فصلنامه (علمی)

زیست شناسی تکوینی

سال چهاردهم، شماره ۴، پاییز ۱۴۰۱ ص. ۵۶-۵۱

مقاله پژوهشی

بررسی تأثیر نوع و غلظت‌های مختلف تنظیم‌کننده‌های رشد بر میزان تولید کالوس در کشت درون شیشه‌ای گیاه گل‌گاو زبان ایرانی *Echium amoenum*

حامد آراستگی مرنی[۱]، دکتر لیلا غفارزاده نمازی[۲*]، حسن ملکی [۳]، رسول‌اصغری‌ذکریا[۴]، شیما بورنگ[۵]

[۱] دانشجوی کارشناسی ارشد، مهندسی باغبانی - گیاهان دارویی، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل، ایران

[۲] استادیار گروه علوم گیاهی و گیاهان دارویی، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل، ایران

[۳] استادیار گروه اصلاح و فیزیولوژی گیاهان زینتی، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل، ایران

[۴] استاد گروه تولید و ژنتیک گیاهی، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل، ایران

[۵] دانشجوی دکتری بیوتکنولوژی، گروه تولید و ژنتیک گیاهی، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل، ایران

[*] (نویسنده مسئول مکاتبات): namazi83@yahoo.com

تاریخ دریافت: آذر ۱۴۰۰ تاریخ پذیرش: خرداد ۱۴۰۱

چکیده

گیاه گل گاو زبان *Echium amoenum* جزء گیاهان ارزشمند از نظر دارویی در طب سنتی و نوین بوده و در درمان بسیاری از بیماری‌ها موثر است. وجود برخی از ترکیبات دارویی ارزشمند در این گیاه باعث شده که مورد توجه بسیاری از دانشمندان در حوزه زیستی و دارویی قرار گیرد. استفاده از روش کشت بافت و سلول گیاهی از جمله، روش استفاده از کشت کالوس و سوسپانسیون سلولی یکی از روش‌های موثر در کشت و افزایش ترکیبات موثره‌ی این گیاه ارزشمند محسوب می‌شود. این پژوهش ایجاد شرایط بهینه، جهت تولید بافت کالوس از ریزنمونه‌های برگ و ساقه بدست آمده از گیاهک‌های حاصل از کشت بذر در شرایط درون شیشه‌ای انجام شد. ریز نمونه‌های برگ و ساقه به دست آمده بر روی محیط کشت MS حاوی غلظت‌های مختلف تنظیم کننده‌های رشد کشت شدند. نتایج نشان داد درصد کالوس‌زایی و وزن تر کالوس بین شاهد (MS فاقد تنظیم‌کننده‌های رشد) و سایر تیمارها اختلاف معنی‌داری مشاهده شد. به‌طوریکه بیشترین ۱۰۰ درصد کالوس‌زایی و بیشترین میزان وزن تر کالوس ۴/۲۳ گرم مربوط به ریزنمونه ساقه کشت شده در محیط MS که حاوی ۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر بنزیل آدنین(BA) و ۱ میلی‌گرم بر لیتر نفتالین استیک اسید (NAA) بود.

کلیدواژه‌ها: کشت بافت، کشت کالوس، بنزیل آدنین، کینتین، نفتالین استیک اسید.

مقدمه

گیاه گل گاو زبان ایرانی *Echium amoenum* عضوی از خانواده *Boraginaceae* می‌باشد. این گیاه خودرو، علفی و یك ساله و چند ساله می‌باشد [۱]. در حال حاضر این گیاه در برخی کشورهای اروپایی، آسیایی و آمریکای شمالی به صورت وحشی در مناطق کوهستانی و غیرقابل کشت پراکنش دارد [۲]. گل گاو زبان ایرانی از جمله گیاهان این خانواده می‌باشد که در برخی از نواحی کشور به خصوص نواحی با شرایط آب و هوایی مرطوب و پر باران مورد کشت قرار می‌گیرد [۱]. این گیاه چندساله و علفی از شاخه‌های تو خالی و آبدار تشکیل شده است. برگ‌های این

گیاه نسبتا بزرگ، دارای چین خوردگی، تخم مرغی شکل نوک تیز و به رنگ سبز تیره هستند که به شکلی متناوب روی ساقه گیاه مستقر شده‌اند. روی تمام سطح گیاه از کرک‌های سفید و منشعب پوشیده شده است. گل‌های قیفی شکل به رنگ قرمز- ارغوانی به طول ۲۵ تا ۴۰ میلی‌متر بوده و در قسمت انتهایی ساقه قرار گرفته‌اند. گل‌ها بصورت دو جنسی و دگرگرده افشان است.

