دوماهنامه علمی-پژوهشی تحقیقات گیاهان دارویی و معطر ایران
جلد ۳۰، شماره ۶، صفحه ۹۵۳-۹۴۳ (۱۳۹۳)

تأثیر ترکیب‌های هورمونی بر القاء کالوس گیاه دارویی کرفس کوهی (*Kelussia odoratissimia* Mozaff.) و بررسی رشد آن در محیط کشت مایع

لیلا رازقی[۱*]، مجید عزیزی[۲]، سید مهدی زیارت‌نیا[۳]، عبدالرضا باقری[۴] و سیدحسین نعمتی[۵]

۱*- نویسنده مسئول، دانشجوی دکترا، گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد
پست الکترونیک: Leila.ry@gmail.com
۲- استاد، گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد
۳- استادیار، پژوهشکده علوم و صنایع غذایی خراسان رضوی، مشهد
۴- استاد، گروه بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد
۵- استادیار، گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد

تاریخ دریافت: آبان ۱۳۹۱ تاریخ اصلاح نهایی: اردیبهشت ۱۳۹۲ تاریخ پذیرش: اردیبهشت ۱۳۹۲

چکیده

کرفس کوهی (*Kelussia odoratissima* Mozaff.) از تیره چتریان از گونه‌های شناخته شده دارویی بومی مراتع ایران بوده که تاکنون وجود آن در سایر مناطق جهان گزارش نشده‌است. به‌دلیل برداشت بی‌رویه آن در اوایل دوره رویشی و زمان نسبتاً زیاد مورد نیاز برای استقرار و تولید بذر، این گیاه فرصت تجدید حیات و تولید بذر را نداشته و به همین دلیل از گیاهان در معرض انقراض ایران محسوب می‌شود. پیشرفت‌های صورت گرفته در زمینه کشت بافت می‌توانند کارآیی بسیاری در تکثیر گیاهان در معرض خطر انقراض و همچنین افزایش توان ژنتیکی گیاهان دارویی داشته باشند. به‌منظور بررسی تأثیر تیمارهای هورمونی بر القای کالوس از گیاهچه‌های استریل ریزنمونه تهیه گردید. تیمارها شامل محیط کشت پایه MS به همراه سطوح مختلف هورمون [2-4-D (۰/۵، ۱ و ۲ یا a1، a2، a3) + Kin (۰، ۰/۵ و ۱ یا b1، b2، b3)] و محیط کشت پایه MS به همراه [NAA (۰/۵، ۱ و ۲ یا a4، a5، a6) + BA (۰، ۰/۵ و ۱ یا b4، b5، b6)] بود. پس از یک ماه میزان رشد، وزن و درصد کال‌زایی اندازه‌گیری و مقایسه شد. با در نظر گرفتن صفات فوق بیشترین اندازه کالوس (۶/۴۱ میلی‌متر) و بیشترین درصد کال‌زایی (۹۳٪) در غلظت [2,4-D (۲mgl^{-1}) + Kin (۰/۵mgl^{-1})] و بیشترین وزن کالوس (۰/۱۴۰۸ گرم) در غلظت [(۱mgl^{-1}) NAA + BA (۰/۵mgl^{-1})] بدست آمد. سپس به‌منظور بررسی کالوس ها در شرایط محیط مایع و ایجاد سوسپانسیون سلولی، ترکیب های هورمونی برگزیده [2-4-D(۲) + (۰/۵) Kin] و [(۲) NAA + (۰/۵) BA] در دو محیط MS و B5 با سه سطح آنتی‌اکسیدان (PVP، PVPP و PVP + PVPP) جمعاً ۱۲ تیمار در ۴ هفته متوالی ارزیابی شدند. نتایج تفاوت معنی‌داری را در سطح ۵٪ بین عوامل مؤثر بر وزن خشک سلول نشان داد، در حالی‌که این عوامل بر روی وزن تر تأثیر معنی‌داری نداشتند. بیشترین وزن تر و خشک مربوط به محیط B5 با PVP (۰/۱) به میزان ۱/۶۹۴۰ گرم بود. وزن تر و خشک سلول در طی هفته‌های متوالی روند افزایشی را نشان داد.

واژه‌های کلیدی: القاء کالوس، *Kelussia odoratissima* Mozaff.، کشت سلولی، ترکیب هورمونی.

مقدمه

گیاهان اهمیت فراوانی در توسعه جوامع داشته‌اند و تحقیقات وسیعی برای یافتن فرآورده‌ها و مواد طبیعی دارویی گیاهی در طول تاریخ انجام شده‌است. در ایران گیاهان دارویی بومی ارزشمندی وجود دارد که لازم است نسبت به شناسایی مواد مؤثره این گیاهان آزمایش‌هایی صورت بگیرد تا در آینده بتوان به بهترین نحو ممکن از این گیاهان دارویی، اندمیک و ارزشمند بهره‌برداری نمود و اقدام به فرآوری در مقیاس صنعتی از آنها نمود (Saeedi & Omidbaig, 2009). کرفس کوهی (*Kelussia odoratissima* Mozaff.) از تیره چتریان که در زبان فارسی کلوس هم نامیده می‌شود (مظفریان، ۱۳۸۶) از گونه‌های شناخته شده دارویی مراتع ایران بوده که تاکنون وجود آن در سایر مناطق جهان گزارش نشده‌است. پراکنش جغرافیایی کرفس کوهی در برخی از قسمت‌های زاگرس در ارتفاع ۲۵۰۰ متر از سطح دریا شامل استان‌های اصفهان، چهارمحال و بختیاری و لرستان می‌باشد. دما در این نواحی معمولاً پایین‌تر از ۲۰ درجه سانتی‌گراد و شامل ۱۲۷ روز یخبندان با دماهایی که در پاییز و زمستان به زیر صفر می‌رسد، است (Etemadi *et al*., 2010). این گیاه چندساله و بسیار معطر است، ساقه آن به ارتفاع ۱۲۰ تا۲۰۰ سانتی‌متر و استوانه‌ای، برگ‌ها قاعده‌ای، بزرگ و دوبار شانه‌ای، گل‌آذین آن بزرگ و چتر انتهایی آن کاملاً بارور است. این گیاه در اوایل دوره رویشی به‌دلیل فشردگی برگ‌های قاعده‌ای به شکل غنچه می‌باشد و به شدت توسط مردم محلی برداشت می‌گردد (Salimi *et al*., 2010).

