فصلنامه (علمی – پژوهشی)

زیست شناسی تکوینی

سال چهاردهم، شماره ۱، زمستان ۱۴۰۰ ص. ۶۶-۵۵

مقاله پژوهشی

برهمکنش بین تیمارهای هورمونی و نوع جداکشت بر کالوس‌زایی و رنگدانه‌های فتوسنتزی در گیاه کاسنی (.Cichorium intybus L)

مهین قائمی[۱]، زهرا زارع[۲*]، فریبا عقیلی[۳]

[۱] استادیار گروه زیست شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد گرگان، گرگان، ایران.

[۲] استادیار گروه زیست شناسی، دانشگاه فرهنگیان، تهران، ایران.

[۳] کارشناس ارشد زیست شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد گرگان، گرگان، ایران.

[*] (نویسنده مسئول مکاتبات): zahrazarebio@gmail.com

تاریخ دریافت: مرداد ۱۴۰۰ تاریخ پذیرش: دی ۱۴۰۰

چکیده

گیاه کاسنی (*Cichorium intybus* L) از گیاهان دارویی مهم و دارای متابولیت های ثانویه با ارزش است. کالوس کاسنی منبع خوبی برای تولید و استخراج متابولیت‌های این گیاه است. در این پژوهش تغییرات کالوس کاسنی از لحاظ برخی خصوصیات مورفولوژیکی و بیوشیمیایی جهت بدست آوردن بهترین تیمار هورمونی مورد بررسی قرارگرفت. از بذرهای استریل کاسنی گیاهچه‌های سالم در محیط کشت (۱/۲MS) به دست آمد و از گیاهچه‌های حاصله ریزنمونه‌های ساقه، برگ و ریشه تهیه شد و جهت کالوس زایی در محیط‌های کشت MS مایع و هورمون‌های 2,4-D ، BAP و Kin در غلظت‌های ۰/۵، ۰/۷۵ و ۱ میلی گرم بر لیتر کشت شدند. نتایج نشان داد که رنگ کالوس در جداکشت‌ها با تیمارهای هورمونی متفاوت از زرد تا سبز و قهوای تیره و بافت کالوس‌ها نیز از سست و نرم تا سفت تفاوت نشان دادند. بیشترین میزان درصد کالوس (۷۶/۲۲ درصد) مربوط به اندام برگ با تیمار هورمونی 2,4-D (0.5mg/L) بیشترین میزان وزن تر کالوس (۷/۳۰ گرم) و وزن خشک کالوس (۰/۰۷۷ گرم) مربوط به اندام برگ با تیمار هورمونی Kin (0.75 mg/L)، بیشترین میزان کلروفیل a ، b و کل مربوط به جداکشت برگ با تیمار هورمونی BAP (0.75mg/L) مشاهده شد. بیشترین میزان کاروتنوئید نیز مربوط به جداکشت ریشه با تیمار هورمونی Kin (1mg/L) بود. به طور کلی اثرات متقابل هورمون‌ها و ریزنمونه صفات مختلف کالوس‌زایی را تحت تاثیر قرار می‌دهد و میزان این تاثیر به نوع جداکشت و غلظت تنظیم کننده‌های رشد بستگی دارد و بیشترین میزان تاثیرات در جدا کشت برگ مشاهده شد..

کلیدواژه‌ها: *Cichorium intybus* L، کالوس، کاسنی، هورمون های گیاهی.

مقدمه

کاسنی گیاهی دارویی با نام علمی *Cichorium intybus L.* متعلق به تیره (Asteraceae) و بومی نواحی مدیترانه‌ای است. این گیاه به عنوان محلول خانگی برای بیماری‌های مختلف از زمان‌های قدیم استفاده می‌شود؛ همچنین در سیستم پزشکی بومی برای درمان بیماری‌های مختلف کاربرد دارد و دارای

خواص دارویی مختلفی مانند آنتی‌اکسیدان، ضدمیکروبی، ضددیابتی، ضدالتهابی، پری بیوتیکی، محافظت قلبی و تقویت کننده سیستم ایمنی است [۱].

ترکیبات گیاهی گزارش شده از بخش‌های مختلف کاسنی عبارتند از ترکیبات شیمیایی متنوعی از قبیل ساکارز، پروتئین‌ها، مشتقات اسیدکافئیک، فلاونوئیدها، پلی‌فنول‌ها، کاروتنوئیدها، آنتوسیانین‌ها، تانن‌ها، کومارین‌ها، لاکتون‌های سسکویترپن، اسیدهای چرب، پکتین، کولین‌ها، بنزو-ایزوکرومن‌ها، آلکالوئیدها، ویتامین‌ها، آمینوها و مواد معدنی [۱و۲و۳].

مطالعات متعددی در کشور در زمینه کشت‌های درون شیشه‌ای و نقش تنظیم کننده‌های مختلف رشد اکسین و سیتوکینین در القا و بهینه‌سازی کالوس در گیاه کاسنی انجام گرفته است که به برخی از آنها می‌توان اشاره کرد:

Hadizadeh, et al (2016) تاثیر انواع اکسین را بر القای رشد ریشه‌های نابجا و ریشه‌های مویین در کشت بافت مایع گیاه کاسنی مورد بررسی قرار دادند و استفاده از هورمون‌ها را برای القای ریشه‌های مویین در این گیاه که از قابلیت سنتز و تجمع متابولیت‌های ثانویه برخوردارند، پیشنهاد کردند [۴].

Koohsari, et al (2020) اثر غلظت های مختلف تنظیم کننده‌های رشد بنزیل آدنین (BA) و اسید نفتالین استیک (NAA) و نوع ریزنمونه (دمبرگ، ساقه و برگ) را بر کالوس‌زایی و میزان تولید فنل و فلاونوئید مورد بررسی قرار دادند و نتیجه گرفتند که دمبرگ بهترین ریزنمونه برای تولید کالوس در ترکیب با تیمارهای ۲ میلیگرم بر لیتر BA و ۱ میلیگرم بر لیتر NAA و یا محیط حاوی ۰/۵ میلیگرم بر لیتر BA و بدون NAA بود. افزون بر این، تیمارهای فوق، بیشترین میزان فنل و فلاونوئید را تولید نمودند که دارای بیشترین فعالیت آنتی‌اکسیدانی بودند [۲].

با توجه به مطالب مطرح شده هدف از این پژوهش، کالوس-زایی جداکشت‌های مختلف گیاه کاسنی(ریشه، ساقه و برگ) تحت شرایط تیمار هورمونی متفاوت(2,4-D، BAP و Kin) است. در این پژوهش تغییرات کالوس کاسنی از لحاظ برخی خصوصیات ظاهری و بیوشیمیایی جهت بدست آوردن بهترین تیمار هورمونی مورد بررسی قرارگرفت.

مواد و روش‌ها

تهیه بذر و ضدعفونی

بذور گیاه کاسنی (*Cichorium intubys* L.) از شرکت پاکان بذر اصفهان تهیه شد. ابتدا جهت ضدعفونی به وسیله مایع ظرفشویی شستشو شدند، بعد از آبکشی به مدت ۱۰ ثانیه در اتانول ۷۰ درصد قرار گرفتند و بعد از آبکشی مجدد با آب مقطر استریل، در هیپوکلریت سدیم و آب (۱:۵) به مدت ۲۰ دقیقه غوطه‌ور شدند و سه مرتبه با آب مقطر استریل در شرایط استریل زیر هود لامینار کاملاً شستشو شدند [۲].