در طب سنتی ایرانی از گل گاو زبان جهت تسکین درد، آرام بخش، معرق و کاهنده فشار خون، جلوگیری از التهاب و سوزش کلیه و مجاری ادراری، روماتیسم، بیماری‌های قلبی، سرما خوردگی، سرفه و غیره مورد استفاده می‌گرفته است [۳]. با توجه به ارزش دارویی بالا و هم‌چنین افزایش روز افزون تقاضای این گیاه، مطالعات وسیعی در زمینه به‌نژادی، افزایش کمی و کیفی محصول و سیستم‌های کاشت این گیاه آغاز شده و نیاز به یک روش سریع و کارآمد جهت تکثیر و افزایش ترکیبات موثر این گیاه دارویی ارزشمند بیش از پیش احساس می‌شود [۴].

از جمله روش‌هایی که برای تکثیرگیاهان می‌توان مورد استفاده قرار داد، ریزازدیادی درون شیشه می‌باشد، که روشی کارآمد و مؤثر برای ازدیاد سریع گیاهان به ویژه گیاهانی که عاری از عوامل بیماری‌زای قارچی، باکتریایی و ویروسی هستند را فراهم می‌کند. ریزازدیادی در مقایسه با سایر روش‌های سنتی تکثیر از کارآیی و نرخ تکثیر بالایی برخوردار است. هم‌چنین، به کمک روش کشت بافت در شرایط درون‌شیشه‌ای می‌توان برای حفاظت ژرم‌پلاسم گیاهی اقدام نمود [۵]. کشت درون شیشه‌ای گیاهان دارویی جهت تولید کالوس یکی از روش‌های بسیار مناسب جهت تولید متابولیت‌های ثانویه به عنوان ترکیبات دارویی یا پیش ترکیب بسیاری از داروهای سنتتیک موجود در بازار مصرف دارویی می‌باشد [۶]. بنابراین، بهینه‌سازی شرایط کشت بافت و سلول باعث افزایش تولید، افزایش کمی و کیفی متابولیت‌های ثانویه و کاهش ترکیبات مضر می‌گردد. کشت در شرایط آزمایشگاهی با ایجاد امکان دستکاری گیاه در سطوح بالاتر مهندسی ژنتیک روند ایجاد گیاهان برتر را بهبود می‌بخشد [۷].

بنابراین با توجه به ارزش دارویی بسیار بالای گیاه گل گاو زبان *E.amoenum* و کمبود گزارشات مربوط به شرایط بهینه جهت تولید کالوس از ریزنمونه‌های گیاهی این گیاه، هدف از این مطالعه تعیین بهترین شرایط از جمله بهترین نوع و غلظت تنظیم کننده‌های رشد گیاهی جهت تولید بافت کالوس این گیاه می‌باشد. بررسی تولید کالوس گیاه *Thevetia neriifolia* نشان دادند که در بین تیمارهای مختلف از ترکیب هورمونی (2,4,D) و بنزیل آدنین (BA) بیشترین رشد کالوس در تیمار هورمونی به غلظت ۱ میلی‌گرم در لیتر 2,4,D و در مدت ۴۵ روز در مقایسه با سایر تیمارها قابل حصول است [۸].

بررسی اثر مهار کننده آنزیم‌های درمانی، فعالیت آنتی‌اکسیدانی و اسید رزماریک در گیاه *E.amoenum* نشان دادند که عصاره متانولی علاوه بر اینکه بیشترین اثر مهار کنندگی آنزیم تیروزیناز را دارد مهار بهتری هم در برابر کولین استرازها نشان می‌دهد. این نتایج نشان داد که عصاره آبی گیاه گل گاو زبان ایرانی می‌تواند به عنوان منبع غنی از آنتی اکسیدان‌ها و مهار کننده آنزیم‌های طبیعی استفاده شود [۹].

