دوماهنامه علمی- پژوهشی تحقیقات گیاهان دارویی و معطر ایران
جلد ۳۲، شماره ۵، صفحه ۷۶۹-۷۵۸ (۱۳۹۵)

کالوس‌زایی و اندام‌زایی گیاه دارویی شاهدانه (*Cannabis sativa* L.) در شرایط درون شیشه‌ای

مهدی موحدی[۱]، ولی‌اله قاسمی عمران[۲*] و سپیده ترابی[۳]

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه اصلاح نباتات، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم تحقیقات، تهران، ایران

۲*- نویسنده مسئول، استادیار، پژوهشکده ژنتیک و زیست‌فناوری کشاورزی طبرستان، دانشگاه کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ایران

پست الکترونیک: ghasemiomran@yahoo.com

۳- استادیار، گروه اصلاح و بیوتکنولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم تحقیقات، تهران، ایران

تاریخ دریافت: فروردین ۱۳۹۴ تاریخ اصلاح نهایی: مرداد ۱۳۹۴ تاریخ پذیرش: آبان ۱۳۹۴

چکیده

این تحقیق به‌منظور بررسی امکان ریزازدیادی، تعیین بهترین محیط کشت و ترکیب تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی شاهدانه (*Cannabis sativa* L.) در شرایط درون شیشه‌ای انجام شد. بذرها بعد از ضدعفونی سطحی روی محیط کشت پایه MS کشت شدند. پس از یک ماه ریزنمونه‌های برگ و هیپوکوتیل از گیاهچه‌های رشدیافته در محیط *in vitro* در محیط کشت MS حاوی تنظیم‌کننده رشد گیاهی NAA (۰/۵، ۱، ۲ و ۳ میلی‌گرم در لیتر) به تنهایی یا در ترکیب با ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BA و تنظیم‌کننده رشد گیاهی 2,4-D (۰/۱، ۰/۲، ۰/۵ و ۱ میلی‌گرم در لیتر) به تنهایی یا در ترکیب با ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BA کشت گردیدند. واکنش ریزنمونه‌ها تقریباً در بیشتر محیط‌های کشت مورد استفاده، تولید کالوس بوده‌است. هیچگونه باززایی مستقیم در ریزنمونه‌ها مشاهده نشده و تنها در غلظت ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D به همراه ۰/۵ میلی‌گرم BA در ریزنمونه هیپوکوتیل باززایی غیرمستقیم دیده شده‌است. بیشترین حجم کالوس تولید شده در کل ریزنمونه‌ها، در غلظت ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D به همراه ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BA در ریزنمونه برگ بدست آمد. ریشه‌زایی در کالوس بعضی از ریزنمونه‌ها در سطوح مختلف تیمارها مشاهده شد. بیشترین وزن تر کالوس تولید شده مربوط به بافت برگ در تیمار ۱ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D به همراه ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BA بوده‌است. ریزنمونه‌ها به راحتی کالوس‌زایی و ریشه‌زایی کرده و نسبت به باززایی واکنش خوبی نشان ندادند.

واژه‌های کلیدی: شاهدانه (*Cannabis sativa* L.)، ریزازدیادی، کالوس، ریزنمونه، تنظیم‌کننده‌های رشد.

مقدمه

شاهدانه (*Cannabis sativa* L.) گیاه بومی مناطق مرکزی آسیا می‌باشد و از آنجا به سایر مناطق جهان گسترش یافته است (Callaway & Laakkonen, 1996). این گیاه یک‌ساله و عموماً دو پایه می‌باشد، البته واریته‌های فیبری شاهدانه به‌صورت تک‌پایه هستند، به‌عبارتی دوجنسی‌اند (Small & Cronquist, 1976). گل‌آذین پایه مادری می‌تواند به‌دلیل پوشش کرک‌های غده‌ای رزین‌دار بسیار چسبنده باشد. کانابینوئیدها از ترکیب‌های ترپنوئیدی مخصوص شاهدانه بوده و این کرک‌ها منابع اصلی این مواد می‌باشند، بنابراین گل‌آذین پایه مادری مهمترین بخش گیاه محسوب می‌شود (Wills, 1998). از گیاه شاهدانه تاکنون

بیش از ۶۱ ماده شیمیایی معروف به کانابینوئید کشف شده است. اصلی‌ترین ماده کانابینوئید دلتا-۹-تتراهیدروکانابینول یا THC می‌باشد. THC با اتصال به گیرنده‌های کانابینوئیدی در مغز به‌عنوان مسئول بیشتر آثار روان‌گردانی شاهدانه به‌شمار می‌رود، مقدار THC در بخش‌های مختلف گیاه متفاوت است. THC در سرشاخه‌های گلدار گیاه در بالاترین حد و به‌ترتیب در برگ‌ها، برگ‌های تحتانی ساقه و دانه‌های گیاه کاهش می‌یابد (Kosiorek *et al*., 2004). مطالعات انجام شده در ایالت متحده آمریکا، نشان داده که رزین شاهدانه (حشیش) حاوی مقادیر تقریباً مساوی از هر دو کانابینوئید مهم (THC و CBD) می‌باشد، اما بخش گیاهی شاهدانه (ماری‌جوانا) شامل مقادیر بیشتری از THC می‌باشد (ElSohly *et al*., 1984). این گیاه حاوی تعدادی ترکیب‌های فرّار عمدتاً منوترپن‌ها و سزکویی‌ترپن می‌باشد که کاربردهای فراوانی در صنایع آرایشی و عطرسازی دارد (Mand & Mediavilla, 1998). علاوه‌بر پروتئین و چربی، شاهدانه محتوی مقدار کمی از کربوهیدرات‌های قابل هضم و ویتامین‌های گروه B، ویتامین C، ویتامین E و ویتامین D است (Hendriks *et al*., 1975).

