم در لیتر توانست نتایج مطلوب‌تری را در انگیزش کالوس نشان دهد. کالوس‌هایی که از این جنین‌ها در مراحل بعدی آزمایش تولید شد اندازه بزرگ‌تری داشته و همچنین دارای رنگ سبز کمرنگ بودند. این کالوس‌ها به دلیل انجام فتوسنتز توانایی تولید منبع کربنی مورد نیاز خود را داشته و در مراحل بعدی افزایش حجم قابل‌ملاحظه‌ای پیدا می‌کردند که در تحقیق انجام شده توسط تاهیر و همکاران (۲۰۱۱) نیز مشاهده شده بود. البته در این تحقیق به دلیل استفاده از ریزنمونه های بالغ‌تر مقدار حداکثر افزایش حجم جنین‌ها در مقادیر متفاوتی از 2,4-D مشاهده شد.

در مورد اثر هورمون NAA در تولید کالوس و افزایش اندازه آن می‌توان گفت که وجود این هورمون در محیط کشت کالوس زایی ریز نمونه‌های جنین استبرق حیاتی بوده و در صورت عدم وجود آن کال زایی انجام نخواهد گرفت کما اینکه در این آزمایش به خوبی مشاهده شد که در محیط‌های کشت بدون NAA جنین‌ها پس از مدتی شروع به تغییر رنگ نموده و نهایتاً از بین می‌رفتند. در آزمایش ما ثابت شد که مناسب‌ترین غلظت مورد استفاده NAA در این مرحله غلظت ۱ میلی‌گرم در لیتر بود، زیرا با افزایش مقادیر بیشتر این هورمون میزان کالوس به دست آمده کاهش پیدا می‌کرد. در توجیه این اثر دوگانه NAA می‌توان این‌گونه نتیجه گرفت که متعادل‌ترین غلظت هورمونی برای کال زایی جنین‌ها مقدار ۱میلی‌گرم در لیتر NAA و با افزایش مقادیر بیشتر آن تعادل درونی هورمونی ریزنمونه به هم خورده که در تحقیقات متعددی گزارش شده است.

مناسب‌ترین غلظت هورمونی بینNAA و BA جهت تولید شاخساره و باززایی به ترتیب ۱ و ۲ میلی‌گرم در لیتر به ثبت رسید. گیاهچه‌های به دست آمده از این تیمار نسبت به تیمارهای دیگر کیفیت ظاهری قابل قبول‌تری را نشان دادند. این گیاهچه‌ها در مرحله نهایی سازگاری بالاتری را نشان داده و کمترین تلفات این مرحله در این تیمار مشاهده شد. از نتایج به دست آمده این آزمایش این‌گونه استنباط می‌شود که جهت تولید نوساقه برقراری تعادل داخلی هورمون‌های گیاهی اکسین و سایتوکینین ضروری بوده و همچنین بتوان مقادیر به دست آمده در این آزمایش را برای تولید شاخساره و پرآوری گیاهچه‌های تولیدی در مطالعات بعدی بهینه سازی محیط کشت جنین‌های استبرق توصیه نمود.

نتایج به دست آمده از این تحقیق نشان داد که در مرحله ریشه‌زایی نیز با افزایش مقادیر NAA از ۰/۱ به ۱میلی‌گرم در لیتر میزان ریشه تولید شده افزایش یافته و پس از

www.SID.ir

افزایش مقادیر بیشتر این هورمون رو به کاهش می‌گذارد که نظیر چنین نتایجی توسط محققینی از جمله پاریک و همکاران زارش شده است. به نظر این محققین غلظت‌های پایین هورمون اکسین باعث انگیزش ریشه دهی شده و باعث تولید ریشه‌های بیشتر می‌گردد در حالی که مقادیر بالاتر این هورمون اگرچه در مراحل اولیه باعث انگیزش ریشه زایی می‌گردد اما از افزایش اندازه و طویل شدن این ریشه‌های تولید شده ممانعت به عمل می آورد.