تاثیر تنظیم کننده‌های رشد ایندول بوتریک اسید (IBA)، نفتالین استیک اسید (NAA) و 2,4-D بر تولید و رشد کالوس در گونه سرخدار (*Taxus baccata L.*) در شرایط درون شیشه‌ای مورد بررسی قرار گرفت، نتایج پژوهش نشان داد که بهترین روش برای استریل ریزنمونه‌ها استفاده از اتانول ۷۰ در صد (۱ دقیقه) و کلرید جیوه ۰/۲ درصد (۱دقیقه) می‌باشد. بیشترین درصد قهوه‌ای شدن به ریز نمونه‌های جوانه در غلظت ۶ میلی گرم در لیتر از تنظیم کننده رشد نفتالین استیک اسید تعلق داشت. در این مطالعه همچنین گزارش شده است که بشترین وزن‌تر و خشک کالوس به ریز نمونه‌ای ساقه و جوانه تعلق داشت که به ترتیب تحت تیمار هورمون‌های نفتالین استیک اسید و 2,4-D با غلظت ۳ میلی‌گرم در لیتر بودند. علاوه براین نویسندگان گزارش کردند که منحنی‌های رشد کالوس در ریزنمونه‌های مختلف نشان داد که شروع کالوس دهی و رشد آن دارای سرعت نسبتا پایینی است. در صورتی که هدف تولید کالوس از ریز نمونه‌های ساقه و برگ سرخدار باشد، 2,4-D با غلظت ۳ میلی‌گرم در لیتر و برای تولید کالوس از جوانه انتهایی غلظت ۳ میلی‌گرم در لیتر نفتالین استیک اسید و چنانچه تولید گیاهچه از جوانه‌های سرخدار مدنظر باشد غلظت ۰/۳ میلی گرم نفتالین استیک اسید به عنوان پروتکل‌های مناسب، پیشنهاد می‌گردد [۱۰].

در پژوهشی دیگر کالوس‌زایی ریزنمونه‌های گیاه خرفه تحت تاثیر غلظت‌های مختلف هورمونی مورد بررسی قرار گرفت، نتایج حاصل از تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که اثر متقابل هورمون‌ها ونوع ریز نمونه بر صفاتی مانند در صد القای کالوس، وزن‌تر و قطر کالوس در سطح احتمال ۱ درصد معنی‌دار بوده و بهترین نرخ کالوس‌دهی در ریز نمونه برگ با درصد القا کالوس ۱۰۰ درصد، وزن‌تر ۱۲۱ میلی‌گرم و قطر کالوس ۵/۱۰۶ میلی‌متر در ترکیب هورمونی ۲ میلی گرم بر لیتر بنزیل آمینوپورین (BAP) و ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر 2,4-D می‌باشد. ریز نمونه مریستم با ۷۵ درصد کالوس، ۱۰۶ میلی‌گرم وزن‌تر و ۳/۰۳ میلی‌متر قطر کالوس در ترکیب هورمونی ۱ میلی‌گرم بر لیتر از تنظیم کننده بنزیل آمینوپورین و ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر 2,4-D در رده‌بندی قرار گرفت [۱۱].

مواد و روش‌ها

تهیه ماده گیاهی

جهت تولید بافت کالوس از ریزنمونه‌های برگ و ساقه گیاه گل گاو زبان ایرانی *E. amoenum* ابتدا بذرهای گواهی شده از شرکت پاکان بذر اصفهان تهیه شد.

ضدعفونی ریزنمونه‌ها و کشت درون شیشه‌ای

ابتدا بذرها به مدت ۱۸۰ دقیقه در زیر آب جاری شستشو داده شدند، بعد از شستشوی سطحی ریزنمونه‌ها با هیپوکلریت سدیم ۲ درصد به مدت ۱۰ دقیقه ضدعفونی سطحی شدند، بعد از ضدعفونی سطحی ریزنمونه‌ها سه بار با آب استریل هر کدام به مدت ۱۰ دقیقه شستشو شدند. نمونه‌های ضدعفونی شده در زیر حود لامینار در محیط‌کشت MS کشت شدند. بعد از جوانه‌زنی بذر و رشد ساقه، گیاهچه‌ها از محیط‌کشت خارج شده و ساقه گیاه به قطعاتی تقسیم شده و در محیط‌کشت MS حاوی غلظت‌های مختلف تنظیم کننده رشد گیاهی کشت شدند و ریزنمونه‌ها در طول مدت آزمایش در محیط‌کشت حاوی تنظیم کننده‌ها نگهداری شدند. تیمارهای مورد استفاده شامل غلظت ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر از هر کدام کینتین (Kin) و بنزیل آمینوپورین (BAP) بود که به صورت ترکیبی با غلظت‌های مختلف (۲، ۱، ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر) از نفتالین استیک اسید (NAA) و توفور-دی (2,4-D) مورد استفاده قرار گرفتند. تمام کشت‌ها در اتاقک رشد در شرایط تاریکی با دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند و پس از ۳۰ الی ۳۵ روز درصد کالوس‌زایی، میزان وزن کالوس، رنگ و بافت (زبری یا نرمی) کالوس مشاهده و ثبت گردید.

