

مقاله کوتاه

بررسی اثر تنظیم کننده‌های رشد و جداکشت بر پینه‌زایی گیاه دارویی زنیان



بهمن فاضلی نسب و زیبا فولادوند

ایران، زابل، دانشگاه زابل، پژوهشکده کشاورزی، گروه پژوهشی زراعت و اصلاح نباتات

تاریخ پذیرش: ۹۶/۲/۳۰

تاریخ دریافت: ۹۵/۵/۲۵

چکیده

زنیان (*Carum copticum*) به عنوان یک گیاه دارویی مهم مورد توجه بوده زیرا شامل تعداد زیادی از آلکالوئیدها و متابولیت‌های ثانویه از جمله تیمول می باشد. کشت بافت زنیان می تواند به عنوان یک فن جدید منابعی مانند پینه و سوسپانسیون سلولی و نهایت تولید متابولیت‌های ثانویه را فراهم سازد. در این تحقیق القای پینه در گیاه دارویی زنیان در شرایط درون شیشه‌ای به‌عنوان یکی از مقدمات اصلاح این گیاه پرکاربرد مورد نظر بود. بدین منظور از آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با فاکتورهای، منشأ جداکشت (ریشه، ساقه، برگ و کلئوپتیل)، تنظیم‌کننده رشد ((2, 4-D; ۲، ۴ و ۸ میلی گرم در لیتر) و تنظیم‌کننده رشد (BAP؛ ۰/۲۵، ۰/۵ و ۱ میلی گرم در لیتر)) در سه تکرار استفاده شد. مقایسه میانگین نشان داد که جداکشت ساقه بیشترین پینه‌زایی داشت و قطعات کلئوپتیل و برگ در رتبه‌های بعدی پینه‌زایی بودند. در این آزمایش تیمارهای ۲ میلی گرم در لیتر 2, 4-D، به همراه ۰/۲۵ میلی گرم در لیتر BAP بیشترین پینه را تولید کردند.

واژه های کلیدی: زنیان (*Carum copticum*)، پینه (کالوس)، BAP، 2, 4-D

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۹۱۸۳۴۵۵۲۱۹، پست الکترونیکی: bfazelinasab@gmail.com

مقدمه

سوماکلونال، پرتودهی و جهش و تولید شیمر و پلی پلوئیدی، تولید و استخراج عطرهایه (اسانس) و همچنین اصلاح مولکولی امکان‌پذیر گردد.

تا کنون گزارشی در مورد پینه (کالوس) زایی زنیان ارایه نشده اما پینه زایی برخی از گیاهان خانواده چتریان از جمله زیره سبز ایرانی (۹)، جاشیر (*Prangos ferulacea*) (۱۷)، وشا (*Dorema ammoniacum* D.) (۷)، کاهو (*Lactuca sativa* L.) (۱۱) و رازیانه (*Foeniculum vulgare* Miller) (۱۲) ذکر شده است.

مواد و روشها

جهت انجام این آزمایش در سال ۱۳۹۴، بذور توده بومی گیاه دارویی زنیان سیستان (خاستگاه زنیان (۶)) از بانک

زنیان (*Carum copticum*) یکی از گیاهان دارویی است که به دلیل تولید متابولیت‌های ثانویه و اهمیت بسیاری که در مصارف پزشکی، صنایع آرایشی و بهداشتی و نیز صنایع غذایی دارد، بسیار مورد توجه است. کاربرد این گیاه دارویی در تولید مواد آرایشی، بهداشتی و غذایی در جهان گسترش یافته است (۶). بنابراین استفاده از فنهای اصلاحی در اصلاح زنیان و بهبود کمیت و کیفیت ویژگیهای مواد مؤثره مهم موجود در آن امری ضروری است. با توجه به اینکه گزارشهای کمی در مورد کشت بافت گیاهان خانواده چتریان وجود دارد لذا در این تحقیق به یافتن شیوه‌های کم‌هزینه و اقتصادی و زودبازده جهت القای پینه در گیاه دارویی زنیان در شرایط کشت بافت پرداخته شده است تا استفاده از روشهای اصلاحی از جمله استفاده از تنوع

تنظیم‌کننده رشد BAP و سطوح مختلف تنظیم‌کننده رشد 2, 4-D وجود داشت.