تهیه گیاهچه استریل کاسنی

بذور به پتری‌دیش‌های حاوی کاغذصافی مرطوب شده زیر هود لامینار در شرایط استریل منتقل گردیدند. پتری‌دیش‌ها با نوار پارافیلم کاملاً ایزوله شدند و به اتاقک کشت با دمای ۲۳±۲° انتقال داده شدند، بذور جوانه زده و عاری از بیماری به‌وسیله پنس و اسکالپل در شرایط استریل و زیر هود لامینار از پوشش خود جدا شدند و در محیط کشت معادل نصف غلظت موراشیگ و اسکوگ(1/2MS) همراه با 8 gr/L آگار، 30 gr/L ساکارز کشت گردیدند. از گیاهچه‌های سالم و با بنیه مناسب به عنوان ماده‌ی اولیه برای تهیه ریزنمونه‌ها استفاده شد [۵].

تهیه ریزنمونه کاسنی و کالوس زایی

پس از بدست آوردن گیاهچه‌های کاسنی، ریزنمونه‌های برگ، ساقه و ریشه توسط اسکالپل تقریباً در اندازه‌های یکسان ($1.5 \times 1\ cm$) تهیه شدند و در محیط‌های کشت مایع با تیمارهای هورمونی 2,4-D با غلظت‌های (0,0.5,0.75,1 mg/L)، BAP (0,0.5,0.75,1 mg/L) و Kin (0,0.5,0.75,1 mg/L) جهت کالوس‌زایی قرار داده شدند. جهت هوادهی بهتر ریزنمونه‌های غوطه ور در محیط کشت مایع، ظروف حاوی نمونه ها در دستگاه بهمزن دوار قرار داده شد[۲].

تهیه محیط‌های کشت MS مایع

برای تهیه محیط کشت MS مایع، مقادیر لازم از محلول‌های ذخیره با یکدیگر مخلوط گشته و محیط کشت پایه تهیه گردید. سپس از محلول پایه هورمون 2,4-D با غلظت‌های (0,0.5,0.75,1 mg/L)، BAP (0,0.5,0.75,1 mg/L) و

Kin (0,0.5,0.75,1 mg/L) به محیط‌ها اضافه گردید. pH محیط باید در محدوده مشخص متمایل به اسیدی باشد. لذا با استفاده از NaOH یا pH(0.1 N) HCl محیط‌های کشت در محدوده‌ی ۵/۸-۵/۷ تنظیم گردید. به منظور حل شدن کامل مواد در محیط کشت از همزن هیتردار استفاده شد. محلول تهیه شده در ظروف شیشه‌ای متناسب توزیع و درب آن‌ها با فویل آلومینیومی پوشانده شد. سپس ظروف حاوی محیط کشت در اتوکلاو با دمای $121^{\circ}C$ و فشار 1 atm به مدت 15 min استریل شدند[۲].

اندازه گیری صفات مورد مطالعه

کالوس‌ها در طی دوره‌ی رشد از نظر برخی صفات مورفولوژیکی مانندرنگ کالوس، ساختار و شکل کالوس، وزن تر و خشک و نیز برخی خصوصیات بیوشیمیایی مانند میزان کلروفیل‌ها و کاروتنوئید مورد ارزیابی قرار گرفتند.

اندازه‌گیری وزن تر و خشک کالوس

برای سنجش وزن تر از ترازوی دیجیتالی استفاده شد و برای اندازه‌گیری وزن خشک تمام تیمارهای مورد نظر در آون با دمای $70^{\circ}C$ به مدت 72ساعت قرارداده شد سپس وزن خشک آن‌ها توسط ترازوی دیجیتالی اندازه‌گیری گردید.

اندازه‌گیری کلروفیل و کارتنوئید

برای این منظور 0.150 gr کالوس تر و نکوبیده از هر نمونه توزین گردید، و 1.5 ml دی متیل سولفوکسید (DMSO) اضافه شد و به مدت سه ساعت در آون $80^{\circ}C$ قرار گرفت؛ سپس از نمونه حاصل 250 μl برداشته و 2 ml دی متیل سولفوکسید DMSO به آن افزوده شد؛ از DMSOبه عنوان بلانک استفاده شد. نمونه‌ها به وسیله دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج‌های 510,480,663,645 nm جهت اندازه‌گیری کلروفیل‌ها و کاروتنوئید قرائت شد و اعداد بدست آمده در رابطه‌های زیر قرار داده شد [۷,۶].

$$C_{chl.a}\left(\frac{mg}{g.f.w}\right) = 12.7(A_{663}) - 2.69(A_{645}) * \frac{v}{1000w}$$

$$C_{chl.b}\left(\frac{mg}{g.f.w}\right) = 22.9(A_{645}) - 4.68(A_{663}) * \frac{v}{1000w}$$

$$C_{chl.ab}\left(\frac{mg}{g.f.w}\right) = 20.2(A_{645}) - 8.02(A_{663}) * \frac{v}{1000w}$$

$$C_{car.}\left(\frac{mg}{g.f.w}\right) = 7.6(A_{480}) - 8.02(A_{510}) * \frac{v}{1000w}$$

در رابطه‌های فوق به ترتیب($C_{chl.a}$)، ($C_{chl.b}$) و ($C_{chl.ab}$) غلظت‌های کلروفیل‌های a ، b و کلروفیل‌کل ؛ ($C_{car.}$) غلظت کاروتنوئید ؛ A جذب نوری نمونه ها ؛ v برابر با حجم عصاره صاف شده و W برابر با وزن نمونه است و با جایگزینی اعداد قرائت شده توسط دستگاه اسپکتروفتومتر میزان هر یک از موارد ذکر شده، بدست آمد.

تجزیه و تحلیل داده‌ها

آزمایش به صورت فاکتوریل بین تیمارهای مختلف هورمونی و جداکشت بر پایه طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار صورت گرفت. مقایسه میانگین با آزمون دانکن در سطح احتمال ۵ درصد تعیین شد. آنالیز آماری با استفاده از نرم افزار SPSS و رسم نمودارها با استفاده ازExcel انجام شد.

نتایج

نتایج اثر تیمارهای هورمونی و جداکشت‌های مختلف بر برخی ویژگی‌های کیفی و کمی کالوس

الف- ویژگی‌های کیفی کالوس‌های تولید شده

ویژگی‌های کیفی مورد بررسی شامل رنگ کالوس و بافت کالوس است که نتایج آن‌ها در اشکال (۱ تا ۳) و جدول ۱ آمده است.

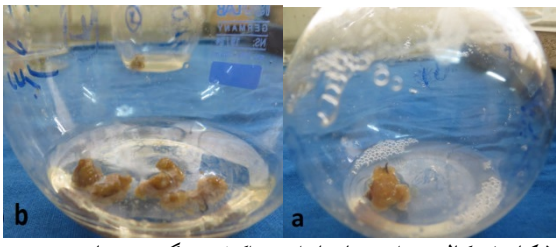
- رنگ کالوس

نتایج نشان داد رنگ کالوس در جداکشت های ساقه، برگ و ریشه با تیمار هورمونی 2,4-Dاغلب قهوه‌ای تا قهوه‌ای پررنگ و در جداکشت های ساقه، برگ و ریشه با تیمارهای هورمونی

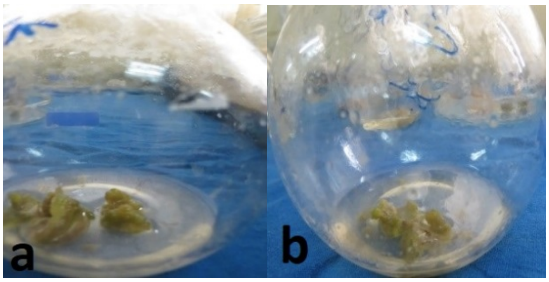
BAPو Kin به رنگ زرد مایل به سبز تا سبز روشن مشاهده شد(شکل ۱تا۳).