طرح آزمایش و تجزیه آماری

آزمایش در قالب طرح کاملا تصادفی با سه تکرار و حداقل ۳ شیشه‌ی آزمایشی در هر تکرار انجام شد. قبل از انجام تجزیه و تحلیل داده‌ها، تست نرمال بودن توزیع داده‌ها با استفاده از آزمون تک نمونه‌ایی کولموگروف - اسمیرنوف انجام گرفت. تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS ver. 22 انجام گرفت. برای مقایسه میانگین‌ها از آزمون چند دامنه‌ایی دانکن DMRTs در سطح احتمال ۵ درصد استفاده شد.

نتایج

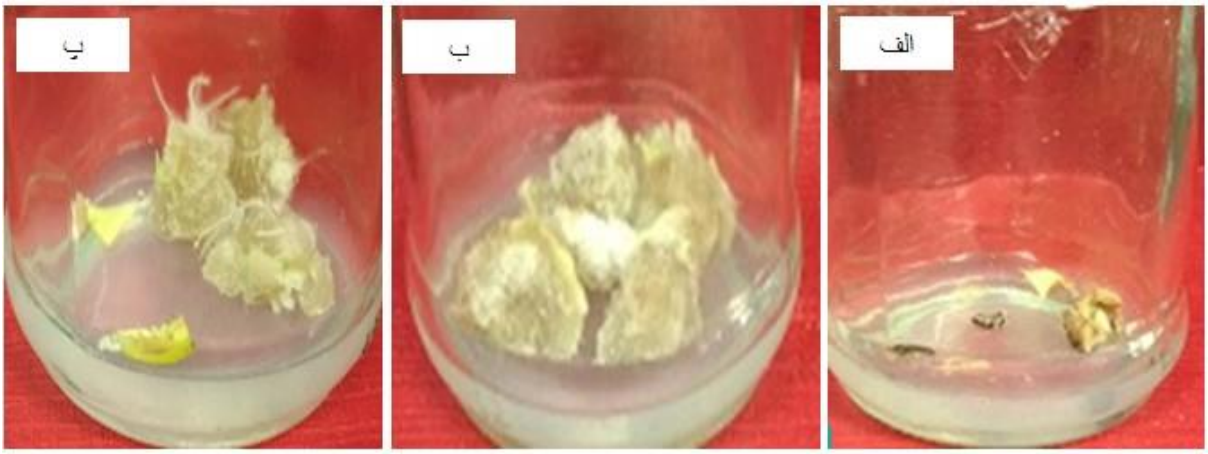
نتایج حاصل از تجزیه داده‌ها نشان داد که درصد کالوس‌زایی و وزن تر کالوس حاصل از ریزنمونه‌های گیاه گل گاو زبان ایرانی به طور معنی‌داری تحت تأثیر نوع ریزنمونه و تیمارهای مختلف تنظیم‌کننده‌های رشد قرار گرفتند (جدول ۱).

طبق نتایج به دست آمده از جدول مقایسه میانگین داده‌ها (جدول۲)، از نظر درصد کالوس‌زایی و وزن تر کالوس بین نوع ریزنمونه مورد استفاده (برگ یا ساقه) و هم‌چنین نوع و غلظت تنظیم کننده رشد گیاهی مورد استفاده اختلاف معنی‌داری مشاهده شد. بطوریکه بیشترین درصد کالوس‌زایی ۱۰۰ درصد و بیشترین میزان وزن تر کالوس به دست آمده ۴/۲۳ گرم مربوط به ریزنمونه ساقه کشت شده بر روی محیط‌کشت MS حاوی ۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر BA و ۱ میلی‌گرم بر لیتر NAA می‌باشد (شکل ۱- ب). این در حالیست که استفاده از ریزنمونه برگ در محیط کشت درصد کالوس‌زایی را به‌طور معنی‌داری از ۱۰۰ به ۹۰ درصد کاهش داد (شکل ۱- پ).