به‌دلیل دگرگشن بودن گیاه شاهدانه، نگهداری و تکثیر ژنوتیپ‌های خالص و دارای THC بالای این گیاه مشکل است و با استفاده از بذر نمی‌توان اقدام به ازدیاد ژنوتیپ‌های برتر این گیاه کرد. فناوری‌های نوین زیست‌فناوری ازجمله کشت بافت می‌تواند کمک بسزایی در جهت ازدیاد چنین گیاهان دارویی باارزشی بکند. با توجه به تک‌جنسی بودن این گیاه در طبیعت و اهمیت بیشتر جنس ماده از لحاظ تولید متابولیت‌های ثانویه باارزش و با توجه به اینکه باززایی مستقیم و غیرمستقیم گیاهان به‌عنوان پیش‌نیاز اساسی در انتقال ژن، دستورزی‌های ژنتیکی و غیره می‌باشد، بهینه‌سازی باززایی این گیاه در شرایط درون شیشه‌ای ضروری به نظر می‌رسد. البته گزارش‌های اندکی در مورد باززایی مستقیم و غیرمستقیم این گیاه از نظر جهانی وجود دارد و منابع مختلف بررسی شده حکایت از سرسخت بودن این گیاه برای باززایی دارد. گزارش‌های مختلف حکایت از سهولت القاء کالوس و مشکل بودن باززایی ساقه از کالوس دارد (Feeney & Punja, 2003 ؛Raharjo *et al*., 2006). به‌منظور باززایی شاهدانه، از ریزنمونه‌های مختلف در شرایط سنی مختلف گیاه مادری و محیط کشت‌های حاوی غلظت‌های مختلف تنظیم‌کننده‌های رشدی استفاده شده‌است، با این حال گزارش‌های متناقضی در این زمینه وجود دارد. البته باززایی مستقیم و باززایی به‌دلیل کالوس تنها محدود به چند گزارش انگشت‌شمار بوده‌است. به‌نحوی که بیشتر گزارش‌های موجود با هدف توسعه سیستم‌های کشت سلولی برای بدست آوردن متابولیت‌های ثانویه در این گیاه انجام شده‌است.

کالوس‌زایی و باززایی ریزنمونه‌های برگ، دمبرگ، گره و جوانه انتهایی روی محیط کشت MS حاوی تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی مختلف شامل (Dicamba Kin، 2,4-D و NAA (Lusarkiewicz-Jarzina *et al*., 2005)، باززایی ساقه از کشت ریزنمونه نوک ساقه در محیط کشت MS حاوی ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر TDZ (Wang *et al*., 2008)، باززایی گیاه از کالوس‌های ریزنمونه برگ در محیط کشت MS حاوی تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی IBA، IAA، 2,4-D و NAA در سطوح مختلف در ترکیب با ۰/۵ میکرومولار TDZ (Lata *et al*., 2010) و باززایی ساقه از کشت ریزنمونه گره و جوانه جانبی در محیط کشت MS حاوی تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی BA، Kin و TDZ در ترکیب با اسید جیبرلیک GA3 (Lata *et al*., 2009) گزارش شده‌است.

کشور ایران دارای شرایط آب و هوایی بسیار متنوع بوده و دارای قابلیت بالقوه‌ای برای پرورش این گیاه دارویی باارزش می‌باشد. البته با وجود بومی بودن این گیاه با ارزش، در مورد کشت بافت گیاه شاهدانه در ایران گزارش های اندکی موجود می‌باشد. از این‌رو این تحقیق با هدف بهینه‌سازی کشت بافت این گیاه شامل کال‌زایی و باززایی گیاه شاهدانه ایرانی در شرایط *in vitro* انجام شده است.

مواد و روش‌ها

تهیه مواد گیاهی و محیط کشت

به‌منظور تولید گیاهچه‌های عاری از هر گونه آلودگی، مراحل ضدعفونی بذرها شامل شستشو به‌وسیله محلول مایع

ظرفشویی و قرارگیری زیر آب جاری به مدت نیم ساعت و غوطه‌وری در الکل ۷۰٪ به مدت ۳۰ ثانیه و بعد مراحل ضدعفونی داخل هود مخصوص کشت بافت، شامل غوطه‌ور کردن بذرها در هیپوکلریت سدیم ۲٪ به همراه یک قطره توین ۲۰ به مدت ۲۰ دقیقه و بعد غوطه‌ور کردن بذرها درون محلول کلرید جیوه ۰/۰۵٪ به مدت ۵ دقیقه انجام شد. بعد از هر مرحله ضدعفونی، بذرها سه بار با آب مقطر استریل شده مورد شستشو قرار گرفتند. بذرهای ضدعفونی شده در محیط کشت MS بدون هورمون که به مدت ۲۰ دقیقه در اتوکلاو با دمای ۱۲۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفته بود، مستقر شدند. سپس بذرها به مدت ۳۰ روز در دوره نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد به‌منظور ایجاد شرایط طبیعی شبانه‌روزی نگهداری شدند. بدین‌ترتیب تعدادی گیاه به‌عنوان مواد اولیه برای جدا کردن ریزنمونه‌های مورد آزمایش بدست آمد.

باززایی غیرمستقیم

القاء کالوس

از گیاهچه‌های استریل رشد کرده در محیط *in vitro* پس از ۳۰ روز، قطعات ریزنمونه شامل برگ و هیپوکوتیل جداسازی شده و در شرایط کاملاً سترون طی ۲ آزمایش جداگانه به محیط کشت‌های حاوی تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی منتقل شدند (جدول ۱). واکشت نمونه‌ها هر ۳۰ روز یک‌بار انجام گردید و پس از ۲ ماه صفاتی مانند حجم کالوس، سطح کالوس، وزن تر و وزن خشک کالوس اندازه‌گیری و یادداشت‌برداری شد.

جدول ۱- ترکیب تنظیم‌کننده‌های رشد در آزمایش کالوس‌زایی

2,4-D (mg/l)	BA (mg/l)
۰/۱	۰
۰/۲	۰
۰/۵	۰
۱	۰
۰/۱	۰/۵
۰/۲	۰/۵
۰/۵	۰/۵
۱	۰/۵
NAA (mg/l)	**BA (mg/l)**
۰/۵	۰
۱	۰
۲	۰
۳	۰
۰/۵	۰/۵
۱	۰/۵
۲	۰/۵
۳	۰/۵

تولید اندام هوایی و ریشه

قطعات ریزنمونه برگ و هیپوکوتیل بعد از قرار گرفتن در محیط‌های تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی ذکر شده (مطابق جدول ۱) پس از تشکیل کالوس، در همان محیط‌های کشت شروع به ساقه‌زایی و ریشه‌زایی کردند. سپس با واکشت نمونه‌ها در محیط تازه، تشکیل گیاه کامل انجام شد.