- بافت کالوس

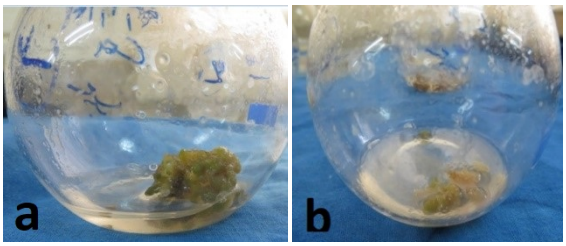
مقایسه‌ی نتایج نشان داد، که بافت کالوس در جداکشت‌های ساقه و برگ با تیمار هورمونی 2,4-D، نرم و در جداکشت ریشه نرم تا سست و بی شکل بود (شکل ۱). همچنین نتایج نشان داد که بافت کالوس در جدا کشت‌های ساقه و برگ با تیمار هورمونی BAP نرم تا سفت و در جداکشت ریشه نرم و سست مشاهده شد (شکل۲) و در تیمار Kin بافت کالوس در جدا کشت‌های ساقه و برگ، سفت و در جدا کشت ریشه نرم و سست و بی‌شکل مشاهده شد(شکل ۳).



شکل ۱ - کالوس‌زایی حاصل از جداکشت برگ در تیمار هورمونی 2,4-D (0.5mg/L) با ویژگی‌های کالوس قهوه‌ای روشن متمایل به سبز و بافت نرم(a) و کالوس‌زایی حاصل از جداکشت ریشه در تیمار هورمونی 2,4-D (0.75mg/L) با ویژگی های کالوس قهوه ای روشن و بافت نرم(b)



شکل ۲ - کالوس‌زایی حاصل از جداکشت ساقه در تیمار هورمونی BAP (0.5mg/L) با ویژگی‌های کالوس سبز رنگ و بافت نرم(a) و کالوس‌زایی حاصل از جداکشت ریشه در تیمار هورمونی BAP (0.75mg/L) با ویژگی‌های کالوس زرد مایل به سبز رنگ و بافت سفت (b)



شکل ۳- کالوس‌زایی حاصل از جداکشت برگ در تیمار هورمونی Kin (0.5mg/L) با ویژگی های کالوس زرد متمایل به سبز و بافت سفت (a) و کالوس‌زایی حاصل از جداکشت ریشه در تیمار هورمونی Kin (0.75mg/L) با ویژگی‌های کالوس زرد مایل به سبز رنگ و بافت نرم (b)

همچنین گزارش نتایج کالوس زایی جداکشت‌های ساقه، برگ و ریشه به تفکیک هورمون‌های مورد استفاده و در غلظت‌های مختلف در جدول ۱ آمده است:

ب- ویژگی‌های کمی

ویژگی‌های کمی مورد بررسی شامل اثرات سطوح مختلف هورمون‌های رشد و نوع جداکشت بر میزان کالوس‌دهی، وزن تر و خشک کالوس و محتوای رنگدانه‌های فتوسنتزی است که نتایج آن در جدول ۲ و نمودارهای ۱ تا ۷ آمده است.

نتایج تجزیه واریانس (جدول ۲)، نشان داد که بین تیمارهای هورمونی و جداکشت‌های مختلف مورد بررسی اثر معنی‌داری بر میزان درصد کالوس‌دهی، وزن تر و وزن خشک کالوس وجود داشت، به طوری که تاثیر سطوح مختلف تیمار و جدا کشت و اثرات متقابل آن‌ها بر میزان درصد کالوس‌دهی، وزن تر و خشک کالوس در سطح احتمال پنج درصد معنی‌دار بود.

مطالعه اثر متقابل تیمارهای هورمونی مختلف و نوع جداکشت بر میزان کالوس‌دهی، وزن تر و خشک کالوس

نتایج مقایسه میانگین‌های اثر متقابل تیمارهای هورمونی مختلف و نوع جداکشت نشان داد، بیشترین میزان درصد کالوس (۷۶/۲۲ درصد) مربوط به اثرات متقابل جداکشت برگ با تیمار هورمونی 2,4-D (0.5mg/L) و کمترین میزان آن (۱/۲۰ درصد) مربوط به جداکشت‌های ساقه، برگ و ریشه با تیمار هورمونی شاهد بود (نمودار ۱).

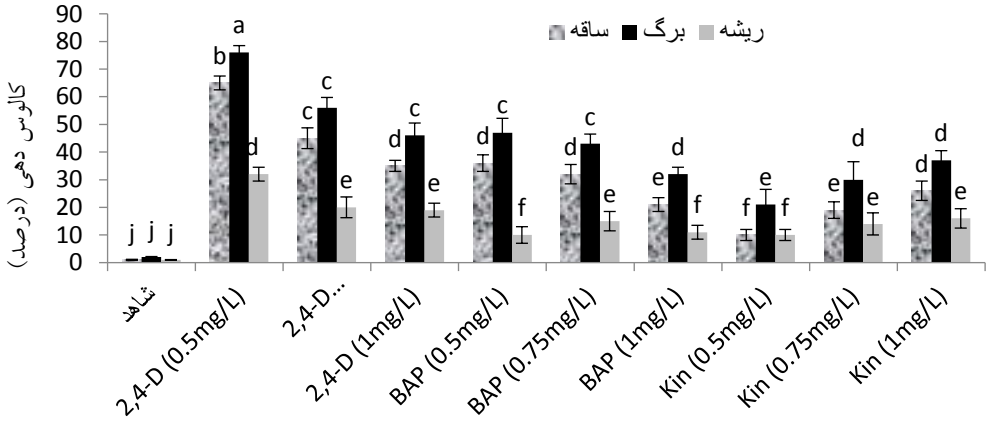
جدول ۱ - واکنش تیمارهای مختلف هورمونی و جداکشت روی برخی از خصوصیات کالوس