جدول ۱: میانگین مربعات تأثیر نوع ریزنمونه و غلظت‌های مختلف تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی بر درصد کالوس‌زایی و وزن تر کالوس حاصل از کشت گیاه گل گاو زبان در شرایط درون‌شیشه‌ای

منبع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات	
		درصد کالوس‌زایی	وزن تر کالوس
تیمار	۲۵	۱۴۳۴/۹۷**	۲/۵۹**
خطا	۵۲	۲۹/۶۰	۰/۰۹
ضریب تغییرات (%)	-	۱۰/۲۱	۱۹/۴۸

**: معنی‌دار در سطح احتمال ۱%



شکل۱: تولید بافت کالوس از ریزنمونه های گیاه گل گاو زبان؛ الف): محیط کشت MS فاقد تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی (شاهد)؛ ب): ریزنمونه ساقه کشت شده در محیط کشت MS حاوی ۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر BAP به همراه ۱ میلی‌گرم برلیتر NAA؛ پ): ریزنمونه برگ کشت شده در محیط کشت MS حاوی ۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر BAP به همراه ۱ میلی‌گرم برلیتر NAA

لازم به ذکر است که همه تیمارهای هورمونی، درصد کالوس‌زایی از ریزنمونه ساقه را به طور معنی‌داری نسبت به تیمار شاهد (بدون تنظیم کننده رشد) افزایش دادند. به طوریکه بیشترین درصد کالوس‌زایی به ترتیب در محیط کشت حاوی ۱ میلی‌گرم در لیتر نفتالین استیک اسید + ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر بنزیل آمینوپورین (۱۰۰ درصد) به‌دست آمد و کمترین میزان کالوس زایی به ترتیب در تیمار شاهد (۲۳/۳۳ درصد) مشاهده شد.

در ریزنمونه‌های برگی درصد کالوس‌زایی کمتر از ریزنمونه‌های ساقه بود و بیشترین درصد کالوس زایی در تیمار ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر بنزیل آمینوپورین + ۱ میلی‌گرم در لیتر نفتالین استیک اسید (۹۰ درصد) مشاهده شد و کمترین درصد کالوس‌زایی در تیمار شاهد مشاهد شد (جدول ۲).

تیمارهای مورد استفاده وزن تر کالوس را نیز به طور معنی‌داری تحت تاثیر قرار دادند. میانگین وزن تر کالوس در ریزنمونه‌های برگی در تیمار شاهد و تیمار بنزیل آمینوپورین ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر+ نفتالین استیک اسید ۱ میلی‌گرم در لیتر به ترتیب ۰/۵۹ و ۲/۹۲ گرم بود. میانگین وزن تر کالوس در ریزنمونه ساقه به ترتیب در تیمار شاهد حدود ۰/۷۸ گرم بود، در حالیکه در تیمار بنزیل آمینوپورین ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر+ نفتالین استیک اسید ۱ میلی‌گرم در لیتر این عدد ۴/۲۳ گرم بود.

رنگ و بافت کالوس تولید شده نیز در تیمارهای مختلف متفاوت بود و رنگ کالوس شامل قهوه‌ای، سبز، سفید و سفید برفکی بود. از لحاظ بافت هم کالوس تولید شده زبر، نرم و متوسط بافت بودند. در تیمارهایی که درصد کالوس زایی و وزن تر کالوس بیشتر بود معمولا رنگ کالوس سبزتر و بافت آن نیز زبر بود (جدول ۲).

بحث و نتیجه‌گیری

در این پژوهش مشاهد شد که نوع ریزنمونه و ترکیب تنظیم کننده‌های رشد گیاهی بر کالوس‌زایی و رشد کالوس و همچنین رنگ و بافت کالوس تولید شده تاثیرگذار هستند. در اکثر محیط‌های کشت مورد استفاده برای القای کالوس از تنظیم کننده

جدول ۲: تأثیر نوع ریزنمونه و غلظت‌های مختلف تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی بر درصد کالوس‌زایی و وزن تر کالوس حاصل از کشت گیاه گل گاو زبان در شرایط درون‌شیشه‌ای