به‌طور سنتی سالیان درازی است که از کرفس کوهی به شکل‌های مختلف استفاده شده‌است. مردم محلی معتقدند که این گیاه دارای اثرات ضددرد، ضدالتهاب، آرام‌بخش و ضدسرفه می‌باشد. یافته‌های جدید علمی نیز تأیید می‌کند که فلاونوئیدها به‌عنوان بخش مهمی از ترکیب‌های این گیاه، دارای اثرات ضدالتهابی، ضدویروس، ضددیابت، ضدسرطان و ضدسم بوده که به‌طور عمده در بذر، ساقه و گل‌آذین گیاه تجمع می‌یابند (Saeedi & Omidbaig, 2009). تحقیقات توسط Omidbaigi و همکاران (۲۰۰۸) نشان داد که اسانس بخش‌های هوایی این گیاه محتوی ۲۳ نوع ترکیب ارزشمند مختلف که عمده‌ترین آنها z– لگوستلید است، می‌باشد. این بدین معنی است که کلوسیا می‌تواند به‌عنوان منبع بالقوه z– لگوستلید استفاده بشود. به‌علاوه اینکه در برخی بررسی‌ها خاصیت آنتی‌اکسیدانی این گیاه گزارش شده‌است. Etemadi و همکاران (۲۰۱۰) روشهای افزایش جوانه‌زنی بذر کرفس کوهی را بررسی کردند. نتایج آزمایش آنها نشان داد که سرمادهی طولانی (۴۵ روز) درصد جوانه‌زنی و میانگین زمان جوانه‌زنی را در مقایسه با زمان‌های کوتاه‌تر سرمادهی تحریک می‌کند. البته کاربرد اسیدجیبرلیک هیچ اثری در جوانه‌زنی بذر کلوس نداشت. استخراج و شناسایی ترکیب شیمیایی اسانس کرفس کوهی در سه اکوتیپ مختلف توسط Salimi و همکاران (۲۰۱۰) انجام شد. Saeedi و Omidbaig (۲۰۰۹) میزان و ترکیب اسیدهای چرب، مواد فنولیکی و اسانس بذر کلوس را بررسی کردند. Shahrani و همکاران (۲۰۰۷) اثر عصاره متانولی گیاه کرفس کوهی بر میزان ترشح اسید و پپسین معده در موش صحرایی را بررسی کردند. آنان دریافتند که استفاده از گیاه کرفس کوهی در مصرف‌کنندگان این گیاه سبب کاهش اسید معده می‌گردد و ممکن است در ناراحتی‌های گوارشی مفید باشد. Ahmadi و همکاران (۲۰۰۶) فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره گیاه کرفس کوهی در مدل و سیستم‌های غذایی را بررسی کردند و نشان دادند که فعالیت عصاره گیاه در مدل تیوسیانات کمتر از بتا–هیدروکسی تولوئن ولی بیشتر از آلفا–توکوفرول است.

Sarkheil و همکاران (۲۰۰۹) نشان دادند که تیمار هورمونی ۲ و۴ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D و ۰/۲۵ و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP بهترین ترکیب‌های هورمونی و نیز هیپوکوتیل و مریستم انتهایی بهترین ریزنمونه‌ها در کال‌زایی رازیانه هستند. Saranga و Janick (۱۹۹۰) کاینتین و 2,4-D را برای القای کالوس در کرفس (*Apium graveolens*) مورد استفاده قرار داد و کالوس فشرده را که رنگ زرد روشن داشت، بدست آورد. Afify و همکاران (۲۰۱۱) بیشترین مقدار کالوس القاء شده از بافت هیپوکوتیل رازیانه را روی محیط MS غنی شده با 2,4-D به غلظت ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر و کاینتین به غلظت‌های ۰/۵ یا ۱/۰ میلی‌گرم در لیتر بدست آوردند.

به‌دلیل برداشت بی‌رویه آن در اوایل دوره رویشی، تقاضای زیاد در بازار محلی، زمان نسبتاً زیاد استقرار و تولید بذر، این گیاه فرصت تجدید حیات و تولید بذر را نداشته و به همین دلیل گسترش جغرافیایی و تراکم

جمعیت این گیاه در دهه‌های اخیر به شدت کاهش یافته و حیات آن در معرض خطر جدی قرار گرفته است، به‌طوری که یکی از گیاهان در حال انقراض ایران محسوب می‌شود (Jalili & Jamzad, 1999). از آنجایی‌که امروزه کشت بافت گیاهی از اهمیت و ارزش خاصی در دنیا برخوردار بوده و صنایع مختلف مانند صنایع دارویی، استفاده از کشت‌های بافت گیاهی و جایگزین کردن آن در برخی موارد به جای گیاهان طبیعی را در دستور کار خود قرار داده‌اند و با توجه به اهمیت دارویی گیاه کرفس کوهی و به‌منظور جلوگیری از انقراض این گیاه علاوه‌بر کوشش در جهت حفظ رویشگاه‌های موجود و توسعه آنها، می‌توان از روشهای کشت بافت و کشت سلول که روشهای نوینی می‌باشند بهره جست. بررسی منابع موجود نشان می‌دهد که تاکنون بجز چند مورد ذکر شده در بالا بررسی و پژوهش علمی در دنیا و ایران بر روی این گیاه ارزشمند و بومی کشورمان انجام نشده است، بنابراین مطالعه حاضر با هدف بررسی امکان القاء کالوس و بررسی رشد آن در محیط مایع انجام شد.