جدا کشت	تیمارها	رنگ کالوس	بافت کالوس
ساقه	شاهد	زرد متمایل به قهوه ای	خیلی نرم
ساقه	2,4-D (0.5mg/L)	قهوه‌ای کمرنگ	نرم
ساقه	2,4-D (0.75mg/L)	قهوه‌ای کمرنگ	نرم
ساقه	2,4-D (1mg/L)	قهوه‌ای پررنگ	نرم
ساقه	BAP (0.5mg/L)	سبز روشن	نرم
ساقه	BAP (0.75mg/L)	زرد متمایل سبز روشن	سفت
ساقه	BAP (1mg/L)	زرد متمایل به سبز روشن	سفت
ساقه	Kin (0.5mg/L)	سفید متمایل به زرد	سفت
ساقه	Kin (0.75mg/L)	زرد متمایل به سبز	سفت
ساقه	Kin (1mg/L)	زرد	سفت
برگ	شاهد	زرد متمایل به قهوه ای	خیلی نرم
برگ	2,4-D (0.5mg/L)	قهوه‌ای کمرنگ متمایل به سبز	نرم
برگ	2,4-D (0.75mg/L)	قهوه‌ای کمرنگ	نرم
برگ	2,4-D (1mg/L)	قهوه‌ای پررنگ	نرم
برگ	BAP (0.5mg/L)	سبز روشن	نرم
برگ	BAP (0.75mg/L)	سبز روشن	سفت
برگ	BAP (1mg/L)	سبز روشن	سفت
برگ	Kin (0.5mg/L)	سفید متمایل به زرد	سفت
برگ	Kin (0.75mg/L)	زرد متمایل به سبز	سفت
برگ	Kin (1mg/L)	زرد	سفت
ریشه	شاهد	زرد متمایل به قهوه ای	خیلی نرم
ریشه	2,4-D (0.5mg/L)	قهوه‌ای کمرنگ متمایل به سبز	نرم و سست و بی شکل
ریشه	2,4-D (0.75mg/L)	قهوه‌ای کمرنگ	نرم و سست و بی شکل
ریشه	2,4-D (1mg/L)	قهوه‌ای پررنگ	نرم و سست و بی شکل
ریشه	BAP (0.5mg/L)	زرد متمایل سبز روشن	نرم و سست
ریشه	BAP (0.75mg/L)	زرد متمایل سبز روشن	سفت
ریشه	BAP (1mg/L)	زرد متمایل به سبز روشن	سفت
ریشه	Kin (0.5mg/L)	سفید متمایل به زرد	نرم و سست و بی شکل
ریشه	Kin (0.75mg/L)	زرد متمایل به سبز	نرم و سست و بی شکل
ریشه	Kin (1mg/L)	زرد	نرم و سست و بی شکل

جدول ۲- تجزیه واریانس درصد کالوس‌دهی و وزن کالوس تحت تاثیر تیمارهای مختلف هورمون و اندام

منابع تغییرات	درجه آزادی (DF)	کالوس دهی	وزن تر کالوس	وزن خشک کالوس
تیمار	۹	۷۸/۹۲*	۵/۰۳*	۰/۸۵*
اندام	۲	۵۶/۸۷*	۴/۷۸*	۰/۴۲*
تیمار * اندام	۱۸	۴۵/۳۲*	۳/۸۷*	۰/۶۷*
خطا	۳۰	۲۲/۹۸	۴۱/۹۲	۲۳/۵۵
درصد ضریب تغییرات		۹/۷۸	۴/۸۸	۴/۷۵

* اختلاف معنی‌دار در سطح ۵%



نمودار ۱ - مقایسه میانگین‌های مربوط به اثرات متقابل تیمارهای هورمونی و جداکشت بر میزان کالوس‌دهی

و در ارتباط با وزن تر کالوس، نتایج مقایسه میانگین‌های اثرات متقابل تیمارهای هورمونی و جداکشت نشان داد، که بیشترین میزان وزن تر کالوس (7.30 gr) مربوط به اثرات متقابل جداکشت برگ با تیمار هورمونی کینتین (0.75 mg/L) بود که البته از لحاظ آماری با جداکشت برگ و تیمار هورمونی کینتین (1mg/L) اختلاف معنی‌داری نداشت و کمترین میزان آن (0. 2 gr) مربوط به جداکشت ریشه با تیمار هورمونی شاهد بود که البته از لحاظ آماری با جداکشت‌های ساقه و برگ با تیمارهای هورمونی شاهد اختلاف معنی داری نداشت (نمودار ۲).

همچنین نتایج مقایسه میانگین‌های اثرات متقابل نشان داد که بیشترین میزان وزن خشک کالوس (0.077 gr) مربوط به جداکشت برگ با تیمار هورمونی کینتین (0.75 mg/L) بود که البته از لحاظ آماری با جداکشت برگ و تیمار هورمونی کینتین (1mg/L)، کینتین(0.5mg/L) و 2,4-D (0.5mg/L) اختلاف معنی‌داری نداشت (نمودار ۳) و کمترین میزان آن (0.005 gr) مربوط به جداکشت ریشه با تیمار هورمونی شاهد بود که البته از لحاظ آماری با جداکشت‌های ساقه و برگ با تیمارهای هورمونی شاهد اختلاف معنی داری نداشت.

نتایج اثر سطوح مختلف هورمون‌های رشد و نوع جداکشت بر میزان رنگیزه‌های فتوسنتزی

نتایج تجزیه واریانس (جدول ۳)، نشان داد که بین تیمارها و جداکشت‌های مختلف مورد بررسی اثر معنی‌داری بر میزان کلروفیلa، b، کلروفیل کل و کاروتنوئید داشت، به طوری که تاثیر سطوح مختلف تیمار هورمونی و جداکشت و اثرات متقابل آن‌ها بر میزان کلروفیلa، b، کل و کاروتنوئید در سطح احتمال ۵ درصد معنی‌دار بود.

نتایج اثر متقابل تیمارهای هورمونی و جداکشت‌های مختلف بر میزان کلروفیل و کاروتنوئید

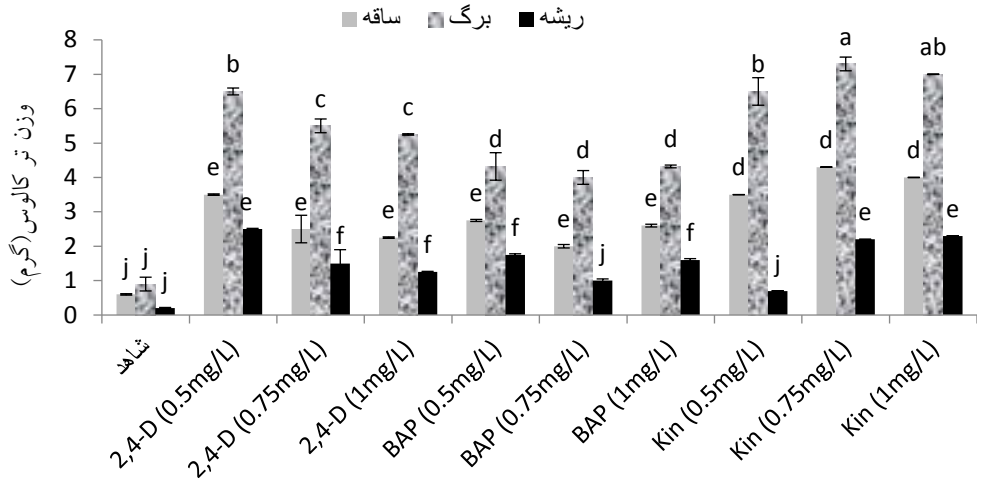
الف- میزان کلروفیل a، b و کل

نتایج اثرات متقابل مقایسه میانگین‌ها نشان داد(نمودار۴)، بیشترین میزان کلروفیل a 0.739 میلی‌گرم بر گرم وزن تر کالوس مربوط به اثرات متقابل جداکشت برگ با تیمار هورمونی BAP (0.75mg/L) بود. کمترین میزان آن 0.482 میلی‌گرم بر گرم وزن تر کالوس مربوط به اثرات متقابل جداکشت ریشه با تیمار هورمونی 2,4-D(0/5 mg/L) بود.