محیط کشت MS	ریزنمونه برگ	ریزنمونه ساقه	درصد کالوس‌زایی	وزن تر کالوس	رنگ کالوس	بافت کالوس
MS خالی		-	۲۱ ^{l}	۰/۵۹ ^{kl}	سفید	زبر
0.1 BAP + 0.5 NAA		-	۲۵ ^{jkl}	۰/۷۹ ^{jkl}	قهوه‌ای	متوسط
0.1 BAP + 1 NAA		-	۹۰ ^{b}	۲/۹۲ ^{b}	سبز	زبر
0.1 BAP + 2 NAA		-	۶۶/۶۶ ^{ef}	۱/۹۳ $^{d-g}$	قهوه‌ای	متوسط
0.1 BAP + 0.5 2,4-D		-	۳۳/۸۸ ^{ij}	۰/۷۵ ^{jkl}	قهوه‌ای	نرم
0.1 BAP + 1 2,4-D		-	۶۹/۳۳ ^{def}	۲/۲۰ $^{c-f}$	سبز	نرم
0.1 BAP + 2 2,4-D		-	۶۰ ^{f}	۱/۶۸ ^{fgh}	سبز	نرم
0.1 Kin + 0.5 NAA		-	۳۲/۷۷ ^{ijk}	۰/۸۲ ^{jkl}	سبز	متوسط
0.1 Kin + 1 NAA		-	۶۵ ^{ef}	۱/۴۹ ^{ghi}	سفید برفکی	متوسط
0.1 Kin + 2 NAA		-	۴۶/۶۶ ^{gh}	۰/۹۳ ^{jkl}	قهوه‌ای	نرم
0.1 Kin + 0.5 2,4-D		-	۲۳/۳۳ ^{kl}	۰/۳۶ ^{l}	سبز	نرم
0.1 Kin + 1 2,4-D		-	۶۳/۳۳ ^{ef}	۱/۵۷ ^{gh}	سبز	نرم
0.1 Kin + 2 2,4-D		-	۵۰ ^{g}	۱/۲۵ ^{hij}	قهوه‌ای	نرم
MSخالی	-		۲۳/۳۳ ^{hl}	۰/۷۸ ^{jkl}	سفید برفکی	زبر
0.1 BAP + 0.5 NAA	-		۳۱/۱۰ ^{ijk}	۰/۸۸ ^{jkl}	سفید برفکی	متوسط
0.1 BAP + 1 NAA	-		۱۰۰ ^{a}	۴/۲۳ ^{a}	سبز	زبر
0.1 BAP + 2 NAA	-		۷۳/۳۳ ^{cde}	۲/۶۵ ^{bc}	سفید برفکی	نرم
0.1 BAP + 0.5 2,4-D	-		۴۴ ^{gk}	۰/۸۵ ^{jkl}	سبز	نرم
0.1 BAP + 1 2,4-D	-		۸۰ ^{c}	۲/۶۶ ^{bc}	سفید برفکی	نرم
0.1 BAP + 2 2,4-D	-		۷۶/۶۶ ^{cd}	۲/۴۳ ^{bcd}	سبز	متوسط
0.1 Kin + 0.5 NAA	-		۳۹/۳۳ ^{hi}	۰/۸۵ ^{jkl}	سبز	زبر
0.1 Kin + 1 NAA	-		۶۰ ^{f}	۱/۸۴ ^{efg}	سبز	نرم
0.1 Kin + 2 NAA	-		۴۸/۳۳ ^{gh}	۰/۹۹ ^{ijk}	سبز	زبر
0.1 Kin + 0.5 2,4-D	-		۳۲/۷۶ ^{ijk}	۰/۴۹ ^{kl}	سبز	نرم
0.1 Kin + 1 2,4-D	-		۷۰ ^{def}	۲/۲۹ ^{cde}	قهوه‌ای	نرم
0.1 Kin + 2 2,4-D	-		۶۰ ^{f}	۱/۸۸ $^{d-g}$	قهوه‌ای	نرم

* حروف متفاوت در هر ستون نشان دهنده اختلاف آماری معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد آزمون چند دامنه‌ای دانکن (DMRT) است.

رشد اکسین استفاده می‌شود و از بین این ترکیبات نفتالین استیک اسید و تو فور- دی بیشترین کاربرد را دارند. زیاد بودن هورمون اکسین از رشد ریشه جلوگیری می‌کند، لذا کالوس در محل زخم بوجود می‌آید.