فرایند ریشه‌دهی

ساقه‌های باززا شده، به‌منظور تولید ریشه به محیط‌های کشت MS حاوی تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی اکسین NAA و IBA، هر یک در ۴ غلظت (۰/۱، ۰/۲، ۰/۵ و ۱ میلی‌گرم در لیتر) منتقل شدند. تعداد ریشه و طول ریشه بعد از ۳ هفته مورد بررسی قرار گرفت.

سازگارکردن و انتقال به گلخانه

ساقه‌های ریشه‌دار شده پس از شستشوی ریشه‌ها با آب مقطر درون ظروف یک‌بار مصرف حاوی پرلیت، شن و خاک کشت داده شدند. به‌منظور جلوگیری از تبخیر آب، درب ظروف یک‌بار مصرف را بسته و در اتاقک رشد قرار گرفتند. گیاهچه‌ها به‌طور مرتب در اتاق سازگاری آبیاری و پس از ۱۴ روز درب ظروف برداشته شده و به گلخانه منتقل شدند.

تجزیه و تحلیل آماری

طرح آماری مورد استفاده در این تحقیق، آزمایش فاکتوریل در قالب طرح پایه کاملاً تصادفی بوده‌است. تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SAS و مقایسه میانگین‌ها با استفاده از نرم‌افزار MSTAT-C انجام گردید و قبل از انجام آنالیز واریانس، نرمال بودن داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار Microsoft office Exel 2010 مورد بررسی قرارگرفت. برای انجام آزمون مقایسه میانگین‌ها از آزمون چند دامنه‌ای دانکن استفاده شد.

جدول ۲- تجزیه واریانس کالوس‌زایی برای ریزنمونه‌ها و تنظیم‌کننده‌های رشد در آزمایش اول

تیمار	درجه آزادی	میانگین مربعات	
		حجم کالوس	وزن تر کالوس
2,4-D	۳	۰/۱۵ **	۰/۱۴ **
BA	۱	۱/۲۱ **	۰/۵۷ **
Explant	۱	۱/۷۶ **	۰/۶۳ **
2,4-D *BA	۳	۰/۱۰ *	۰/۰۱ *
2,4-D *Explant	۳	۰/۰۸ ns	۰/۰۸ **
BA*Explant	۱	۰/۶۶ **	۰/۱۹ **
2,4-D *BA*Explant	۳	۰/۰۷ *	۰/۰۲ **
خطا (**Error**)	۳۲	۰/۰۲	۰/۰۰۱
کل (**Total**)	۴۷		

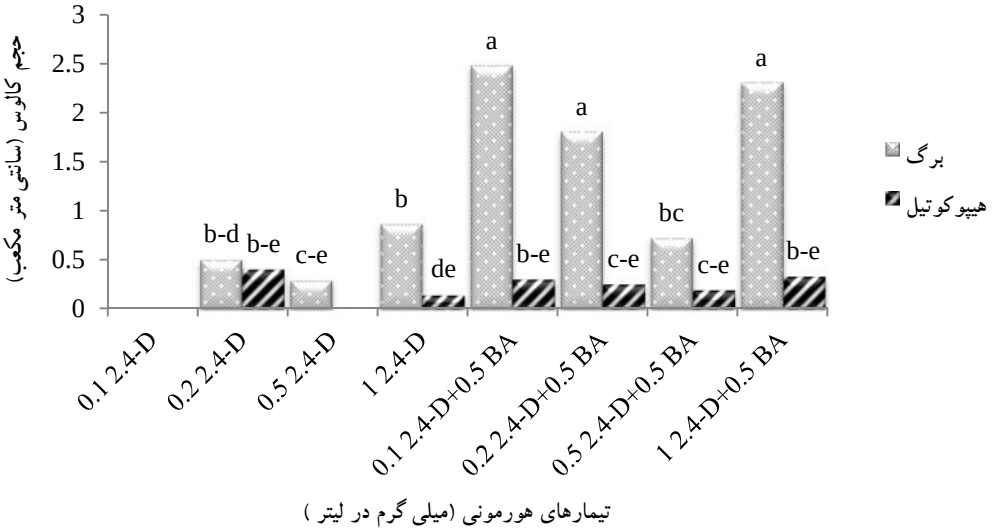
نتایج

بررسی تأثیر ترکیب‌های مختلف تیمارهای تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی در مرحله القاء کالوس

اثر تنظیم‌کننده رشد گیاهی 2,4-D به تنهایی یا در ترکیب با هورمون BA بر کالوس‌زایی

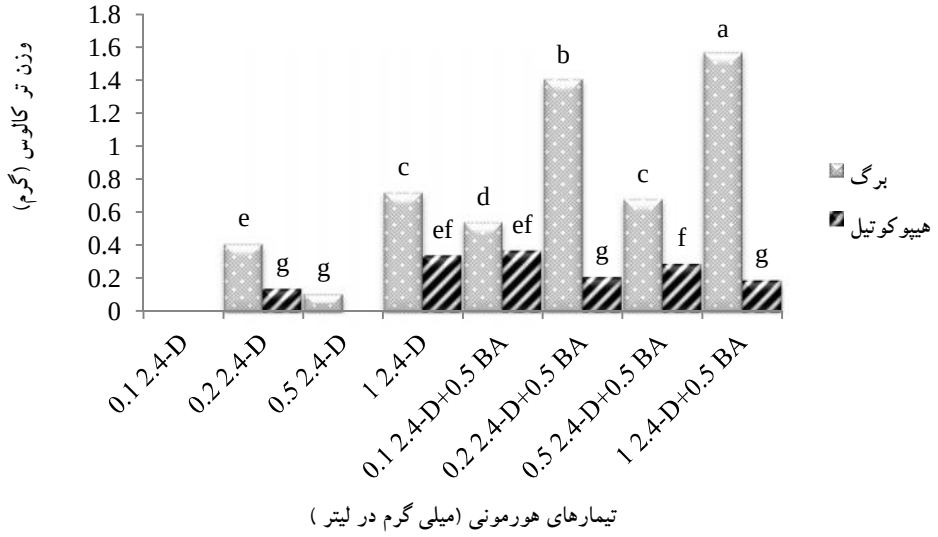
در بررسی اثر تنظیم‌کننده رشد گیاهی 2,4-D به تنهایی و یا در ترکیب با BA، همانگونه که جدول ۲ نشان می‌دهد، منبع ریزنمونه از نظر مقدار کالوس تولیدی، معنی‌دار شده و بیانگر تفاوت قدرت کالوس‌زایی بین دو بافت برگ و هیپوکوتیل می‌باشد ($P<۰/۰۱$). برهم‌کنش اثر غلظت تنظیم‌کننده‌های رشد و ریزنمونه‌ها نیز معنی‌دار شده است ($P<۰/۰۵$) و مشخص شد که مقدار مناسب غلظت و ترکیب دو تنظیم‌کننده رشد با توجه به نوع ریزنمونه تغییر می‌کند و ریزنمونه‌ها نسبت به غلظت‌های مختلف و ترکیب دو تنظیم‌کننده، واکنش‌های متفاوتی بروز می‌دهند.