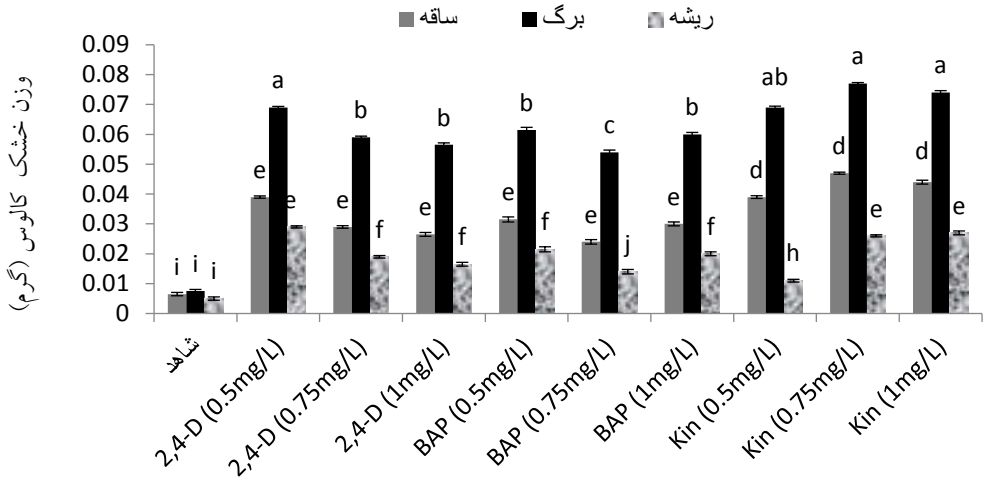
همچنین نتایج مقایسه میانگین‌های اثرات متقابل نشان داد، بیشترین میزان کلروفیل b به میزان 1.063 میلی‌گرم بر گرم وزن تر کالوس مربوط به اثرات متقابل جداکشت برگ با تیمار هورمونی(0.75mg/L) BAP بود و کمترین میزان آن 0.324 میلی‌گرم بر گرم وزن تر کالوس مربوط به اثرات متقابل جداکشت ریشه با شاهد بود (نمودار۵).

همچنین نتایج مقایسه میانگین‌های اثرات متقابل نشان داد که بیشترین میزان کلروفیل کل 1.802 میلی‌گرم بر گرم وزن تر کالوس مربوط به اثرات متقابل جداکشت برگ با تیمار هورمونی BAP (0.75mg/L) بود که البته از لحاظ آماری با تیمار اثرات متقابل جداکشت برگ با تیمار هورمونی BAP (1mg/L)

اختلاف معنی‌داری نداشت (نمودار ۶). همچنین کمترین میزان آن 0.842 میلی‌گرم بر گرم وزن تر کالوس مربوط به اثرات متقابل جداکشت ریشه با تیمار هورمونی (4-D(0/5 mg/L, بود.



نمودار ۲- مقایسه میانگین‌های مربوط به اثرات متقابل تیمارهای هورمونی و جداکشت بر میزان وزن تر کالوس

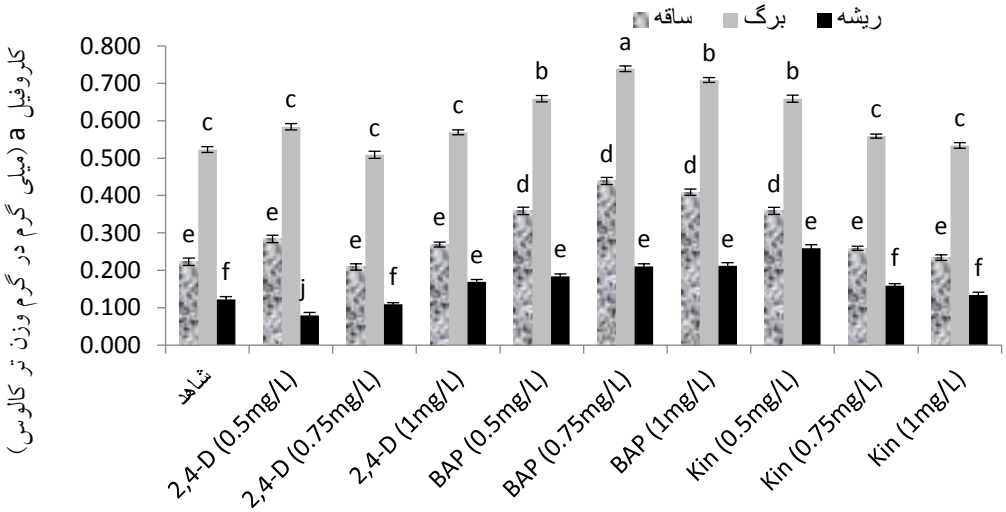


نمودار ۳- مقایسه میانگین‌های مربوط به اثرات متقابل تیمارهای هورمونی و جداکشت روی میزان وزن خشک کالوس

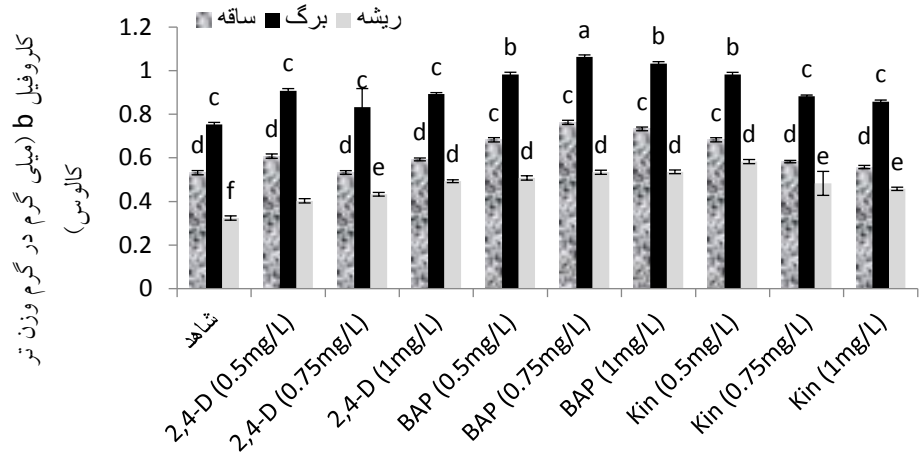
جدول ۳- تجزیه واریانس میزان کلروفیل و کاروتنوئید تحت تاثیر تیمارهای مختلف هورمون و اندام

منابع تغییرات	درجه آزادی (DF)	کلروفیل a	کلروفیل b	کلروفیل کل	کاروتنوئید
تیمار	۹	۴/۶۶*	۳/۵۳*	۵/۷۷*	۱/۲۵*
اندام	۲	۲/۵۵*	۲/۲۳*	۴/۶۶*	۱/۱۵*
تیمار * اندام	۱۸	۲/۹۸*	۱/۲۳*	۲/۵۲*	۰/۷۹*
خطا	۳۰	۱۵/۹۸۵	۶/۸۷	۲/۷۴	۱۶/۳۲۵
درصد ضریب تغییرات		۶/۶۳	۸/۵۵	۱/۷۴	۴/۹۸