در این مطالعه مشاهده شد که ترکیبی از تیمارهای حاوی ترکیبات اکسینی بیشترین تاثیر را در القا و رشد کالوس دارند. البته تیمارهایی که دارای نفتالین استیک اسید بودند، تاثیر بیشتری داشتند. نتایج مطالعات قبلی نیز نشان داده است که نفتالین استیک اسید یک ترکیب موثری در القای کالوس در گیاهان است. در مطالعه‌ای در گیاه زینتی لیزیانتوس گزارش شده است که تیمار نفتالین استیک اسید بیشترین تاثیر را در القای کالوس دارد [۱۲].

گزارش دیگری مبنی بر تاثیر ترکیبات اکسینی بر القای کالوس وجود دارد. برای مثال جین و همکاران (۲۰۰۹) گزارش کردند که ریزنمونه‌های کشت شده در محیط کشت MS حاوی ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر بنزیل آدنین +۰/۰۵ میلی‌گرم در لیتر نفتالین استیک اسید بیشترین تاثیر را در القای کالوس دارند [۱۳]. در مطالعه دیگری گزارش شده است که در محیط کشت LS تریکب تیمار حاوی ۳ میلی‌گرم در لیتر ایندول استیک اسید+ ۳ میلی‌گرم

در لیتر نفتالین استیک اسید و ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر کینتین بیشترین میزان کالوس‌زایی را در گیاه لیزیانتوس داشته است [۱۴].

البته گزارشاتی متفاوت دیگری مبنی بر میزان تاثیر ترکیبات اکسینی کاربردی وجود دارد. گزارش شده است که استفاده از 2,4-D با غلظت ۱ میلی‌گرم بر لیتر تولید کالوس را در ریزنمونه‌های گیاه گل گاو زبان کشت شده در شرایط درون شیشه‌ای را نسبت به محیط کشت حاوی NAA به طور معنی‌داری افزایش می‌دهد [۱۵].

در مطالعه دیگری روی گل گاوزبان نیز گزارش شده است که استفاده از کینتین به همراه نفتالین استیک اسید ترکیبی مناسب جهت تولید شاخساره‌های جدید از کالوس به دست آمده فراهم می‌کند [۲]. به نظر می‌رسد که نوع و گونه گیاهی، وضعیت فیزیولوژیکی گیاه، اندام مورد استفاده به‌عنوان ریزنمونه و همچنین غلظت تنظیم کننده و ترکیب آن‌ها در واکنش بافت‌های گیاهی برای القای کالوس تاثیر گذار هستند. به طوری که در این پژوهش ستفاده از بنزیل آمینوپورین به عنوان سیتوکینین نسبت به کینتین هم در ریزنمونه‌های برگ و هم در ریزنمونه های ساقه مورد استفاده عملکرد بهتری از نظر درصد کالوس‌زایی و وزن تر کالوس داشته است، علاوه‌براین در هر دو ریزنمونه برگ و ساقه، استفاده از نفتالین استیک اسید در غلظت‌های بالاتر به عنوان منبع اکسین خارجی اعمال شده به محیط کشت در بیشتر موارد نسبت به 2,4-D در ترکیب با ترکیبات سیتوکنینی درصد کالوس‌زایی و وزن تر کالوس را به طور معنی‌داری افزایش داده است.

منابع

[1] Debnath S and McRae, K. An efficient adventitious shoot regeneration system on excised leaves of micropropagated lingonberry (*Vaccinium vitis-idaea* L.). J Hort Biotech, 2002; 77: 744_752.

[2] Jin X, Yang, W, Li Y, Kong X, and Peng X, 'Aseptic seeding and establishment of plant-let regeneration system in *Eustoma grandiforum.* North. Hort, 2009; 5: 48-50

[3] Verma N, Koche V, Tiwari K, Mishra S. Plant regeneration through organogenesis and shoot proliferation in *Trichodesma indicum* medicinal herb. Afri J Biotech, 2008; 7: 3632-3637.

[4] Rabiei Z. Setorki M. Effect of hydroalcoholic *Echium amoenum* extract on scopolamine-induced learning and memory impairment in rats. Pharm Biol. 2018; 56(1): 672–677.

[5] Heidargholinezhad F, Moradi H, Karimi M, Akbarpour V. Callus induction in *Portulaca oleracea* L. by different hormone concentrations and explant types. Nova Biol Reperta, 2019; 6(2): 176-183.