به‌صورت کلی در این آزمایش مشخص شد که هورمون‌های گیاهی در باززایی و تکثیر ریز نمونه‌های استبرق با استفاده از کشت جنین نقش حیاتی دارند. در مراحل مختلف باززایی این ریز نمونه‌ها مقادیر متفاوت این هورمون‌ها اثرات متفاوتی را القا نمود. پژوهش حاضر اولین پژوهش انجام شده در مورد کشت درون شیشه‌ای استبرق در کشور ایران بوده و می‌تواند به عنوان پژوهش پایه در مطالعات بعدی بهینه‌سازی محیط کشت این گیاه مورد استفاده قرار گیرد تا درنهایت با بهینه کردن شرایط محیط کشت درون شیشه‌ای اقدام به تکثیر گیاه استبرق در سطح وسیع نموده و با استفاده از پروتکل به‌دست‌آمده گیاهان عاری از بیماری و شبیه به والد را به دست آورد.

منابع

۱- ازندگی عمران عالیشاه، محمدباقر باقریه نجار و نسرین یاوری،۱۳۸۷. چند ساقه زایی و پتانسیل باززایی جنین‌های ناقص و کامل در چهار گونه پنبه. مجله الکترونیک کشاورزی و منابع طبیعی گلستان. ۱: ۳۹-۵۳.

۲- باقری، عبدالرضا و صفاری، مهری.۱۳۸۸. مبانی کشت بافت‌های گیاهی. انتشارات دانشگاه فردوسی مشهد. ۴۰۶.

۳- توکلی حسینی، ع.۱۳۷۹؛ پینه‌زایی در گونه‌های آنتوریوم. پایان‌نامه کارشناسی ارشد. دانشگاه شیراز.۶۸ صفحه

4- Ashis Taro Roy and Deepesh N.De. 1990. Tissue culture and plant regeneration from immature embryo explants of *Calotropis gigantean* (Linn) R.B. plant cell tissue and organ culture. 20:229-233.

5- De Fossard, R.A. 1976.Tissue Culture for plant propagators. Australia: University of New England

6- De Sousa Lima R C, Chaves Silva M C, Torres Aguiar C C, Camelo Chaves E M, Ferreira Dias K C, Macêdo D S, de Sousa F C F, Carvalho K M . 2012. Anticonvulsant action of *Calotropis procera* latex proteins. Epilepsy & Behavior 23:123–126

7- Deshmukh T P, Fernandes J, Atul A, Toppo E. 2009. Wound healing activity of *Calotropis gigantea* root bark in rats Journal of Ethno pharmacology. 125:178–181

8- Erdman MD.1983. Nutrient and cardenolide composition of unextracted and solvent-extracted *Calotropis procera*.,J Agric Food Chem;31:509–13

9- Hemadri Reddy S ,Chakravarthi .M and Chandrashekara, K N, .2012. In vitro multiple shoot induction through axillary bud of *Asclepias curassavica* L. – A valuable medicinal plant. International Journal of Scientific and Research Publications, Volume 2

10- Ibrahim, S. R., Mohamed, G. A., Shaala, L. A., Moreno, L., Banuls, Y., Kiss, R., & Youssef, D. T. A. (2014). Proceraside A, a new cardiac glycoside from the root barks of Calotropis procera with in vitro anticancer effects. Natural product research, 28(17), 1322-1327.

11- Juncker. T, Schumacher. M, Dicato M and Marc D. 2009. UNBS1450 from *Calotropis procera* as a regulator of signaling pathways involved in proliferation and cell death. Laboratoire de Biologie Mole´culaire ET Cellulaire du Cancer, Hoˆpital Kirchberg, 9 rue Edward Steichen, L-2540 Luxembourg, Luxembourg. Biochemical Pharmacology 78 (1–10)

12- Karim M R, Habib M.R. 2011. Evaluation of antitumor activity of *Calotropis gigantea* L. root bark against Ehrlich ascites carcinoma in Swiss albino mice. Asian Pacific Journal of Tropical Medicine. 786-790

13- Lee CW, Yeches J, Thomas JC .1982. Tissue culture propagation of Euphorbia lathyris and *Ascelpias erosa*. HortScience 17:533 (abstract)

14- Narayanaswamy Rao PS, and Benjamin BD.1970. Differentiation ex ovulo of embryos and plantlets in stem tissue cultures of *Tylophora indica*. Physiol Plant 23:140-144

15- Parić, A., J. Čakar, et al. (2011). "Induction of bulblets on leaf and bulb explants of endangered

Archive of SID
www.SID.ir

Lilium bosniacum (G. Beck) G. Beck ex Fritsch." Botanica Serbica (Serbia).