جدول ۱- تجزیه واریانس پینه‌زایی برای جداکشتها و تنظیم‌کننده‌های رشد

میانگین مربعات پینه‌زایی	درجه آزادی	منابع تغییر
۴۶۹۱/۳۴**	۳	جداکشت
۱۱۱۱/۱۲**	۲	BAP
۱۱۱۱/۱۱**	۲	2, 4-D
۱۷۲۸/۴**	۶	BAP*جداکشت
۲۴۶/۹۱**	۶	2, 4-D*جداکشت
۱۳۸/۸۹**	۴	BAP*2, 4-D
۷۵۶/۱۶۴**	۱۲	BAP*2, 4-D*جداکشت
۱/۲۷۲	۷۲	خطا
	۱۰۷	کل

** معنی دار در سطح یک درصد

تأثیر تنظیم‌کننده رشد BAP به‌تنهایی در القای پینه کمتر از تأثیر تنظیم‌کننده رشد 2, 4-D بوده اما BAP توانسته در غلظت پایین‌تری پینه دهی را تحریک کند. اما در برهمکنش تنظیم‌کننده‌های رشدی (جدول ۲)؛ BAP (۰/۲۵) میلی گرم در لیتر) با 2, 4-D (۲ میلی گرم در لیتر) توانسته‌اند بیشترین پینه را در جداکشت ساقه تولید کنند و کمترین میزان پینه دهی در غلظت BAP (۱ میلی گرم در لیتر) با 2, 4-D (۸ میلی گرم در لیتر) در جداکشت ریشه بوده است (جدول ۲)؛ یعنی در اثر برهمکنش، تنظیم‌کننده رشد BAP باعث شده تأثیر تنظیم‌کننده رشد 2, 4-D در القای پینه کمتر شود لذا پیشنهاد می‌گردد اولاً برای به دست آوردن بهترین و بیشترین پینه در گیاه دارویی زنیان از تنظیم‌کننده رشد 2, 4-D (۲ میلی گرم در لیتر) به‌تنهایی یا BAP (۰/۵ میلی گرم در لیتر) و ترکیب BAP (۰/۲۵) میلی گرم در لیتر) با 2, 4-D (۲ میلی گرم در لیتر) و جداکشت ساقه استفاده شود. دوماً از سایر ترکیبات تنظیم‌کننده رشدی دیگر 2, 4-D با انواع تنظیم‌کننده‌های رشدی دیگر مثل IAA، NAA و غیره استفاده شود تا نتیجه

ژن پژوهش‌کننده زیست‌فناوری کشاورزی دانشگاه زابل تهیه و برای القای پینه، از آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با فاکتورهای منشأ جداکشت (ریشه، ساقه، برگ و کلئوپتیل)، تنظیم‌کننده رشد 2, 4-D (۲، ۴ و ۸ میلی گرم در لیتر) و تنظیم‌کننده رشد BAP (۰/۲۵، ۰/۵ و ۱ میلی گرم در لیتر) در سه تکرار استفاده شد. جداکشت‌های تهیه‌شده از گیاهان ۴۸ روزه رشد یافته در شرایط درون شیشه‌ای بر روی محیط‌های کشت MS تحت تیمارهای مختلف تلقیح شدند. ظروف کشت حاوی جداکشتها در اتاقک رشد در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد در شرایط نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی، نگهداری و هر دو هفته یکبار واگشت شدند. بعد از دو ماه از تلقیح جداکشتها، صفات درصد پینه‌زایی (تولید و یا عدم تولید پینه در جداکشتها) ثبت شد.

تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم‌افزارهای R و Statistic 10 و جهت رسم نمودارها از نرم‌افزار Excel و مقایسه میانگین از آزمون چند دامنه‌ای دانکن (Duncan) در سطح احتمال ۱ درصد انجام شد.