تحت تأثیر تنظیم‌کننده رشد گیاهی 2,4-D به تنهایی و یا در ترکیب با BA تقریباً در بیشتر سطوح مختلف کالوس زایی مشاهده شد، به‌طوری که بیشترین و کمترین میزان حجم کالوس به‌ترتیب در غلظت‌های ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر هورمون 2,4-D به همراه ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BA در بافت برگ و ۱ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D در ریزنمونه هیپوکوتیل مشاهده شد (شکل ۱). در سطوح ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر، در هر دو ریزنمونه و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر در ریزنمونه هیپوکوتیل هیچ‌گونه کالوسی روی قطعات ریزنمونه حاصل نشده‌است و ریزنمونه ها پس از مدتی نکروزه شده و از بین رفتند (شکل ۱). با اضافه شدن ترکیب BA به سطوح غلظت‌های مختلف تنظیم‌کننده رشد گیاهی 2,4-D، تأثیر شگرفی در بهبود حجم کالوس در ریزنمونه برگ مشاهده شد. به‌طوری که در تمام غلظت‌های 2,4-D، افزودن BA حجم کالوس را به‌طور معنی‌داری افزایش داد، اما بین سطوح مختلف این ترکیب بجز یک مورد (۰/۵ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D به همراه ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BA)، در سایر موارد اختلاف معنی داری وجود نداشت. در مجموع، ریزنمونه برگ از نظر حجم کالوس تولیدی در مجموع واکنش مناسب‌تری را نسبت به ریزنمونه هیپوکوتیل در تمام سطوح ترکیب های مختلف تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی از خود نشان داد.



شکل ۱- بررسی تأثیر ترکیب‌های مختلف تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی 2,4-D و BA بر میزان تشکیل کالوس در ریزنمونه‌ها

نتایج حاصل از جدول تجزیه واریانس، نشان داد که وزن تر کالوس‌های حاصل از ریزنمونه‌های برگ و هیپوکوتیل نسبت به هم از نظر آماری اختلاف معنی‌داری دارند (P<۰/۰۱) (جدول ۲). در محیط کشت MS حاوی تنظیم‌کننده رشد گیاهی 2,4-D به تنهایی و یا در ترکیب با هورمون BA، بیشترین مقدار وزن تر کالوس در غلظت ۱ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D به همراه ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BA، در ریزنمونه برگ و کمترین مقدار وزن تر کالوس در غلظت ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D در همین ریزنمونه مشاهده شده‌است (شکل ۲). در مورد وزن خشک کالوس‌های تولیدی از ریزنمونه‌ها، در ریزنمونه برگ، بیشترین وزن خشک کالوس مربوط به تیمار ۱ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D به همراه ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BA و در ریزنمونه هیپوکوتیل نیز بیشترین وزن خشک کالوس در تیمار ۱ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D مشاهده شده‌است.



شکل ۲- بررسی تأثیر ترکیب‌های مختلف تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی 2,4-D و BA بر میزان وزن تر کالوس در ریزنمونه‌ها

اثر تنظیم‌کننده رشد گیاهی NAA به تنهایی یا در ترکیب با BA بر کالوس‌زایی

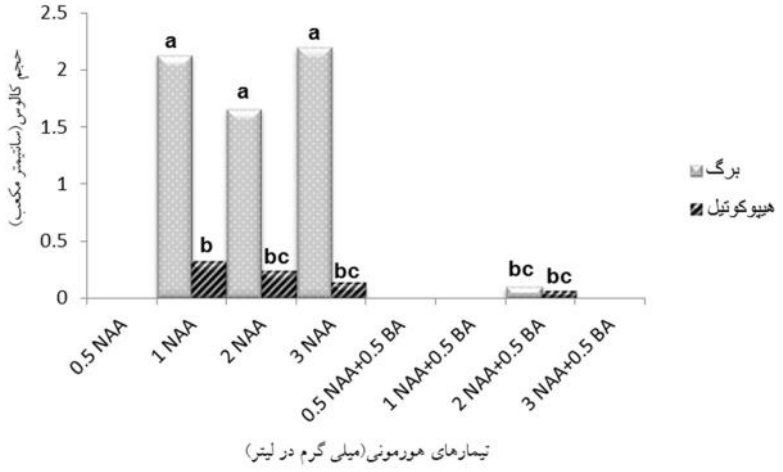
در بررسی اثر تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی NAA به تنهایی و یا در ترکیب با BA، همانگونه که جدول ۳ نشان می‌دهد، منبع ریزنمونه از نظر مقدار کالوس تولیدی، معنی‌دار شده و بیانگر تفاوت قدرت کالوس‌زایی بین دو بافت برگ و هیپوکوتیل است (P<۰/۰۱). بر هم‌کنش اثر متقابل غلظت تنظیم‌کننده‌های رشد و ریزنمونه‌ها نیز معنی‌دار شده است (P<۰/۰۵).