مواد و روشها

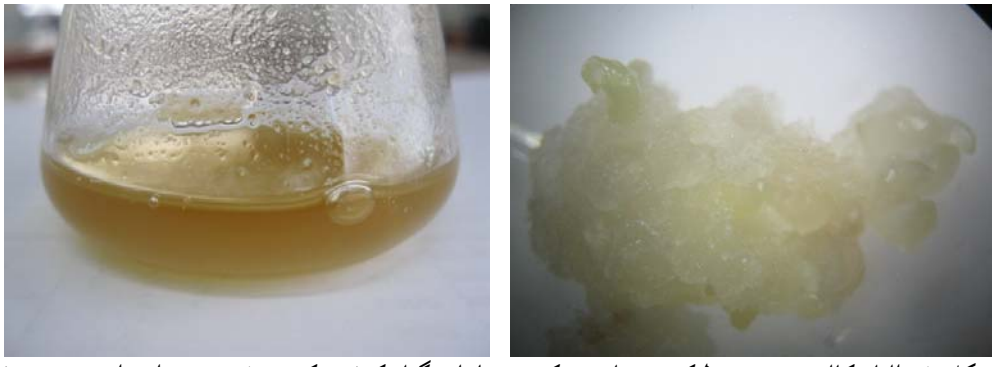
جوانه‌زنی

بذرهای گیاه کلوس از ارتفاعات استان لرستان در اواخر تابستان جمع‌آوری شد. برای استریل کردن بذرها ابتدا چند قطره مایع ظرفشویی به ظرف محتوی بذر و آب افزوده و روی شیکر به مدت یک ساعت قرار داده شد. پس از چند بار آبکشی و شستن، بذرها در الکل ۷۰٪ به مدت ۳۰ ثانیه تکان داده شدند و بعد به‌وسیله آب مقطر استریل شستشو و در محلول هیپوکلریت سدیم ۰/۵٪ به مدت ۲۰ دقیقه قرار گرفتند. در نهایت ۳ بار شستشو با آب مقطر استریل انجام شد. برای جوانه‌زنی و تولید گیاهچه برای تهیه ریزنمونه، بذرها در محیط کشتی شامل ساکارز و آگار هر کدام به‌ترتیب به میزان ۵ و ۷ گرم در لیتر کشت شدند. سپس میکروتیوپ‌های حاوی بذر و محیط کشت در یخچال (دمای ۴ درجه سانتی‌گراد) به مدت ۲ ماه به‌منظور گذراندن دوره سرمایی قرار گرفتند. پس از برطرف شدن نیاز سرمایی، بذرها زیر هود استریل به لوله‌های آزمایش محتوی همان محیط کشت قبلی (محیط کشت جوانه‌زنی) انتقال یافته و در اتاقک رشد با دمای ۱۵°C برای ظهور و رشد گیاهچه‌های استریل قرار گرفتند. به‌علت پایین بودن درصد جوانه‌زنی بذرها و کم بودن تعداد گیاهچه‌های استریل تولید شده، از همه بخش‌های گیاهچه‌ها به‌عنوان ریزنمونه استفاده شد.

القاء کالوس

برای مقایسه ترکیب‌های هورمونی مناسب محیط کشت‌ها به‌منظور القاء کالوس تیمارها شامل محیط کشت پایه MS به همراه 2,4-D (۰/۵، ۱ و ۲ یا a1، a2، a3) + Kin (۰، ۰/۵ و ۱ یا b1، b2، b3) و محیط کشت پایه MS به همراه NAA (۰/۵، ۱ و ۲ یا a4، a5، a6) + BA (۰، ۰/۵ و ۱ یا b4، b5، b6) بود (شکل ۱). جمعاً ۱۸ ترکیب هورمونی با ۵ تکرار بود و آزمایش به‌صورت طرح کاملاً تصادفی چند مشاهده‌ای انجام شد. در هر پتری تعداد ۴ ریزنمونه قرار داده و هر پتری به منزله یک تکرار محسوب شد. صفات مورد اندازه‌گیری پس از گذشت یک ماه، درصد کال‌زایی، اندازه کالوس و وزن کالوس‌ها بودند.

لازم به تذکر این مطلب است که برای اندازه‌گیری اندازه کالوس دو قطر عمود بر هم کالوس‌ها ثبت شده و بعد میانگین آنها به‌عنوان اندازه ذکر گردید (Aneja, 2001).



شکل ۱- القاء کالوس در محیط‌کشت جامد و کشت سلولی گیاه کرفس کوهی (به‌ترتیب از راست به چپ)

رشد کالوس در محیط مایع و ایجاد سوسپانسیون سلولی

به‌منظور بررسی رشد کالوس در شرایط مایع و ایجاد سوسپانسیون سلولی از دو محیط کشت MS و B5 استفاده شد. بدین منظور بهترین ترکیب‌های هورمونی آزمایش کال‌زایی که سبب بیشترین اندازه و وزن کالوس شده بودند، انتخاب گردیدند (ترکیب ۱ (۰/۵mgl^{-1}) + Kin (۲mgl^{-1}) 2,4-D و ترکیب ۲ (۲mgl^{-1}) + NAA (۰/۵mgl^{-1}) BA). از آنجایی‌که کالوس‌ها در محیط کشت آگاردار عارضه قهوه‌ای شدن را نشان می‌دادند، از ۳ سطح آنتی‌اکسیدان (PVP، PVPP و PVP + PVPP) هر کدام به میزان ۰/۱mgl^{-1} استفاده شد (جمعاً ۱۲ تیمار با ۸ تکرار). ۲۰ میلی‌لیتر از محیط کشت‌های مربوط به هر تیمار پس از استریل شدن در ارلن‌های ۱۰۰ml توزیع شدند و بعد ۰/۲ گرم از کالوس‌های حاصل از محیط کشت جامد که دارای بافت و رنگ یکنواخت و خردشونده بودند توزین و در هر ارلن انکوبه شدند. در نهایت ارلن‌ها بر روی شیکر با سرعت ۱۲۰rpm و دمای ۲۰°C درون انکوباتور شیکر یخچال‌دار قرار گرفتند. پس از گذشت یک هفته از هر تیمار ۲ ارلن به‌صورت تصادفی انتخاب و وزن تر و خشک سلول‌ها اندازه‌گیری شد، این عمل به مدت ۴ هفته ادامه داشت. اندازه‌گیری وزن تر سلول‌ها با استفاده از قیف بوخنر و وزن خشک آنها به‌وسیله نگهداری تا رسیدن به وزن ثابت در دمای ۴۰°C انجام شد.