نتایج

جهت بررسی فرآیند پینه زایی، قطعات جداکشت (ریشه، ساقه، برگ و کلئوپتیل) روی محیط کشت پایه MS جامد که حاوی سوکروز ۳ درصد، ویتامین B5 و ۱۶ غلظت مختلف از ترکیب دو تنظیم‌کننده رشد 2, 4-D و BAP بود، قرار گرفتند. پس از بررسی‌های آماری، نتایج نشان داد که هر دو تنظیم‌کننده رشد 2, 4-D و BAP در بیشتر غلظت‌ها باعث القای فرآیند پینه‌زایی در اکثر قطعات جداکشت شده (به‌جز ریشه) (جدول ۱ و ۲) به‌طوری‌که بیشترین درصد تشکیل پینه (۱۰۰ درصد) در قطعات جداکشت ساقه و کمترین (صفر درصد) در قطعات جداکشت ریشه مشاهده شد همچنین از لحاظ پینه‌زایی اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال یک درصد بین جداکشتها، سطوح مختلف

جامع و قاطع‌تری به لحاظ مؤثرترین تنظیم‌کننده رشد یا ترکیب تنظیم‌کننده رشدی مختلف در القای پینه گیاه دارویی زنیان به دست آید.

جدول ۲- بررسی اثر تک‌ی و اثر متقابل تنظیم‌کننده رشد 2, 4-D و BAP بر درصد پینه‌زایی در قطعات جداگشت گیاه زنیان

ریزنمونه	2, 4-D	پینه زایی %	BAP	پینه زایی %	2, 4-D	پینه زایی %	BAP	پینه زایی %
ریشه	۲	۰/۰ c	۰/۲۵	۰/۰ c	۰/۲۵	۴۱/۶ a	۰/۲۵	۰/۲۵
ریشه	۴	۰/۰ c	۰/۵	۰/۰ c	۰/۵	۸/۳ b	۰/۵	۲
ریشه	۸	۰/۰ c	۱	۰/۰ c	۱	۸/۳۳ b	۱	۱
ساقه	۲	۶۶/۶ a	۰/۲۵	۴۴/۴ ab	۰/۲۵	۲۵ ab	۰/۲۵	۰/۲۵
ساقه	۴	۳۳/۳ b	۰/۵	۵۵/۵ a	۰/۵	۱۶/۶ ab	۰/۵	۴
ساقه	۸	۲۲/۲ bc	۱	۲۲/۲ bc	۱	۸/۳ b	۱	۱
برگ	۲	۱۱/۱ bc	۰/۲۵	۱۱/۱ c	۰/۲۵	۸/۳ b	۰/۲۵	۰/۲۵
برگ	۴	۰/۰ c	۰/۵	۰/۰ c	۰/۵	۸/۳ b	۰/۵	۸
برگ	۸	۰/۰ c	۱	۰/۰ c	۱	۰ b	۱	۱
کلئوتیل	۲	۲۲/۲ bc	۰/۲۵	۲۲/۲ bc	۰/۲۵			
کلئوتیل	۴	۱۱/۱ bc	۰/۵	۱۱/۱ c	۰/۵			
کلئوتیل	۸	۰/۰ c	۱	۰/۰ c	۱			

حروف مشترک نشان دهنده عدم اختلاف معنی دار است

بحث

قطعات جداگشت در این تحقیق نتایج مختلفی ارائه داده‌اند به طوری که جداگشت ریشه در هیچ‌کدام از محیط‌های کشت قادر به پینه‌زایی نبوده و نتوانسته نتایج قابل قبولی ارائه دهد، بعد از مدتی نکروزه شده و از بین رفتند اما بیشترین میزان تولید پینه در جداگشت ساقه، سپس به ترتیب در جداگشت کلئوتیل و برگ مشاهده شد. ضمناً گزارش شده که بهترین قطعات جداگشت برای تشکیل پینه طبق تحقیقات مالیک و ساکسنا (۱۰) برگ، امیری و فهیمی (۳) هیپوکوتیل، احمد و همکاران (۲) گرهک لپه‌ای، الشمی و همکاران (۴) اپی کوتیل و سلیمانی و همکاران (۱۵) دمبرگ گزارش شده اما تاکنون هیچ گزارشی در مورد کشت بافت زنیان ارائه نشده است. لذا تحقیق حاضر اولین گزارش از کشت بافت زنیان است؛ که مؤثرترین جداگشت، جداگشت ساقه بود.