16- Parrotta, J.A. 2001. Healing plants of Peninsular India. CAB International, Wallingford, UK and New York. 944 p.

17- Sharma, B.M. 1968. Root systems of some desert plants in Churu, Rajasthan. Indian Forester 94(3): 240-246

18- Soares, PM, Lima S R, Matos S G, Andrade M M , Patrocínio A, Cleverson D.T. Freitas d . 2005. Antinociceptive activity of *Calotropis procera* latex in mice. *Journal of Ethnopharmacology*.99:125-129.

19- Tahir. S.M, Victor.K and Abdolkadir S. 2011 the Effect of 2, 4-Dichlorophenoxy Acetic Acid (2, 4-D) Concentration on Callus Induction in Sugarcane (*Saccharum officinarum*).

20- Tideman J, Hawker JS.1982. In vitro propagation of latex-producing plants. Ann Bot 49:273-279.

21- Velmurugan. S, Thanga Viji V, Michael Babu M, Mary Punitha J, Citarasu T .2012 .Antimicrobial effect of Calotropis procera active principles against aquatic microbial pathogens isolated from shrimp and fishes. Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine. S812-S817.

22- Wilson HM, Street HE .1975. the growth, anatomy and morphogenetic potential of callus and cell suspension cultures of *Hevea brasiliensis*. Ann Bot 39:671-682

23- Wong KF and Taha R M. 2012. the effect of 2,4-dichlorophenoxyacetic Acid and 6-benzylaminopurine on Callus Induction and Plant Regeneration of *Allamand acathartica* a Valuable Medicinal Plant.

Archive of SID

www.SID.ir

Study of milkweed (Calotropis procera) regeneration potential in vitro culture conditions

Abbasi H.A.[1], Tasaodi S.[2], Mirsoleimani M.A.[2] and Masoudi M.[2]

[1] Young Researchers and Elite Club, Karaj Branch, Islamic Azad University, Karaj, I.R. of Iran

Shiraz Development Center

Abstract

Milkweed is a valuable medicinal plant, which grows in some regions of Iran. Its immense medicinal properties, which are of high value, have made it an important crop to be cultivated commercially. This plant is propagated from seed and root and shoot cuttings, both of which have some problems. Therefore, new propagation methods should be studied, for example, tissue culture. This study aimed at obtaining the appropriate concentrations of plant hormones in tissue culture conditions. The experiment was carried out based on a completely randomized design with three replications. We study effect of 2, 4-D concentration (0.1, 0.5, 1, 2, and 3 mgL^{-1}) for callus initiation and BA and NAA, each at five levels (0.1, 0.5, 1, 2, and 3 mgL^{-1}) for explants regeneration. Medium was MS with the following modifications: ammonium nitrate, potassium nitrate, calcium chloride, thiamin and Myo-Inositol concentrations were, respectively, 2000, 2400, 600, 4, 300 mg, 30 g sucrose and activated charcoal (3%). Mature embryos were used as explants and morphological traits such as embryo size, produced callus size, number and size of shoots and roots were recorded. Results showed that 2, 4-D increased the size of cultured embryos, significantly ($P\leq0.05$). Highest embryo volume was observed in cultures treated with 3 mgL^{-1} 2, 4-D. The highest callusing was recorded in 1 mgL-1 NAA. Effects of BA and NAA concentrations were significant; the highest values were observed with combined of 1 mgL^{-1} BA and 2 mgL^{-1} NAA. In rooting stage, 1 mgL^{-1} NAA treatment was able to induce the highest root number.

Key words: Milkweed, BA, NAA, callus formation and rooting

Archive of SID

www.SID.ir