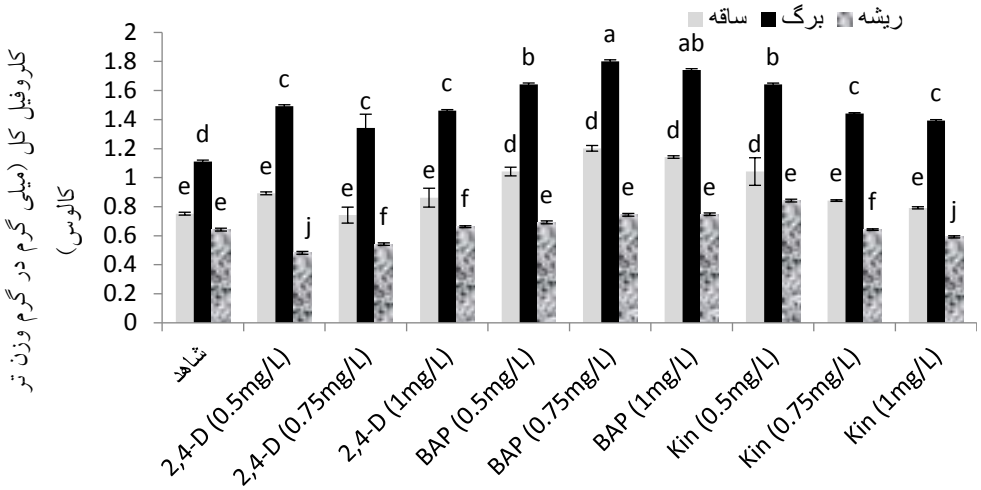
* اختلاف معنی‌دار در سطح ۵%



نمودار ۴- مقایسه میانگین‌های مربوط به اثرات متقابل تیمارهای هورمونی و جداکشت بر میزان کلروفیل a



نمودار ۵ - مقایسه میانگین‌های مربوط به اثرات متقابل تیمارهای هورمونی و جداکشت بر میزان کلروفیل b



نمودار ۶- مقایسه میانگین‌های مربوط به اثرات متقابل تیمارهای هورمونی و جداکشت بر میزان کلروفیل کل

ب- کاروتنوئید

نتایج مقایسه میانگین‌های اثرات متقابل تیمارهای هورمونی و جداکشت نشان داد، بیشترین میزان کاروتنوئید 0.546 میلی گرم بر گرم وزن تر کالوس مربوط به اثرات متقابل جداکشت ریشه با تیمار هورمونی کینتین (1mg/L) بود. کمترین میزان آن 0.026 میلی گرم بر گرم وزن تر کالوس مربوط به اثرات متقابل جداکشت ساقه با تیمار هورمونی شاهد بود (نمودار ۷).

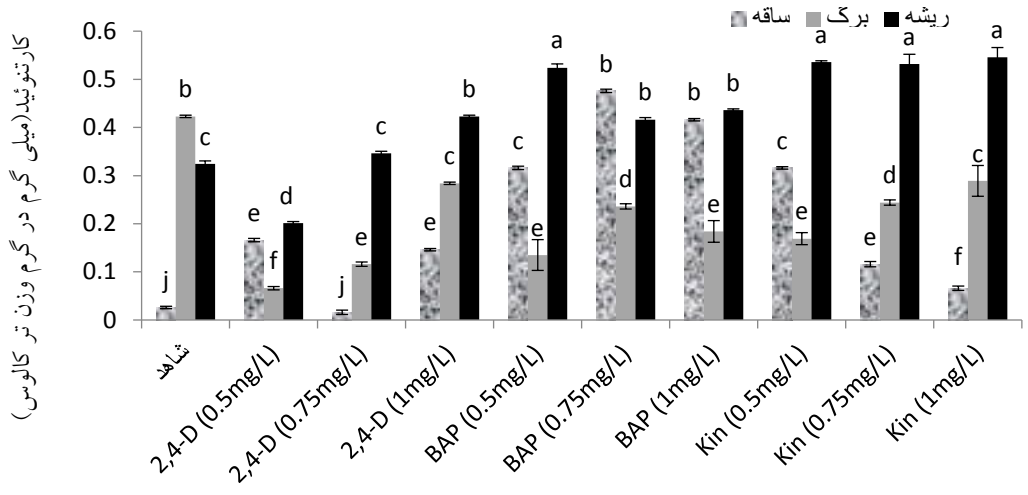
بحث

نتایج حاصل از این پژوهش نشان داد که القای کالوس حاصل از جداکشت‌های اندام‌های مختلف گیاه کاسنی در محیط‌کشت MS ۱/۲ مایع با تیمارهای هورمونی متفاوت، موفقیت‌آمیز بود و با مقایسه اثرمتقابل هورمون‌های رشد و نوع جداکشت به طور کلی نشان داد که صفات مختلف کالوس‌زایی مانند درصد القای کالوس،وزن تر کالوس، وزن خشک کالوس، میزان کلروفیل و کاروتنوئید هر جداکشت به ترکیب، نسبت و غلظت هورمون‌های رشد پاسخ متفاوتی نشان می‌دهند، که این نتایج با نتایج برخی پژوهشگران در ارتباط با تاثیر هورمون‌های رشد بر برخی فاکتورهای مورفولوژیکی و بیوشیمیایی گیاه کاسنی مشابه است [۴].

طبق نتایج بدست آمده در این پژوهش، در تمام تیمارهای موجود محیط‌های کشت عاری از هورمون کالوس‌دهی ضعیفی داشت؛ این موضوع نشان می‌دهد که گیاه کاسنی از جمله گیاهانی است که برای کالوس دهی نیاز به هورمون خارجی دارد [۹,۸,۱].

از لحاظ ترکیب رنگی، کالوس‌ها در همه‌ی تیمارها، تغییرات رنگی متفاوت از ترکیب رنگی سفید مایل به کرم تا زرد مایل به سبز و قهوه‌ای روشن و سپس تیره و بسته به نوع تنظیم کننده رشد به کار رفته، تغییر رنگ دادند، این نتایج با نتایج پژوهش های (Singh et al., 2011)، (Prakash et al., 2010)، (Fatima et al., 2009) و (Mannan et al., 2012) که نتایج مشابهی از تغییرات رنگ نمونه را در فرایند کالوس‌دهی سایر گیاهان در حضور تنظیم کننده های رشد مختلف مشاهده نمودند، همسو می باشد[۷و۹و۱۰و۱۱].

Nandagopal and Ranjitha Kumari (2007) ریزنمونه‌های برگ و هیپوکوتیل گیاه کاسنی را در ترکیبی از تنظیم کننده های اکسینی مورد ارزیابی قرار دادند و نتیجه گرفتند که بیشترین رشد کالوس زایی و رشد ریشه را ریزنمونه‌های برگ در شرایط کشت بافت مایع در حضور ترکیب‌های اکسینی نشان داده است. پژوهش حاضر نیز از نظر بیشترین میزان کالوس‌زایی در ریزنمونه برگ بر اثر نوع دیگری از ترکیب اکسینی با پژوهش‌های Nandagopal and Ranjitha Kumari هم سویی نشان داد [۱۲].