در نتایج (۸) گزارش شده که هیچ پینه‌ای در جداگشت برگ لوبیا تشکیل نشده و گزارش دادند که بیشترین تأثیر تنظیم‌کننده رشد BAP (در ۴ mg/l) جهت القای پینه لوبیا حدود ۱۱ درصد بوده ولی به صورت ترکیبی با تنظیم‌کننده رشد NAA توانسته پینه‌زایی را تا ۴۲ درصد افزایش دهد در صورتی که در تحقیق حاضر بیشترین اثر تنظیم‌کننده رشد BAP بر میزان پینه دهی زنیان ۵۵ درصد و در غلظت پایین ۰/۵ میلی گرم در لیتر بوده است اما نکته مشترک این است که ترکیب تنظیم‌کننده رشد BAP با 2, 4-D (در زنیان) و BAP با NAA (در لوبیا) به طور یکسان ۴۲ درصد پینه دهی را تولید کرده‌اند. ضمناً گزارش شده (۱) که استفاده از هورمون BAP با یک هورمون اکسینی مانند NAA می تواند رشد را تا حد قابل ملاحظه ای افزایش دهد و بر اساس نتایج حاصل از این تحقیق می توان ذکر کرد که تأثیر NAA و 2, 4-D در این مورد می تواند شبیه باشد. از طرفی گزارش شده که نمکهای موجود در محیط کشت تا حدودی بر میزان رشد و پینه دهی تأثیر منفی دارند (۱۳)

لیتر BAP و بهترین جداکشت را هیپوکوتیل و مریستم انتهایی گزارش دادند. در تحقیق حاضر نیز هر دو تنظیم‌کننده رشد 2, 4-D و BAP در بیشتر غلظتها باعث القای فرآیند پینه‌زایی در اکثر قطعات جداکشت شده (به جز ریشه) شدند به طوری که بیشترین درصد تشکیل پینه (۱۰۰ درصد) در قطعات جداکشت ساقه مشاهده شد همچنین تنظیم‌کننده رشد BAP در غلظت ۰/۵ میلی گرم در میلی‌لیتر و تنظیم‌کننده رشد 2, 4-D نیز در غلظت ۲ میلی گرم در لیتر بیشترین تولید پینه داشته‌اند.

نتیجه‌گیری

امروزه برداشت بی‌رویه و غیراصولی از یکسو و مشکلات و پیچیدگیهای جوانه‌زنی بذور گیاهان دارویی از سوی دیگر، این گیاهان را در معرض خطر نابودی قرار داده است. از طرف دیگر، متغیر بودن ترکیبات دارویی از کلونی به کلون دیگر، پژوهشگران را بر آن داشته است که پس از یافتن کلون مناسب و برتر، به ازدیاد آن پردازند و این مهم جز با کاربرد روشهای کشت بافتی (ریز ازدیادی) به دست نمی‌آید. گیاه زنیان نیز از جمله گیاهان مهم و بومی ایران است (۶) که در سالهای اخیر توجه خاصی به آن شده است، بنابراین در پژوهش حاضر به ریز ازدیادی آن پرداخته شد و نتایج به دست آمده نشان داد که مؤثرترین تیمار تنظیم‌کننده رشدی در پینه‌زایی گیاه دارویی زنیان تیمار دو میلی گرم در لیتر 2, 4-D به همراه ۰/۲۵ میلی گرم در لیتر BAP و جداکشت ساقه بهترین جداکشت بود.

سپاسگزاری

این مقاله مرتبط با طرح پژوهشی شماره ۹۳۰۱۰۱۸ بوده که هزینه آن توسط معاونت پژوهشی دانشگاه زابل تأمین شده است، لذا از این مرکز تشکر و قدردانی می‌شود.