[6] Mehrabani M, ShamsArdakani M, Ghannadi A, Ghassemi N, Sajjadi E. Production of Rosmarinic acid in *Echium amoenum* cell culture. Iran J Pharm Res, 2005; 2:111-115.

[7] Ashoori D, Noorhosseini S, Safarzadeh M. Effects of plant density and planting pattern on yield and yield components of Irabian ox-tongue (*Echium amoenum*) in North of Iran J Med Plant Res, 2011; 5; 932-937.

[8] Asree H, Amirah H, Gatea A, Khirallah A. *In vitro* induced callus of (*Tevetia neriifolia*) Juss. Plant Archives, 2019: 19(2): 642-645.

[9] Asghari B, Mafakheri S, Zarrabi M, Erdem S, Orhan I, Bahadori, M. Therapeutic target enzymes inhibitory potential, antioxidant activity, and rosmarinic acid content of *Echium amoenum*. South Afric J Bot, 2019: 120: 191-197.

[10] Razavi Ali, Hosseni S, Rezadust H, Rostami Carati F, The effect of IBA, NAA and 2, 4-D on callus production and growth in common yew (*Taxus baccata* L.) on *in vitro* conditions. J W Forest Sci Tech, 2017: 24.1: 1-16.

[11] Heidargholinezhad F, Moradi H, Karimi M, Akbarpour V. Callus induction in *Portulaca oleracea* L. by different hormone concentrations and explant types. Nova Biol. Reperta. 2019: 6(2):176-183.

[12] Mousavi E, Behbehani M, Haidari E, Miri S, 'Callus induction and plant regeneration in lisianthus (*Eustoma granditlorum*). Trakia J Sci, 2012a; 10(1): 22-25.

[13] Jin X, Yang, W, Li Y, Kong X, Peng X. 'Aseptic seeding and establishment of plant-let regeneration system in *Eustoma grandiforum.* North Hort, 2009; 5: 48-50.

[14] Rezaee F, Ghanati F, Borojeni Y. Micropropagation of Lisianthus (*Eustoma grandiflorum* L.) from different explants to flowering onset. Iran J Plant Physiol, 2012; 3(1): 583-587.

[15] Zare Kh, Khosrowshahli M, Nazemiyeh H, Movafeghi A, MotallebiAzar A, Omidi Y. Callus culture of *Echium italicum* L. towards production of a shikonin derivative. Nat Prod Res. 2010; 13:1-8.

Journal of Developmental Biology
Vol. 14, No. 4, Autumn 2022

Evaluation of the effect of different types and concentrations of growth regulators on callus production in *in vitro* cultivation of *Echium amoenum*

Arastegi H.[1], Ghaffarzadeh Namazi L.[2*], Maleki H.[3], Asghari-Zakaria , R.[4], Burang Sh.[5]

[1] MSc. student of Horticultural Engineering-Medicinal Plants, Department of Agronomy and Plant Breeding, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, Iran.
[2] Corresponding author, Assistant Professor, Department of Plant Sciences and Medicinal Plants, Faculty of Agriculture, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, Iran.
[3] Assistant Professor, Horticulture - Physiology and breeding of flowers and ornamental plants, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, Iran.
[4] Professor, Department of Plant Production Engineering and Genetics Department, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, Iran.
[5] PhD student of Agricultural Biotechnology, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, Iran

* (Corresponding author): Namazi83@yahoo.com

Received: November 2021 Accepted: June 2022

Abstract

Echium amoenum is one of the most valuable medicinal plants in traditional and modern medicine and is effective in treating many diseases. The presence of some valuable medicinal compounds in this plant has attracted the attention of many scientists in the field of biology and medicine. The utilization of plant tissue and cell culture methods, including callus culture and cell suspension, is one of the effective methods in culture and can increase the effective compounds of this valuable plant. In this study, we investigated the optimal conditions for the production of callus tissue from leaf and stem explants obtained from seedlings grown from seed culture. According to the results, significant difference was observed between control samples (MS free culture) and other treatments in terms of callus formation percentage and callus fresh weight. The highest percentage of callus formation 100% and the highest fresh weight of callus 4.23 gr were related to stem explants grown on MS medium containing 0.1 mg /l BAP and 1 mg /l NAA..

Keywords: Tissue culture, Callus culture, BAP, Echium *amoenum*, NAA.