تحت تأثیر تیمار NAA به تنهایی، در تمام سطوح این تنظیم‌کننده رشد گیاهی (بجز غلظت ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر) حداکثر کالوس‌زایی مشاهده شده‌است، اما بین غلظت‌های مختلف در هر دو ریزنمونه اختلاف معنی‌داری وجود نداشت (شکل ۳). با اضافه شدن تنظیم‌کننده رشد گیاهی BA در تمام غلظت‌های مختلف NAA (بجز در غلظت ۲ میلی‌گرم در لیتر به همراه ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BA)، ریزنمونه‌های برگ و هیپوکوتیل هیچگونه واکنشی از نظر تشکیل کالوس از خود نشان نداده‌اند، و به مرور زمان قطعات ریزنمونه نکروزه شده و از بین رفتند. در هر دو ریزنمونه میزان کالوس‌زایی در تمام سطوح اختلاف معنی‌داری نداشته است. اما از نظر ریاضی در ریزنمونه برگ، بیشترین مقدار حجم

کالوس تولیدی، مربوط به غلظت ۳ میلی‌گرم در لیتر NAA بوده و کمترین میزان کالوس‌زایی در غلظت ۲ میلی‌گرم در لیتر NAA به همراه ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BA مشاهده شده‌است. در ریزنمونه هیپوکوتیل بیشترین مقدار حجم کالوس، در غلظت ۱ میلی‌گرم در لیتر NAA به تنهایی و کمترین میزان کالوس‌زایی در غلظت ۲ میلی‌گرم در لیتر NAA به همراه ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BA مشاهده شده‌است (شکل ۳).

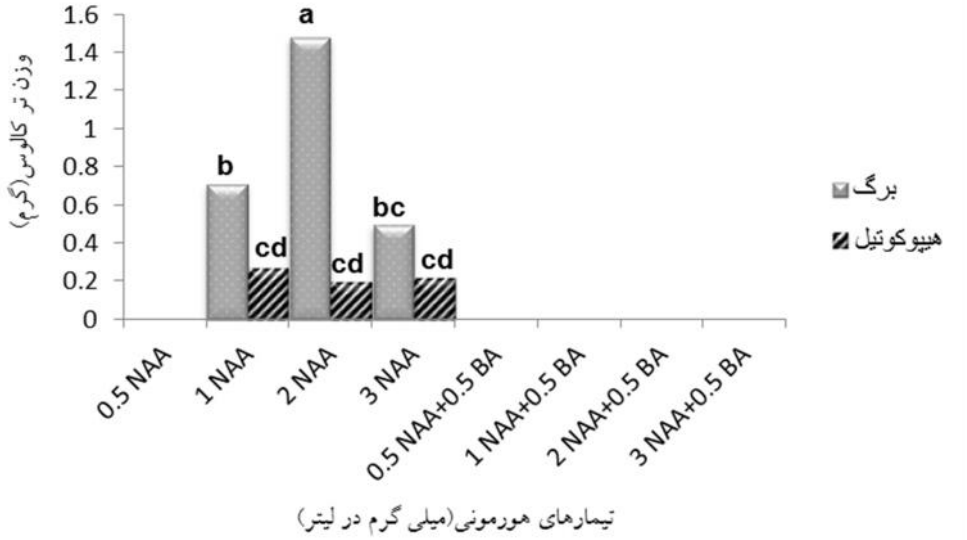
جدول ۳- تجزیه واریانس کالوس‌زایی برای ریزنمونه‌ها و تنظیم‌کننده‌های رشد در آزمایش دوم

تیمار	درجه آزادی	میانگین مربعات	
		حجم کالوس	وزن تر کالوس
NAA	۳	۰/۲۰ **	۰/۰۹ **
BA	۱	۱/۵۷ **	۰/۶۲ **
Explant	۱	۰/۸۹ **	۰/۱۷ **
NAA*BA	۳	۰/۱۹ **	۰/۱ **
NAA*Explant	۳	۰/۱۰ *	۰/۰۴ **
BA*Explant	۱	۰/۸۴ **	۰/۱۷ **
NAA*BA*Explant	۳	۰/۱۰ *	۰/۰۴ **
خطا (**Error**)	۳۲	۰/۰۱	۰/۰۱
کل (**Total**)	۴۷		



شکل ۳- بررسی تأثیر ترکیب‌های مختلف تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی NAA و BA بر میزان تشکیل کالوس در ریزنمونه‌ها

نتایج حاصل از جدول تجزیه واریانس اثر ریزنمونه‌های برگ و هیپوکوتیل روی وزن تر کالوس‌های بدست آمده نشان داد که وزن تر کالوس‌های حاصل نسبت به هم از نظر آماری اختلاف معنی‌داری دارند ($P<۰/۰۱$) (جدول ۳). در محیط کشت MS حاوی NAA به تنهایی و یا در ترکیب با BA، بیشترین مقدار وزن تر کالوس در غلظت هورمونی ۲ میلی‌گرم در لیتر در ریزنمونه برگ و کمترین میزان وزن تر کالوس تولیدی در همین غلظت، در ریزنمونه هیپوکوتیل حاصل شد (شکل ۴). در مورد وزن خشک کالوس‌های تولیدی از ریزنمونه‌ها، در ریزنمونه برگ، بیشترین وزن خشک کالوس مربوط به تیمار ۲ میلی‌گرم در لیتر NAA و در ریزنمونه هیپوکوتیل نیز بیشترین وزن خشک کالوس در تیمار هورمونی ۱ میلی‌گرم در لیتر NAA مشاهده شده است.