تجزیه و تحلیل آماری

برای تجزیه و تحلیل داده‌های مربوط به القاء کالوس، آزمایش به‌صورت طرح کاملاً تصادفی چند مشاهده‌ای با استفاده از نرم‌افزار آماری SAS و مقایسه میانگین تیمارها با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح ۵٪ انجام شد و برای تجزیه و تحلیل داده‌های مربوط به محیط کشت مایع، داده‌ها به‌صورت آزمایش فاکتوریل در زمان تجزیه تحلیل گردید و از رویه Mixed نرم‌افزار SAS استفاده شد. رسم نمودارها از طریق نرم‌افزار Excel انجام شد .

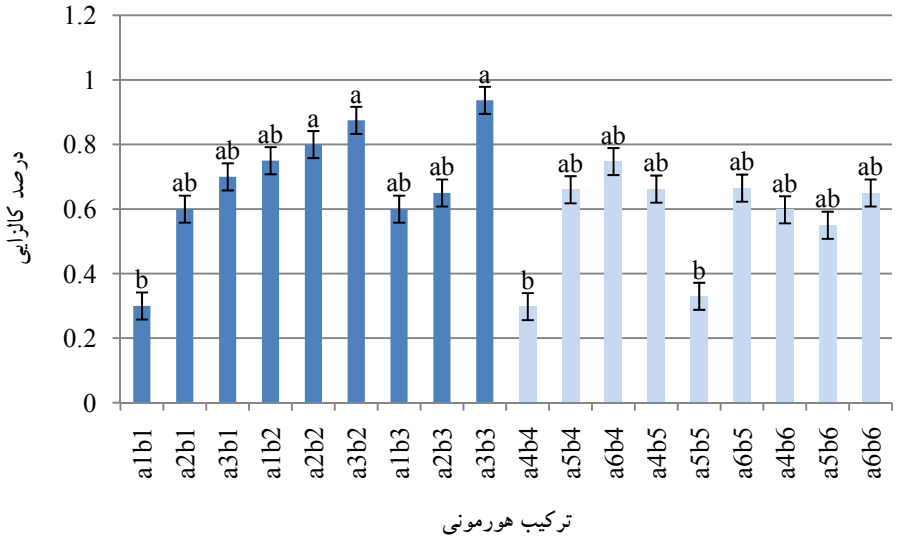
نتایج

بهینه‌سازی ترکیب هورمونی برای القاء کالوس

نتایج تجزیه واریانس اثر تیمارهای ترکیب‌های مختلف هورمونی بر اندازه کالوس، حکایت از تفاوت‌های معنی‌دار بین سطوح مختلف هورمونی در سطح ۵٪ داشت. نتیجه تجزیه واریانس در خصوص درصد کال‌زایی وجود اختلاف معنی‌دار ($p \leq$ ۰/۰۵) را بین تیمارهای مختلف نشان داد. همچنین با استفاده از آزمون دانکن برای پیدا نمودن ترکیب هورمونی برتر، مشخص گردید که تیمار a3b3 با ترکیب (۲mgl^{-1}) 2,4-D + Kin (۱mgl^{-1}) حداکثر پاسخ کال‌زایی (۹۳/۷٪) را به‌دنبال داشته است و کمترین درصد کال‌زایی در تیمارهای a4b4 (۲۹/۸٪)، a1b1 (۳۰٪) و a5b5 (۳۳٪) رخ داده‌است. باوجوداین، کاربرد ترکیب‌های 2,4-D + Kin درصد کال‌زایی بهتری را نسبت به کاربرد ترکیب‌های BA +NAA ایجاد کردند (شکل ۲).

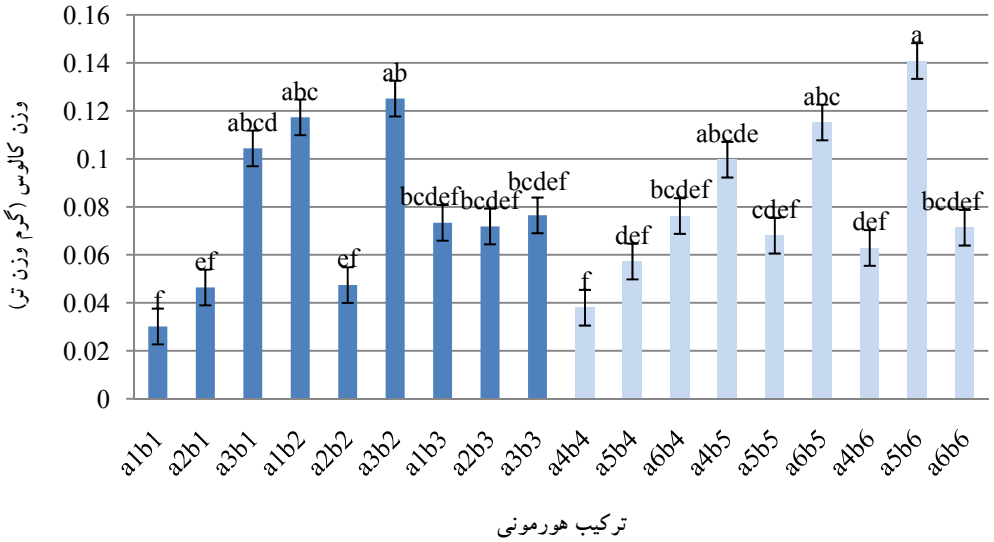
همچنین بررسی نتایج تجزیه واریانس اثر تیمارهای مختلف هورمونی بر وزن کالوس بیانگر وجود اختلاف معنی‌دار بین ترکیب‌های مختلف هورمونی بود ($p \leq$ ۰/۰۵). تیمار a5b6 (۱mgl^{-1}) NAA + (۰/۵mgl^{-1}) BA) بیشترین میانگین وزن کالوس (۰/۱۴ گرم) را تولید کرد، در حالی‌که تیمارهای a1b1 (۰mgl^{-1}) Kin + (۰/۵mgl^{-1}) 2,4-D) و a4b4 (۰mgl^{-1}) NAA + (۰/۵mgl^{-1}) BA) کمترین میانگین وزن کالوس را به‌ترتیب با ۰/۰۳۰۱ و ۰/۰۳۸ گرم ایجاد کردند و تیمارهای ترکیب هورمونی Kin + 2,4-D و BA + NAA تقریباً روند مشابهی را نشان می‌دهد که بیانگر عدم تفاوت فاحش در استفاده از دو ترکیب مزبور می‌باشد (شکل ۳).