در نتیجه میزان بالای پینه دهی در زنیان می‌تواند به این دلیل باشد که این گیاه مقاوم به شوری است (۵) و توانسته در حضور تنظیم‌کننده‌های رشد پینه دهی بهتری را تولید کند.

از لحاظ ترکیب تنظیم‌کننده رشدی در بادرنجبویه برای القای مؤثر پینه بهترین تیمار تنظیم‌کننده رشدی مربوط به استفاده از تیمار تنظیم‌کننده رشدی ۱ میلی گرم در لیتر تنظیم‌کننده رشد 2, 4-D به همراه ۱ میلی گرم تنظیم‌کننده رشد BAP برای جداکشت‌های میانگرمه و دم‌برگ بود (۱۶). جهت ارزیابی تولید پینه در سه توده بومی زیره سبز ایرانی، توده خراسانی با ترکیب تنظیم‌کننده رشدی ۰/۴ میلی گرم در لیتر IAA، ۰/۲ میلی گرم در لیتر NAA و ۰/۱ میلی گرم در لیتر BAP بیشترین پینه زایی را نشان داده (۹)، در گیاه جاشیر (*Prangos ferulacea*) بهترین ترکیب هورمونی جهت القای پینه زایی در ترکیب تنظیم‌کننده رشد ۰/۵ میلی گرم در لیتر Kin و ۰/۵ میلی گرم در لیتر 2, 4-D گزارش شده (۱۷)، در گیاه وشا (*Dorema ammoniacum*) بهترین ترکیب هورمونی جهت القای پینه زایی در ترکیب تنظیم‌کننده رشد ۱ میلی گرم در لیتر NAA و ۰/۵ میلی گرم در لیتر BA گزارش شده (۷)، در گیاه کاهو (*Lactuca sativa* L.) بهترین ترکیب هورمونی جهت القای پینه زایی در ترکیب تنظیم‌کننده رشد ۰/۵۴ میلی گرم در لیتر NAA و ۰/۴۴ میلی گرم در لیتر BA و ریزنمونه کوتیلدون گزارش شده است (۱۱). سلیمانی و همکاران (۱۵) بهترین ترکیب تنظیم‌کننده رشدی را ۲ میلی گرم در لیتر 2, 4-D و ۱ میلی گرم در لیتر BA و بهترین جداکشت را دم‌برگ در گیاه بابا آدم گزارش دادند. سرخیل و همکاران (۱۴) تأثیر تنظیم‌کننده رشد 2, 4-D و BAP را بر پینه‌زایی رازیانه مورد بررسی قرار دادند و بهترین ترکیب تنظیم‌کننده رشدی را ۲ میلی گرم در لیتر 2, 4-D و ۰/۲۵ میلی گرم در

منابع

1- Ahmadi, J., R. Mohammadi, and G. A. Garosi. 2014. In vitro Micropropagation of

Catharanthus roseus (Linn.) G. Don via shoot multiplication. Journal of Cellular and