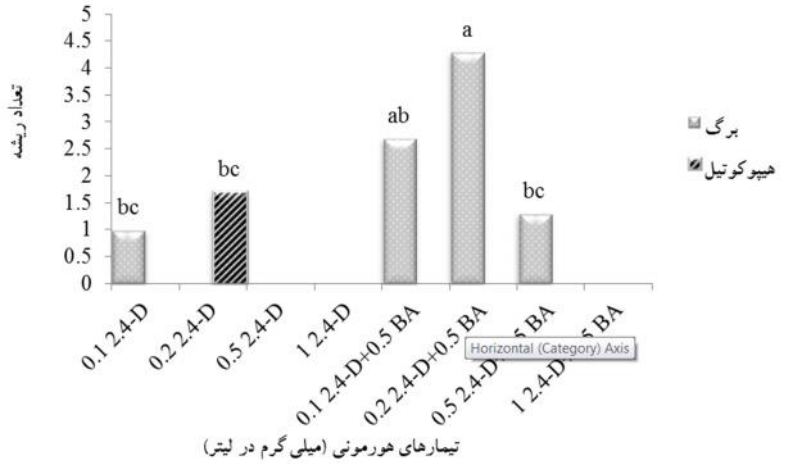


شکل ۴- بررسی تأثیر ترکیب‌های مختلف تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی NAA و BA بر میزان وزن تر کالوس در ریزنمونه‌ها

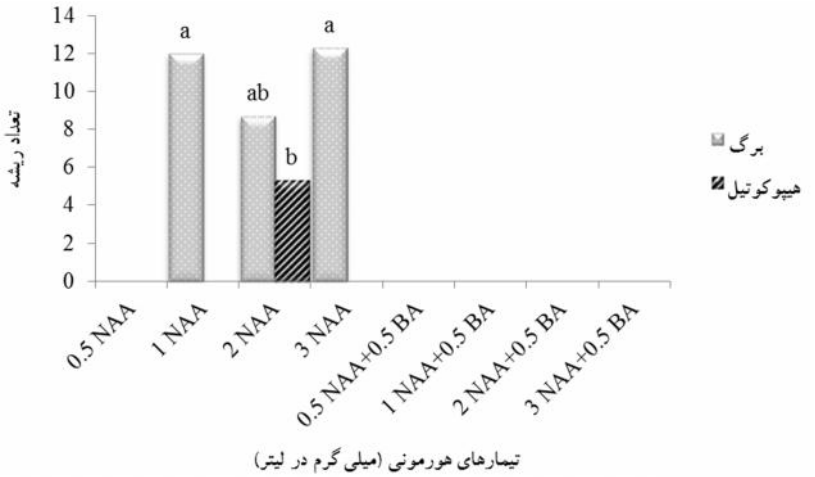
بررسی تأثیر تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی مختلف در ساقه‌زایی و ریشه‌زایی

ریزنمونه‌های مورد آزمایش بعد از قرار گرفتن در محیط های کشت ذکر شده، پس از القاء کالوس تنها در غلظت ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D به همراه ۰/۵ میلی‌گرم BA در ریزنمونه هیپوکوتیل از نظر باززایی واکنش نشان دادند و در سایر غلظت ها، هیچگونه ساقه زایی اتفاق نیفتاده است. اما به‌راحتی، کالوس‌ها در بعضی از غلظت‌های تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی ریشه‌دار شدند. به‌طوری که بیشترین میزان ریشه‌زایی کالوس در غلظت ۳ میلی‌گرم در لیتر NAA در ریزنمونه برگ بوده و کمترین میزان ریشه‌زایی کالوس‌ها در غلظت ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D در همین ریزنمونه تولید شد. از نظر شاخص تعداد ریشه تولیدی از کالوس ها، NAA نسبت به 2,4-D برتری واضحی داشته است و ریزنمونه هیپوکوتیل تحت تأثیر هر دو تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی مورد استفاده نسبت به بافت برگ، ریشه‌زایی کمتری داشته است.

با اضافه شدن تنظیم‌کننده رشد گیاهی BA، در سطوح مختلف NAA، در هر دو ریزنمونه هیچگونه ریشه‌زایی در روی قطعات مشاهده نشده‌است اما تحت تأثیر هورمون 2.4,D، با اضافه شدن BA افزایش چشمگیری در ریشه‌زایی کالوس‌ها، بخصوص بافت برگ مشاهده شده است (شکل ۵).



شکل ۵- بررسی تأثیر ترکیب‌های مختلف تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی 2,4-D و BA بر میزان ریشه‌زایی کالوس در ریزنمونه‌ها



شکل ۶- بررسی تأثیر ترکیب‌های مختلف هورمون NAA و BA بر میزان ریشه‌زایی کالوس در ریزنمونه‌ها القاء ریشه در اندام هوایی باززا شده از ریزنمونه‌ها

حدود ۱۰ روز پس از کشت ساقه‌های باززا شده در محیط‌های کشت MS حاوی تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی NAA و IBA در ۴ غلظت (۰/۱، ۰/۲، ۰/۵ و ۱ میلی‌گرم در لیتر)، مشاهده شد که ساقه‌های باززا شده به‌خوبی در محیط کشت MS حاوی IBA ریشه‌زایی کردند. با افزایش میزان غلظت IBA سرعت ریشه‌دهی در ساقه‌های باززا شده کاهش یافته و بعد از مدتی متوقف شد. سطوح بکار برده شده از تیمار NAA تقریباً تأثیر یکسانی در القاء ریشه در ساقه‌های باززا شده داشته است و اختلاف معنی‌داری بین سطوح این هورمون وجود نداشت. اندام‌های هوایی که در محیط‌های کشت حاوی NAA کشت شده بودند، پس از چند روز مقداری سوختگی در برگ‌هایشان مشاهده شده بود. ریشه‌های تشکیل شده در سطوح IBA، طویل‌تر و باریک‌تر از ریشه‌های تشکیل شده در محیط کشت حاوی NAA بودند. بالاترین میزان ریشه‌زایی مربوط به غلظت ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر IBA بوده‌است. شاخص طول ریشه نیز تحت تأثیر تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی اکسین، مورد بررسی قرار گرفت و بلندترین ریشه در غلظت ۰/۵ میلی‌گرم NAA تشکیل شد.

گیاهچه‌های باززایی شده پس از سازگاری در فیتوترون، به گلخانه منتقل شدند. حدود ۷۰٪ از گیاهچه‌های تولید شده در شرایط کشت بافت، زنده مانده و رشد مطلوبی از خود نشان دادند.