مقایسه اثر سطوح مختلف تنظیم‌کننده‌های رشد بر قطر کالوس (اندازه) با استفاده از آزمون دانکن، بر مزیت ترکیب هورمونی (۰/۵mgl^{-1}) Kin + (۲mgl^{-1}) 2,4-D با میانگین دو قطر عمود بر هم (اندازه) ۶/۴۱۳ میلی‌متر تحت عنوان تیمار a3b2، نسبت به سایر ترکیب‌ها دلالت داشت، هر چند بین تیمارهای a3b1 و a6b5 و این تیمار اختلاف معنی‌داری وجود ندارد (اندازه کالوس در این تیمار در مدت یک‌ماه نسبت به ضعیف‌ترین تیمار ۲ برابر شد)، و این مبین این مطلب است که بالاترین سطح اکسین در این آزمایش (۲ میلی‌گرم بر لیتر) به همراه سایتوکنین (۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر) صرف‌نظر از نوع اکسین و سایتوکنین بیشترین اندازه کالوس را ایجاد کرده‌است. همچنین این آزمون نشان داد که رشد قطری کالوس در تیمار a1b1 (۰mgl^{-1}) Kin + (۰/۵mgl^{-1}) 2,4-D کمترین اندازه (۳/۳۶۱ میلی‌متر) را داراست (شکل ۴). البته بین این تیمار و تیمار a4b4 اختلاف معنی‌داری وجود ندارد. تیمارهای دو ترکیب هورمونی (2,4-D + Kin) و (NAA + BA) روند تقریباً مشابهی را در اندازه کالوس‌ها نشان می‌دهند.



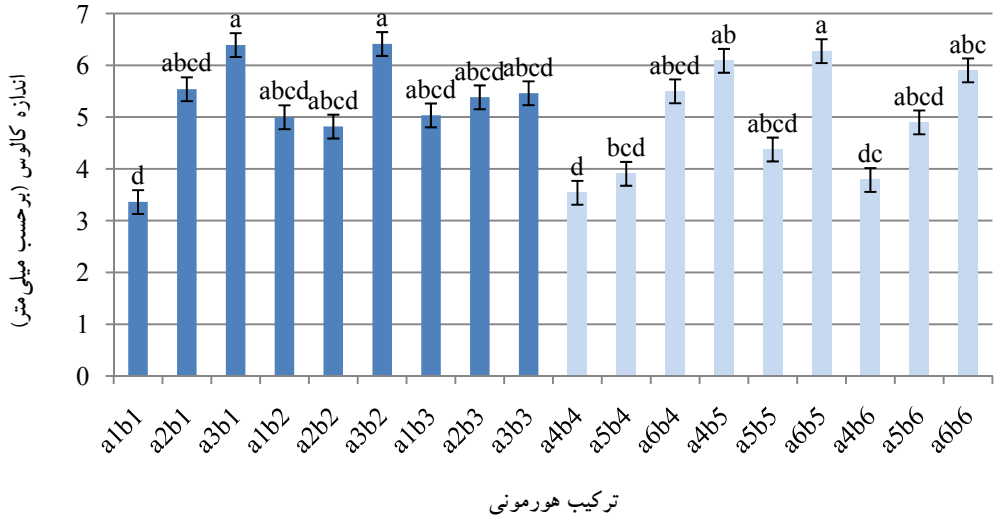
شکل ۲- اثر ترکیب‌های مختلف هورمونی بر درصد کال‌زایی کرفس کوهی پس از یک‌ماه

میانگین‌های دارای حرف و یا حروف مشترک در سطح α=۰/۰۵ اختلاف معنی‌داری ندارند (تیمارها شامل محیط‌کشت پایه MS به همراه 2,4-D (۰/۵، ۱ و ۲ یا a1، a2) + Kin (۰، ۰/۵ و ۱ یا b1، b2، b3) و محیط کشت پایه MS به همراه NAA (۰/۵، ۱ و ۲ یا a4، a5، a6) + BA (۰، ۰/۵ و ۱ یا b4، b5، b6) می‌باشد).



شکل ۳- اثر ترکیب‌های مختلف هورمونی بر وزن کالوس کرفس کوهی پس از یک‌ماه

میانگین‌های دارای حرف و یا حروف مشترک در سطح α=۰/۰۵ اختلاف معنی‌داری ندارند.



شکل ۴- اثر ترکیب‌های مختلف هورمونی بر اندازه کالوس کرفس کوهی پس از یک‌ماه

میانگین‌های دارای حرف و یا حروف مشترک در سطح α=۰/۰۵ اختلاف معنی‌داری ندارند.