نمودار ۷- مقایسه میانگین‌های مربوط به اثرات متقابل تیمارهای هورمونی و جداکشت بر میزان کاروتنوئید

گزارش‌های مشابه دیگری نیز مبنی بر کالوس‌زایی گیاه کاسنی در حضور انواع اکسین و سیتوکینین‌ها توسط Koohsari et al (2020) صورت گرفته است که کالوس‌زایی این گیاه را در غلظت های مختلف تنظیم کننده‌های NAA و BA با ریزنمونه برگ، دمبرگ و ساقه مورد ارزیابی قرار داده‌اند و نتایج آن‌ها نشان داده است که همه محیط های کشت با ترکیب های مختلف BA و NAA در همه‌ی ریزنمونه‌ها موجب کالوس‌زایی ۱۰۰ درصد شدند [۲]، نتایج پژوهش حاضر نیز همسویی با پژوهش ذکر شده را در مورد نوع دیگر تنظیم کننده‌های اکسینی و سیتوکینی نشان می‌دهد.

گزارش‌های مشابه دیگری نیز مبنی بر کالوس‌زایی گیاه کاسنی در حضور انواع اکسین و سیتوکینین‌ها توسط Koohsari et al (2020) صورت گرفته است که کالوس‌زایی این گیاه را در غلظت های مختلف تنظیم کننده‌های NAA و BA با ریزنمونه برگ، دمبرگ و ساقه مورد ارزیابی قرار داده‌اند و نتایج آن‌ها نشان داده است که همه محیط های کشت با ترکیب های مختلف BA و NAA در همه‌ی ریزنمونه‌ها موجب کالوس‌زایی ۱۰۰ درصد شدند [۲]، نتایج پژوهش حاضر نیز همسویی با پژوهش ذکر شده را در مورد نوع دیگر تنظیم کننده‌های اکسینی و سیتوکینی نشان می‌دهد.

ریزنمونه‌های مختلف گیاهان خانواده کاسنی مبنی بر انتخاب ریزنمونه مناسب جهت کالوس زایی مورد پژوهش و بررسی قرار گرفته‌اند. پژوهش حاضر نیز نشان داد که نوع ریزنمونه در میزان القای کالوس در گیاه کاسنی مؤثر است. بافت‌های گیاهی مختلف در غشا سلول و یا درون سیتوپلاسم دارای گیرنده‌های اختصاصی برای هورمون‌ها هستند [۱۳]، بنابراین سطح هورمون‌ها در ریزنمونه‌ها متفاوت خواهد بود [۱۴] و به همین دلیل ریزنمونه های مختلف کالوس دهی متفاوتی را نشان دادند.

از آنجا که اکسین و سیتوکینین نقش مهمی در چرخه سلولی و میتوز نشان می‌دهند [۱۵]، بنابراین در فرایند کال‌زایی نقش مهمی ایفا می‌کنند. اکسین‌ها سبب تجمع پروتئین کینازهای چرخه سلولی می‌شوند و سیتوکینین سبب فعال شدن این پروتئین‌ها می‌گردند و در نتیجه تقسیم سلولی القا می‌شود [۱۶،۱۳].

در بررسی اثر جداکشت نتیجه گردید که بیشترین میزان وزن خشک از کالوس‌های حاصل از ریزنمونه‌های برگ حاصل شده و ریشه کمترین میزان وزن خشک را (به ازای یک گرم کالوس تر) تولید نموده است که با نتایج بررسی (Fatima et all., 2009) در گیاه *Digitalis lanata* و (Legha et all., 2012) در گیاه همیشه‌بهار (*Calendula officinalis*) که با افزایش میزان غلظت هورمون 2,4-D (اکسین) وزن خشک کالوس حاصل از برگ ها افزایش یافت، همسویی نشان می‌دهد [۷و۸].

نتایج نشان داد که بیشترین میزان کلروفیل a، 0.739 میلی‌گرم بر گرم وزن تر کالوس کلروفیل b، 1.063 میلی‌گرم بر گرم وزن تر کالوس و کلروفیل کل، 1.802 میلی گرم بر گرم وزن تر کالوس مربوط به اثرات متقابل جداکشت برگ با تیمار هورمونی BAP (0.75mg/L) بود. همچنین بیشترین میزان کاروتنوئید، 0.546 میلی‌گرم بر گرم وزن تر کالوس مربوط به اثرات متقابل جداکشت ریشه با تیمار هورمونی کینتین (1mg/L) بود.

در میان فیتوهورمون‌ها، سیتوکینین‌ها نقش حیاتی در جهت تبدیل اتیوپلاست به کلروپلاست، افزایش بیوسنتز کلروفیل و کاهش تجزیه آن در گیاهان دارند [۱۷].

بیان بسیاری از ژن‌های هسته‌ای و کلروپلاستی علاوه بر نور، وابسته به سیتوکینین است[۱۹،۱۸]. سیتوکینین موجب افزایش سطح mRNA کدکننده آنزیم NADPH- پروتوکلروفیلید اکسیدوردوکتاز می‌شود [۲۰]. این فیتوهورمون همچنین فعالیت آنزیم‌های منیزیم پروتوپورفیرین IX کلاتاز و پروتوپورفیرین منیزیم متیل ترانسفرازIX را تحریک کرده که این نیز به نوبه خود موجب افزایش بیوسنتز کلروفیل می شود [۱۹].

در مطالعه (Costa et al., 2005) نیز محلول پاشی گیاهان با سیتوکینین موجب کاهش فعالیت آنزیم‌های تجزیه کلروفیل همچون کلروفیلاز و منیزیم کلاتاز در مقایسه با گیاهان مشاهد شده است [۲۱].

نتایج برخی پژوهش‌ها، اثر برهم‌کنش کینتین و براسینواستروئید بر افزایش محتوای رنگیزه‌های فتوسنتزی کلروفیل را در سلول‌های جلبک کلرلا را نشان می‌دهد [۲۲].

Sarafraz Aradakani (2019)، نیز اثر همزمان سیتوکینین از نوع کینتین و براسینواستروئید را بر افزایش تولید رنگدانه‌های فتوسنتزی به ویژه کاروتنوئیدها در گیاه گندم نشان داده است، پژوهش حاضر از نظر بیشترین محتوای کاروتنوئید در تیمار کینتین با نتایج پژوهش یادشده مشابه است [۲۳].

با توجه به اینکه کارتنوئیدها به ندرت ظاهر می‌شوند مگر در بخش هایی که کلروفیل به وجود نمی‌آید، یا در اثر پیری و یا سایر تغییرات فیزیولوژیکی تخریب شود[۲۴]، در پژوهش حاضر نیز بیشترین میزان کاروتنوئید در جداکشت ریشه تولید شده است.

نتیجه‌گیری

گیاه کاسنی از گیاهان دارویی مهم در درمان برخی بیماری‌ها به ویژه نارسایی‌هایی کبدی از جمله کبد چرب می باشد. نتایج این پژوهش به طور کلی نشان داد که اثرمتقابل تنظیم کننده‌های رشد و نوع جداکشت صفات مختلف کالوس زایی مانند درصد القای کالوس، وزن تر کالوس، وزن خشک کالوس، میزان کلروفیل و کاروتنوئید را تحت تاثیر قرار می‌دهد و میزان این تاثیر به نوع جداکشت و غلظت‌های مختلف تنظیم کننده‌های رشد بستگی دارد و کالوس‌زایی در گیاه کاسنی نیازمند حضور هورمون‌های رشد است.

منابع

[1] Singh R, Kaur Chahal K. Cichorium intybus L.: A review on phytochemistry and pharmacology. Int. J. Chem. Stud., 2018; 6(3): 1272-1280.