بحث

برای انجام کشت *in vitro* گیاه شاهدانه، پس از بدست آوردن گیاهچه‌ها از کشت بذرها (در محیط کشت MS فاقد تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی) ریزنمونه‌های برگ و هیپوکوتیل در محیط کشت MS با غلظت‌های متفاوت از تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی کشت شدند. ریزنمونه‌ها در بیشتر سطوح ترکیب‌های مورد استفاده کالوس‌زایی کردند، به‌طوری که بیشترین حجم کالوس تولید شده در مجموع تمام تیمارهای بکار گرفته شده برای هر دو ریزنمونه، در غلظت ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D به همراه ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BA در ریزنمونه برگ بدست آمد و کمترین حجم کالوس مربوط به ریزنمونه هیپوکوتیل و تیمار هورمونی ۲ میلی‌گرم در لیتر NAA به همراه ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BA بوده‌است. در تحقیقی که با عنوان تأثیر نوع ارقام، ریزنمونه‌های مختلف و تنظیم‌کننده‌های رشد در میزان القاء کالوس و باززایی گیاه شاهدانه تحت تیمارهای Kin، Dicamba، 2,4-D و NAA انجام شد، بیشترین کالوس‌زایی و ریشه‌زایی کالوس را در ریزنمونه دمبرگ بدست آوردند، اما هیچ باززایی از ریزنمونه‌شان انجام نشد (Lusarkiewicz-Jarzina *et al*., 2005). همچنین در تحقیقی دیگر روی گیاه شاهدانه، از محیط کشت MS حاوی غلظت‌های مختلف IAA، IBA، NAA و 2,4-D در ترکیب با ۱ میکرومولار از TDZ برای باززایی گیاه شاهدانه از ریزنمونه برگ استفاده کردند. بهترین کالوس در غلظت ۰/۵ میکرومولار NAA به همراه ۱ میکرومولار TDZ بدست آمد. بیشترین درصد القاء ساقه در غلظت ۰/۵ میکرو مولار TDZ بود (Lata *et al*., 2010)، که با نتایج این تحقیق مطابقت نداشته است. در این تحقیق بیشترین و کمترین وزن تر کالوس تولید شده به‌ترتیب مربوط به ریزنمونه برگ در تیمار ۱ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D به همراه ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BA و ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D در ریزنمونه هیپوکوتیل بوده‌است. طی تحقیقی، Feeney و Punja (۲۰۰۳) تنها ریشه‌زایی از ریزنمونه برگ را گزارش کردند و هیچ ساقه‌زایی مشاهده نکردند. آنان همچنین گزارش کردند که کالوس‌های شاهدانه به‌راحتی ریشه تولید می‌کنند اما پاسخی برای تشکیل ساقه نمی‌دهند، که کاملاً با نتایج ما مطابقت دارد، به‌طوری که ریشه‌زایی در کالوس بعضی از ریزنمونه‌ها (برگ و هیپوکوتیل) در سطوح مختلف 2,4-D و NAA به همراه BA مشاهده شد. طی پژوهشی دیگر (Nugent *et al*., 2001) بیان کردند که 2,4-D و سایر اکسین‌های سنتتیک در تشکیل کالوس‌های جنین‌زا هیچ نتیجه‌ای ندارند که کاملاً با نتایج بدست آمده در تحقیق ما مطابقت دارد و کالوس‌های بدست‌آمده هیچکدام جنین‌زا نبوده و باززایی نیز در هیچ کالوسی اتفاق نیفتاده است. اکسین‌ها، به‌ویژه 2,4-D تشکیل جنین‌های سوماتیکی را القاء کرده و تقسیم سلولی را باعث می‌شوند، این تنظیم‌کننده‌های رشد در تشکیل کالوس نیز نقش داشته و از رشد جوانه‌های جانبی و ریشه جلوگیری می‌کنند. سیتوکنین‌ها نیز در غلظت‌های بالا تشکیل جوانه را موجب شده و از تشکیل ریشه جلوگیری می‌کنند (DeKlerk, 2006). طی پژوهشی نشان داده شده که باززایی بهینه کالوس از ریزنمونه گل‌آذین سوسن در محیط کشت دارای ۳ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D به همراه ۰/۲۵ میلی‌گرم در لیتر BA بدست آمده است (Chang *et al*., 1999). در آزمایشی دیگر، القای کالوس در ریزنمونه‌های فلسی ارنیتوگالوم در محیط کشت دارای ۴-۱ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D و ۲ میلی‌گرم در لیتر BA بدست آمد (Naik & Nayak 2005). نتایج این آزمایش‌ها بیانگر این مطلب هست که به نظر می‌رسد هورمون 2,4-D به همراه یک سیتوکنین برای کالوس‌زایی مناسب‌تر می‌باشد؛ که این مطلب کاملاً با نتایج این تحقیق مطابقت داشته است، به‌طوری که تحت تیمار 2,4-D به تنهایی ریزنمونه‌های برگ و هیپوکوتیل کالوس بسیار کم و ناچیزی تولید کردند ولی اضافه شدن هورمون IBA افزایش حجم کالوس را در ریزنمونه‌ها درپی داشت. در تحقیقی که (Yan *et al*., 2009) روی گیاه *Allium Chinense* انجام دادند، مشخص شد که بیشترین میزان تولید کالوس در محیط کشت همراه با هورمون‌های 2,4-D و BA (۱:۱) بوده و با

افزایش اثر اکسین یا سیتوکنین اثرات عکسی مشاهده شده است. طی انجام آزمایش‌های دیگر بهترین محیط کشت را برای کالوس‌زایی آنتوریوم، محیط MS حاوی ۴/۴ میکرومول BA و ۰/۵۰ میکرومول NAA معرفی کردند. همچنین در این تحقیق نشان داده شد که ترکیب ۱ میلی‌گرم در لیتر NAA به همراه ۰/۱ میلی‌گرم BA بهترین ساقه‌زایی را در ریزنمونه‌ها نشان داده‌اند (Vargas *et al*., 2004)، اما در این تحقیق هیچگونه باززایی از ریزنمونه‌ها تحت این تیمارهای هورمونی انجام نشده است که شاید به‌دلیل نوع ریزنمونه و غلظت هورمون‌ها باشد که در این تحقیق استفاده شده‌است.