اثر عوامل مختلف بر رشد کالوس در محیط کشت مایع

نتایج حاصل از اندازه‌گیری وزن تر و خشک کالوس در طی ۴ هفته در دو محیط کشت مایع MS و B5 با دو ترکیب هورمونی (۰/۵mgl^{-1}) Kin + (۲mgl^{-1}) 2,4-D و (۲mgl^{-1}) NAA + (۰/۵mgl^{-1}) BA و ۳ سطح آنتی‌اکسیدان (PVP، PVPP و PVP + PVPP) بررسی شد. نتایج تجزیه واریانس اثر ۳ عامل محیط کشت، ترکیب هورمونی، آنتی‌اکسیدان و اثر متقابل آنها به غیر از اثر متقابل آنتی‌اکسیدان × هفته بر وزن خشک کالوس نشان‌دهنده تفاوت معنی‌داری در سطح ۵٪ می‌باشد.

جدول ۱- تجزیه واریانس اثر عوامل مختلف بر روی وزن تر و خشک کالوس در محیط کشت مایع

منابع تغییرات	درجه آزادی	F مقدار		P ارزش	
		وزن تر	وزن خشک	وزن تر	وزن خشک
هورمون	۱	۰/۳۴	۷۸/۹۴	۰/۵۶۷۸ ns	<۰/۰۰۰۱ ❊
محیط کشت	۱	۰/۰۱	۶/۱۹	۰/۹۴۱۸ ns	۰/۰۲۰۵ ❊
هورمون × محیط کشت	۱	۰/۱	۷/۹۵	۰/۷۴۹۷ ns	۰/۰۰۹۷ ❊
آنتی‌اکسیدان	۲	۰/۰۳	۶/۱۳	۰/۹۶۶۵ ns	۰/۰۰۷۴ ❊
هورمون × آنتی‌اکسیدان	۲	۲/۳۶	۱۷/۴۵	۰/۱۱۶۸ ns	<۰/۰۰۰۱ ❊
محیط کشت × آنتی‌اکسیدان	۲	۲/۰۴	۴/۳۶	۰/۱۵۳۴ ns	۰/۰۲۴۹ ❊
هفته	۳	۳/۷۶	۴۶/۵۵	۰/۰۲۴۷۸ ❊	<۰/۰۰۰۱ ❊
هورمون × هفته	۳	۰/۲۸	۶/۴	۰/۸۴۰ ns	۰/۰۰۲۶ ❊
محیط کشت × هفته	۳	۰/۳۵	۴/۷۰	۰/۷۹۱۲ ns	۰/۰۱۰۶ ❊
آنتی‌اکسیدان × هفته	۶	۰/۱۸	۰/۹۲	۰/۹۸۰۷ ns	۰/۴۹۸۹ ns

❊: معنی‌دار در سطح ۵٪

ns: بی‌معنی

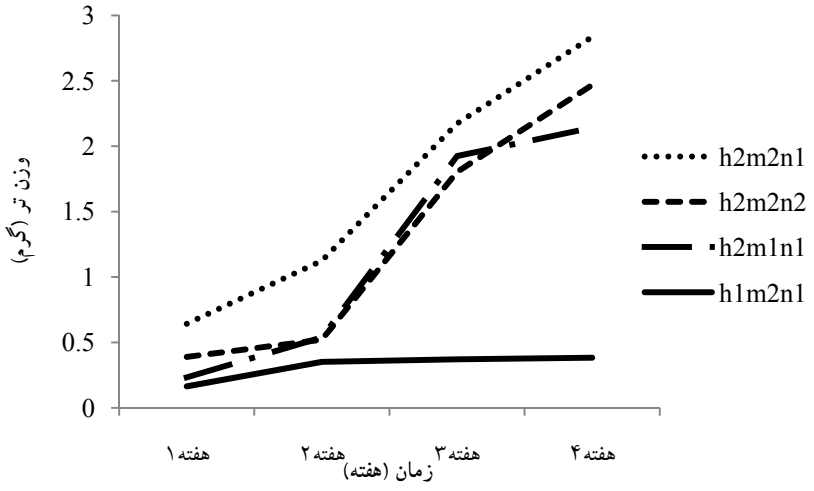
مقایسه میانگین اثر نوع ترکیب هورمونی بر وزن خشک نشان می‌دهد که از بین دو ترکیب هورمونی مورد استفاده، ترکیب هورمونی ($۲mgl^{-1}$) NAA + ($۰/۵mgl^{-1}$) BA) با میانگین ۰/۱۱۶۱ گرم به ازای ۲۵ میلی‌لیتر محیط کشت بر ترکیب هورمونی ($۰/۵mgl^{-1}$) Kin + ($۲mgl^{-1}$) 2,4-D (۰/۰۷۸۰۴) برتری دارد و باعث ۱/۵ برابر افزایش وزن خشک شده‌است. دیگر اثر اصلی مؤثر بر وزن خشک، اثر محیط کشت است که حکایت از بهینه بودن محیط کشت B5 (۰/۱۰۲۴) نسبت به MS (۰/۰۹۱۷۵) دارد، هرچند اختلاف موجود بین دو محیط کشت از این نظر معنی‌دار نیست. مقایسه میانگین‌ها در مورد اثر عامل اصلی دیگر (آنتی‌اکسیدان) مؤثر بر وزن خشک نشان‌دهنده مناسب بودن PVP با میانگین وزن خشک ۰/۱۰۶۲ نسبت به PVPP و همچنین ترکیب هر دو آنتی‌اکسیدان (به‌ترتیب ۰/۰۸۷۸۱ و ۰/۰۹۷۲۵) می‌باشد. در مورد زمان نیز مقایسه میانگین‌ها نشان می‌دهند که از هفته اول تا چهارم وزن خشک روند افزایشی داشته، به‌طوری که در هفته اول میانگین وزن خشک ۰/۰۶۴۲۵ گرم بوده که در هفته چهارم به ۰/۱۳۱۶ رسیده است، یعنی وزن خشک پس از مدت چهار هفته تقریباً ۲ برابر شده‌است.