[2] Koohsari A, Chalavi V, Akbarpour V. Effect of explant type and growth regulators on callus formation and chicory secondary metabolites. JOPPR, 2020; 27(2): 59-72.

[3] Janda K, Gutowska I, Geszke-Moritz M, Jakubczyk K. The Common Cichory (Cichorium intybus L.) as a Source of Extracts with Health-Promoting Properties—A Review. Molecules, 2021; 26: 1814.

[4] Hadizadeh H, Mohebodini M, Esmaeilpoor B. Effects of auxins on induction and establishment of adventitious and hairy roots culture of the medicinal plant chicory (*Cichorium intybus* L.). IJMAPR, 2016; 32(3):397-389.

[5] Murashige T, Skoog F. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant., 1962; 15(3): 473- 97.

[6] Castle SC, Morrison CD, Barger NN. Extraction of chlorophyll a from biology soil crusts: A comparison of soil crusts: A comparison of solvents for spectrophotometric determination. Soil Biol. Biochem, 2011; 43:853-856.

[7] Fatima Z, Mujib A, Fatima S, Arshi A, Umar S. Callus induction, biomass growth, and plant regeneration in *Digitalis lanata* Ehrh: influence of plant growth regulators and carbohydrates. Turk. J. Biol, 2009; 33:393-405.

[8] Legha MR, Prasad KU, Singh SK, Kaur C, Arora A, Kumar S. Induction of carotenoid pigment in callus cultures of *Calendula officinalis* L. in response to nitrogen and sucrose levels. In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant, 2012; 48:99-106.

[9] Singh N, Meena MK, Patni V. Effect of plant growth regulators, explants type and efficient plantlet regeneration protocol through callus induction in *Naringi crenulata* (Roxb.) Nicolson and its biochemical investigation. Afr. J. Biotechnol, 2011; 10(77): 17769-17777.

[10] Mannan A, Syed TN, Yameen MA, Ullah N, Ismail T, Hussain I, Miza B. Effect of growth regulators on *in vitro* germination of *Artemisia absinthium*. J. Sci. Res. Essay, 2012; 7(14): 1501-1507.

[11] Prakash Mg, Gurumurthi K. Effect of type explant and age, plant growth regulators and medium strength on somatic embryogenesis and plant regeneration in *Eucalyptus camaldulensis*. Plant Cell, Tissue Organ Cult., 2010; 100: 13-20.

[12] Nandagopal S, Ranjitha Kumari BD. Effectiveness of auxin induced *in vitro* root culture in chicory. J. Cent. Eur. Agric., 2007. 8(1):73-80.

[13] Mortazavi R, Dehdari M, Masoomiasl A. Evaluation of callus formation in Ferulago angulate B. using a variety of explants and growth regulators. Agri bio, 2015; 14(2):73-80.

[14] Ji A, Geng X, Zhang Y, Wu G. Advances in somatic embryogenesis research of horticultural plants. Am. J. Plant Sci., 2011; 2: 06.727.

[15] Pasternak T, Miskolczi P, Ayaydin F, Mészáros T, Dudits D, Fehér A. Exogenous auxin and cytokinin dependent activation of CDKs and cell division in leaf protoplast-derived cells of alfalfa. Plant Growth Regul, 2000; 32(3):129-141.

[16] Rostami R, Abrishamchi P, Lahooti M. Callus induction and plant regeneration from potato meristem cultivation. Jsci, 2012; 10(4):1011-1032.

[17] Noroozi Shahri F, Jalali Honarmand S, Saeidi M, Mondani F. Evaluation of some biochemical characteristics of medicinal plant basil (*Ocimum basilicum* L.) under the application of growth phytohormones and phytohormones-like. J.plant proc. func., 2021; 10(42): 189-209.

[18] Khayat Nezhad M, Gholamian R. The effect of drought stress on leaf chlorophyll content and stress resistance in maize cultivar (*Zea mays*). Afr. J. Microbiol. Res., 2012; 6(12):2844-2848.

[19] Yaronskaya E, Vershilovskaya I, Poers Y, Alawady AE, Averina N, Grimm B. Cytokinin effects on tetrapyrrole biosynthesis and photosynthetic activity in barley seedlings. Planta, 2006; 224: 700-709.

[20] Kuroda H, Masuda T, Fusada N, Ohta H, Takamiya K. Cytokinin–induced transcriptional activation of NADPH–protochlorophyllide oxidoreductase gene in cucumber. J plant res, 2001; 114: 1-7.

[21] Costa ML, Civello PM, Chaves AR, Martinez GA. Effect of ethephon and 6-benzylaminopurine on chlorophyll degrading enzymes and a peroxidase-linked chlorophyll bleaching during post-harvest senescence of broccoli (Brassica oleracea L.) at 20 C. Postharvest Biol. Technol., 2005; 35: 191-199.

[22] Bajguz A, Piotrowska-Niczyporuk A. Interactive effect of brassinosteroids and cytokinins on growth, chlorophyll, monosaccharide and protein content in the green alga Chlorella vulgaris (Trebouxiophyceae). Plant Physiol. Biochem., 2014; 80: 176-183.

[23] Sarafraz Aradakani MR. Effect of cytokinin and brassinosteroid treatments on some biochemical and physiological of wheat cultivars under drought stress in generative phase. Crop phys j, 2019; 11(43):5-24.

[24] Bernard SM, Photosynthesis, Lesani H, Mojtahedi M. Fundamentals of Plant Physiology. Sixth Edition, Tehran: University of Tehran Press, 2003; 561-562.

Interaction between hormonal treatments and type of explant on callus formation and photosynthetic pigments in Chicory (*Cichorium intybus* L.)

Ghaemi M. [1], Zare Z. [2*], Aghili F.[3]

[1] professor assistant, Department of Biology, Gorgan Branch, Islamic Azad University, Gorgan, Iran
[2] Professor assistant, Department of Biology, Farhangian university, Tehran, Iran
[3] MA., Department of Biology, Gorgan Branch, Islamic Azad University, Gorgan, Iran

* (Corresponding author): zahrazarebio@gmail.com

Received: July 2021 Accepted: December.2021

Abstract

Chicory (*Cichorium intybus* L) is an important medicinal plant with valuable secondary metabolites. Chicory callus is a good source for the production and extraction of metabolites of this plant. In this study, chicory callus changes were investigated about some morphological and biochemical characteristics to obtain the best hormonal treatment. Healthy seedlings were prepared from sterile chicory seeds in ½ MS culture medium. Stem, leaf and root explants were prepared from seedlings and used for culture in liquid MS and 2,4-D, BAP and kinetin hormones at concentrations of 0.5, 0.75 and 1 mg / l were cultured. The results showed that callus were yellow and green to dark brown and callus texture also showed from weak and soft to firm. The highest percentage of callus (76.22%) related to leaf explant and treatment 2,4-D (0.5mg / L), the highest amount of fresh weight of callus (7.30 g) and dry weight of callus (0.077 g) In leaf explant and Kin treatment (0.75 mg / L), the highest amount of chlorophyll a, b and total was related to leaf and BAP hormone treatment (0.75 mg / L). The highest amount of carotenoids was related to root explant and Kin (1 mg / L). In general, the interactions of hormones and explants affect different callus-forming characteristics and these effects depends on the type of explants and the concentration of growth regulators, and the greatest effect was observed in leaf explant culture.

Keywords: *Cichorium intybus* L, Callus, Chicory, Plant Hormones.