منابع مورد استفاده

- Callaway, J.C. and Laakkonen, T.T., 1996. Cultivation of Cannabis oil seed varieties in Finland. Journal International Hemp Association, 3: 32-33.
- Chang, C., Chang-Tesrn, C., Tsai, Y.C. and Wei-Chin, C., 1999. A Tissue culture protocol for propagation of a rare plant, *Lilium speciosum* Thunb. var. *glorisoides* Baker. Botanical Bulletin of Academia Sinica, 41(2): 139-142.
- DeKlerk, G.J., 2006. Plant hormone in tissue culture. Plant Cell and Tissue Culture. Phytopathology Biochemical, 17-25.
- ElSohly, M.A., Holley, J.H., Lewis, G.S., Russell, M.H. and Turner, C.E., 1984. Constituents of *Cannabis sativa* L. XXIV: The potency of confiscated marijuana, hashish, and hash oil over a ten-year period. Journal of Forensic Sciences, 29(2): 500-514.
- Feeney, M. and Punja, Z.K., 2003. Tissue culture and Agrobacterium-mediated transformation of hemp (*Cannabis sativa* L.). *In Vitro* Cellular & Developmental Biology-Plant, 39(6): 578-585.
- Hendriks, H., Malingre, T. and Batterman, S., 1975. Mono and sesquiterpene hydrocarbons of the essential oil of *Cannabis sativa* L. Phytochemistry Journal, 14(3): 814-830.
- Kosiorek, P., Hryniewicz, A., Bialuk, L., Zawwadzka, A. and Winnicka, M.M., 2004. Cannabinoids alter recognition memory in rat. Journal Pharmacological Reviews, 55: 903-910.
- Lata, H., Chandra, S., Khan, I.A. and Elsohly, M.A., 2009. Propagation through alginate encapsulation of axillary buds of *Cannabis sativa* L. an important medicinal plant. Physiology and Molecular Biology of Plants, 15(1): 79-86.
- Lata, H., Chandra, S., Khan, I.A. and Elsohly, M.A., 2010. High frequency plant regeneration from leaf derived callus of high Δ9-tetrahydrocannabinol yielding *Cannabis sativa*. Planta Medica, 76(14): 1629-1633.
- Lusarkiewicz-Jarzina, A., Ponitka, A. and Kaczmarek, Z., 2005. Influence of cultivar, explant source and plant growth regulator on callus induction and plant regeneration of *Cannabis sativa*. Acta Biologica Cracoviensia-Series Botanica, 47(2): 145-151.
- Mand, Ch. and Mediavilla, V., 1998. Factor influencing the yield and quality of hemp (*Cannabis sativa* L.) essential oil. Journal of the International Hemp Association, 5: 16-20.
- Naik, P.K. and Nayak, S., 2005. Different modes of plant regeneration an factors affecting *in vitro* bulblet production in *Ornithogalum virens*. Science Asia, 31: 409-414.
- Nugent, G., Chandler, S.F., Whiteman, P. and Stevenson, T.W., 2001. Somatic embryogenesis in *Eucalyptus globulus*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 67: 85-88.
- Raharjo, T.J., Eucharia, O., Chang, W.T. and Verpoorte, R., 2006. Callus induction and phytochemical characterization of *Cannabis sativa* cell suspension culture. Indonesian Journal of Chemistry, 6(1): 70-74.
- Small, E. and Cronquist, A., 1976. A practical and natural taxonomy for *Cannabis*. Taxon Journal, 25(4): 405-435.
- Vargas, T.E., Mejias, A. Oropeza, M. and De Garica, E., 2004. Plant regeneration of *Anthurium andreanum* CV Rubrun. Electionic Journal of Biotechnolgogy, 72: 285-289.
- Wang, X., Tang, C., Yang, X. and Gao, W., 2008. Characterization, amino acid composition and vitro digestibility of hemp (*Cannabis sativa* L) proteins. Food Chemistry, 107: 11-18.
- Wills, S., 1998. *Cannabis* use and abuse by man: a Historical perspective: 1-28. In: Brown, D.T. (Ed.), Cannabis: The Genus Cannabis, Harwood Academic Publishers, Amsterdam, 272p.
- Yan, M.M., Xu, C., Kim, C.H. and Um, Y.C., 2009. Effects of explant type, culture media and growth regulators on callus induction and plant regeneration of Chines jiaotou (*Allium Chinense*). Scientia Horticulturae, 123: 124-128.

In vitro callus induction and regeneration of medicinal plant *Cannabis sativa* L.

M. Movahedi[1], V. Ghasemiomran[2*] and S. Torabi[3]

1- M.Sc. Student, Department of Plant Breeding, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran
2*- Corresponding author, Genetics and Agricultural Biotechnology Institute of Tabarestan, Agriculture and Natural Resources University of Sari, Iran, E-mail: ghasemiomran@yahoo.com
3- Department of Plant Breeding and Biotechnology, Science and Research, Islamic Azad University, Tehran, Iran

Received: April 2015 Revised: August 2015 Accepted: November 2015

Abstract

The present study was carried out to investigate the possibility of micro-propagation and to determine the optimal medium composition and combination of *Cannabis sativa* L. growth regulators under *in vitro* conditions. Seeds were surface-sterilized and then cultured on MS basal medium. One month later, leaf and hypocotyl explants, obtained from the seedlings grown at *in vitro* condition, were used in MS culture medium containing NAA hormone (0.5, 1, 2 and 3 mg/l) either alone or in combination with 0.5mg/l BA; and 2,4-D (0.1, 0.2, 0.5 and 1 mg/l) alone or in combination with 0.5mg/l BA. Callus formation was the response of explants in most media. Direct shoot regeneration from explants was not observed but shoot induction from callus was seen only in 0.1 mg/L 2,4-D+ 0.5 mg/L BA. The highest volume of induced callus was formed on MS medium 0.1 mg/L 2,4-D+ 0.5 mg/L BA using leaf as explant. Root induction from some explants was observed in different treatments. The highest fresh weight of calli belonged to the leaf explant cultured on MS medium containing 1 mg/L 2,4-D+ 0.5 mg/L BA. Callus induction and rooting occurred easily and the explants did not respond well to regeneration.

Keywords: *Cannabis sativa* L., micropropagation, callus, explant, PGRs.