مقایسه میانگین‌ها در مورد اثرات متقابل عوامل مؤثر بر وزن خشک نیز نشان می‌دهد که اثر متقابل آنتی‌اکسیدان و هورمون در سطح ۵٪ معنی‌دار است، به‌طوری که بیشترین وزن خشک را ترکیب هورمونی NAA + BA به همراه آنتی‌اکسیدان PVP با میانگین ۰/۱۴۲۴ گرم ایجاد کرده‌است و همین ترکیب هورمونی با هر سه سطح آنتی‌اکسیدان وزن خشک بیشتری نسبت به ترکیب هورمونی 2.4-D + Kin با این آنتی‌اکسیدان‌ها تولید کرده‌است. همان‌طور که در جدول ۱ مشخص است اثر متقابل هورمون و محیط کشت نیز در سطح ۵٪ معنی‌دار است، به‌طوری که ترکیب هورمونی ۲ (NAA+BA) به همراه محیط کشت B5 با میانگین ۰/۱۲۷۵ گرم وزن خشک بیشتری تولید کرده و ترکیب هورمونی ۱ (2,4-D + Kin) در هر دو محیط کشت مورد آزمایش وزن تقریباً یکسان و کمتری (به‌ترتیب ۰/۰۷۸۷۵ و ۰/۰۷۷۳۳ گرم) در مقایسه با ترکیب هورمونی ۲ در هر دو محیط کشت ایجاد کرده‌است.

جدول ۱ اثر معنی‌دار متقابل بین محیط کشت و آنتی‌اکسیدان را بر وزن خشک نشان می‌دهد. بهترین وزن خشک در محیط کشت MS به همراه آنتی‌اکسیدان PVP با میانگین ۰/۱۱۰۷ گرم مشاهده شد. هر دو محیط کشت به همراه PVP در مقایسه با همین محیط کشت‌ها با دو نوع آنتی‌اکسیدان دیگر وزن خشک بیشتری ایجاد کرده‌اند. همان‌طور که جدول ۱ نشان می‌دهد اثر متقابل هورمون و هفته نیز معنی‌دار است، به‌طوری که بیشترین میانگین وزن خشک (۰/۱۶۱۸ گرم) در ترکیب هورمونی ۲ و در هفته چهارم آزمایش بدست آمد. روند افزایشی وزن خشک در مدت ۴ هفته در هر دو محیط کشت مشاهده می‌شود ولی نکته‌ای که واضح است، این است که ترکیب هورمونی ۲ در هر ۴ هفته در مقایسه با ترکیب هورمونی ۱ در همین مدت وزن خشک بیشتری تولید کرده‌است. مقایسه میانگین اثر متقابل محیط کشت و هفته نشان می‌دهد که محیط کشت B5 در هفته چهارم با میانگین ۰/۱۴۷۳ گرم بالاترین میزان وزن خشک را تولید کرده‌است. افزایش وزن خشک در هر دو محیط کشت در مدت ۲ هفته اول روند مشابهی داشته، اما در هفته ۳ و ۴ در محیط کشت B5 نسبت به MS بیشتر بوده‌است.

نتایج تجزیه واریانس اثر عوامل مذکور بر وزن تر کالوس نشان داد که تنها عامل زمان بر وزن تر کالوس تفاوت معنی‌دار دارد و سایر عوامل اثر معنی‌داری ندارند (جدول ۱).

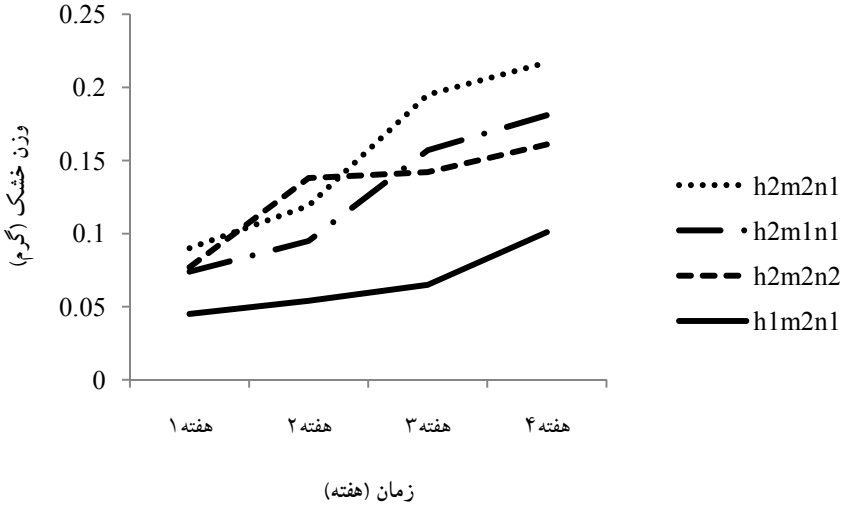
میانگین وزن تر و خشک ۳ تیمار برتر در مقایسه با ضعیف‌ترین تیمار در همه زمان‌ها در شکل ۵ نشان داده شده‌است. محیط کشت (B5) به همراه ترکیب هورمونی ۲ (NAA + BA) و آنتی‌اکسیدان ۱ (PVP) بیشترین وزن تر (۱/۶۹۷۴ گرم به ازای ۲۵ میلی‌لیتر محیط کشت) را در بین ۱۲ تیمار ایجاد کرده‌است (تیمار h2m2n1). البته بین تیمار h2m2n2 و h2m1n1 اختلاف معنی‌داری وجود نداشت و بیانگر این مطلب است که ترکیب هورمونی ۲ (NAA + BA) در هر دو محیط کشت MS و B5 بالاترین رشد کالوس را نشان داد. کمترین وزن تر در محیط B5 محتوی ترکیب هورمونی 2,4-D + Kin و آنتی‌اکسیدان PVP (تیمار h1m2n1) با ۰/۳۱۷۳ گرم تولید شده‌است.