- Molecular Researches (Iranian Journal of Biology) 27 (1):14-25.
- 2- Ahmed, E. E., G. Bisztray, and I. Velich. 2002. Plant regeneration from seedling explants of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Acta Biologica Szegediensis* 46 (3-4):27-28.
 - 3- Amiri, H., and H. Fahimi. 2003. The effect of different concentrations of potassium salt tolerance bean in tissue culture. *Science Journal of Tehran University* 29:320-326.
 - 4- El-Shemy, H. A., M. Khalafalla, K. Wakasa, and M. Ishimoto. 2002. Reproducible transformation in two grain legumes-soybean and azuki bean-using different systems. *Cellular and Molecular Biology Letters* 7 (2B):709-720.
 - 5- Fazeli-Nasab, B., A. Davari, and M. Nikoei. 2016. The effect of Kinetin on seed germination and seedling growth under salt stress in *Sistan C. copticum*. Second International & Fourteenth National Iranian Crop Science Congress, University of Guilan, Rasht, Iran.
 - 6- Fazeli-nasab, B., and Z. Fooladvand. 2016. A Review on Iranian *Carum copticum* (L.): Composition and Biological Activities. *European Journal of Medicinal Plants* 12 (1):1-8.
 - 7- Ghasemian, K., S. Nazeri, A. Chehregani-Rad, and A. Mirzaie-Asl. 2015. Producing embryogenic callus from zygotic embryo in *Dorema ammoniacum* D. *Iranian Journal of plant Researches (Iranian Journal of Biology)* 28 (2):364-373.
 - 8- Karami, M., M. B. Bagherieh-Najjar, and M. Aghdasi. 2013. Optimization of conditions suitable for bean (*Phaseolus vulgaris* L.) regeneration. *Journal of Plant Biology* 5 (15):1-14.
 - 9- Mafavi Fard, M. R., A. J., and A. H. Beiki. 2010. callus Production and plant regeneration in Three Iranian Cumin Landraces (*Cuminum Cuminum*). *Plant Production Technology (Agricultural Research)* 9 (2):11-19.
 - 10- Malik, K. A., and P. K. Saxena. 1991. Regeneration in *Phaseolus vulgaris* L. Promotive role of N6-benzylaminopurine in cultures from juvenile leaves. *Planta* 184 (1):148-150.
 - 11- Mohebaladini, M., M. Jalali-Javaran, H. Alizadeh, F. Mehbodi, and H. Khosravi. 2010. Optimaization of callus induction and gene transformation system in *Lactuca Sativa* L. *Journal of Horticultural Science* 24 (2):195-202.
 - 12- Mulder-Krieger, T., R. Verpoorte, A. B. Svendsen, and J. C. Scheffer. 1988. Production of essential oils and flavours in plant cell and tissue cultures. A review. *Plant cell, tissue and organ culture* 13:85-154.
 - 13- Reis, É. S., J. E. B. Pinto, L. D. S. Rosado, and R. M. Corrêa. 2015. Influence of culture medium on In vitro seed germination and multiplication rate of *Melissa officinalis* L. *Revista Ceres* 55 (3):160-167.
 - 14- Sarkheil, P., M. Omidi, S. Peyghambari, and S. Davazdahemami. 2009. The effects of plant growth regulators and explants on callogenesis, regeneration and suspension culture in *Foeniculum vulgare* Mill. *Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants* 25 (3):364-375.
 - 15- Soleimani, T., M. Keyhanfar, K. Piri, and T. Hasanloo. 2014. Callus induction in Burdock (*Arctium lappa* L.). *Journal of Cellular and Molecular Researches (Iranian Journal of Biology)* 27 (2):252-259.
 - 16- Soltani pol, M. M., A. Mohammadi, H. Rahnama, and B. Abbaszadeh. 2011. Callusogenesis investigation of lemon balm (*Melissa officinalis* L.). *Journal of agronomy and plant breeding* 7 (1):45-54.
 - 17- Ziaee-Fard, Z., M. Mianabadi, and M. Aghdasi. 2013. The role of hormone treatment on complete Regeneration of Jashir (*Prangos ferulacea* Lindl) in vitro. *Journal of Plant Production* 20 (1):35-47.

*Short paper***The effects of plant growth regulators and explants on callus induction in Ajowan****Fazeli-Nasab B. and Fooladvand Z.****Dept. of Agronomy and Plant Breeding, Agricultural Research Institute, University of Zabol, Zabol, I.R. of Iran****Abstract**

Ajowan (*Carum copticum*) has been considered as an important medicinal plant because it contains many alkaloids such as Thymol. *In vitro* culture of Ajowan provides new tissue sources such as callus, cell suspension and seedlings to produce secondary metabolites. The present study describes callus production optimization procedures experiment that was a factorial experiment based on completely randomized design at three levels with four explants (root, shoot, leaf and coleoptile) on Murashige and Skoog (MS) medium supplemented with different concentrations of BAP (0.25, 0.5 and 1 mg/l) and 2,4-D (2, 4 and 8 mg/l). Comparison of means showed that the maximum callus production was obtained from shoot explants, the coleoptile and leaf explants were in the second orders. In overall, 0.25 mg /l BAP with 2 mg 2, 4-D mg/l concentrations proved to be optimal for the production of maximum callus induction.

Key words: Ajowan, Callus, 2, 4-D, BAP