شکل ۵- میانگین وزن تر کالوس ۳ تیمار برتر در مقایسه با ضعیف‌ترین تیمار

(h1: 2,4-D + Kin؛ h2: NAA + BA؛ m1: MS؛ m2: B5؛ n1: PVP؛ n2: PVPP)

همان‌طور که در شکل ۶ مشخص است محیط کشت ۲ (B5) به همراه ترکیب هورمونی ۲ (NAA + BA) و آنتی‌اکسیدان ۱ (PVP) بیشترین وزن خشک (۰/۱۵۵۲ گرم) را در بین ۱۲ تیمار ایجاد کرده است (تیمار h2m2n1). کمترین وزن خشک در محیط B5 محتوی ترکیب هورمونی 2,4-D + Kin و آنتی‌اکسیدان PVP، (تیمار h1m2n1) با ۰/۰۶۶۲ گرم تولید شده است که مشابه وزن تر می‌باشد. تیمار h2m1n1 بر تیمار h2m2n2 برتری دارد، هرچند که در ۲ هفته اول رشد بعکس بوده و روند آن مشابه وزن تر است.



شکل ۶- میانگین وزن خشک کالوس ۳ تیمار برتر در مقایسه با ضعیف‌ترین تیمار

(h1: 2,4-D + Kin؛ h2: NAA + BA؛ m1: MS؛ m2: B5؛ n1: PVP؛ n2: PVPP)

بحث

براساس نتایج بدست‌آمده برای القاء کالوس کلوسیا نیاز به ترکیبی از هورمون‌های اکسین و سایتوکنین می‌باشد که با یافته George و Sherrington (۱۹۸۴) که بیان کردند عموماً برای بیشتر گیاهان علفی فقط یک نوع اکسین به‌منظور القاء کالوس از ریزنمونه‌ها کافی و مورد نیاز است، مغایرت دارد. البته در برخی گونه‌ها یک سیتوکنین همراه با اکسین به محیط کشت برای تحریک رشد کالوس اضافه می‌شود، به‌عنوان مثال Khan و همکاران (۲۰۰۴) از نوک ریشه دو واریته سیر درصد بالایی از کالوس را روی محیط MS غنی شده با ۱/۵ میلی‌گرم بر لیتر 2,4-D و ۵ میلی‌گرم بر لیتر کاینتین القاء کردند. همچنین Saranga و Janick (۱۹۹۰) با استفاده از کاینتین و 2,4-D برای القاء کالوس در *Apium graveolens*، کالوس فشرده و زرد رنگ روشنی را بدست آورد که با نتایج این آزمایش در استفاده از اکسین به همراه سایتوکنین در غلظت‌های مختلف برای القاء کالوس همخوانی دارد، به‌طوری که تمام ترکیب‌های هورمونی منجر به کالوس‌زایی گردیدند. Sarkheil و همکاران (۲۰۰۹) در رازیانه بهترین القاء کالوس را با کشت ریزنمونه‌ها روی محیط MS ۱/۲ با تیمار هورمونی ۲ و ۴ میلی‌گرم در 2,4-D و ۰/۲۵ و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP بدست آوردند که با نتیجه این آزمایش (بیشترین وزن و اندازه کالوس در غلظت ۲ میلی‌گرم بر لیتر 2,4-D به همراه ۱ میلی‌گرم بر لیتر کاینتین بدست آمد) تا حدودی مطابقت دارد و با نتیجه Afify و همکاران (۲۰۱۱) که بیشترین مقدار کالوس القاء شده از بافت هیپوکوتیل رازیانه را روی محیط MS غنی شده با 2,4-D به غلظت ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر و کاینتین با غلظت‌های ۰/۵ یا ۱/۰ میلی‌گرم در لیتر بدست آوردند، مغایرت دارد.

در گزارش شریفی (۱۳۷۴) نیز استفاده از هورمون NAA منجر به تولید کالوس بیشتری نسبت به 2,4-D در زیره سیاه گردید. هرچند که استفاده از 2,4-D به‌عنوان یک هورمون مؤثر در القاء و رشد کالوس در دیگر اعضای خانواده Apiaceae گزارش شده‌است (Nath & Buragohain, 2005). محیط کشت MS نیز به‌عنوان محیطی مناسب برای القاء و رشد کالوس توسط دیگر محققان (Valizadeh *et al.*, 2007 ؛Narayan *et al.*, 2005) پیشنهاد شده‌است.

سیستم کشت سوسپانسیون سلولی برای بدست آوردن سلول‌های یک شکل و سریع‌الرشد مفید است. این سلول‌ها برای مطالعه جنبه‌های بیوشیمیایی متابولیسم‌های ثانویه مناسب هستند. کالوس‌های سریع‌الرشد برای استقرار کشت سوسپانسیون سلولی ایده‌آل هستند. براساس نتایج حاصل از پژوهش Watts و همکاران (۱۹۸۴) هورمون‌های 2,4-D و NAA مناسب‌ترین هورمون‌های گروه اکسین برای افزایش رشد سلولی در کشت تعلیقی کرفس هستند. قهوه‌ای شدن فرایندی است که در اثر تولید ترکیب‌های فنلی و اکسید شدن آنها رخ می‌دهد (Singh *et al.*, 1997). تجمع این مواد در سلول‌ها و محیط کشت به مرور زمان باعث کاهش رشد سلول‌ها و در نهایت مرگ سلولی می‌شود (Hagh & Zafar, 2004). در حقیقت این فرایند یک شیوه حفاظتی گیاه است که بروز آن در شرایط کشت بافت می‌تواند مشکل‌ساز باشد. قهوه‌ای شدن و کاهش در pH محیط کشت به‌وسیله افزودن PVP و PVPP جلوگیری می‌شود. PVP گزارش شده به‌عنوان مهارکننده آنزیم پلی‌فنل اکسیداز که مسئول اکسیداسیون ترکیب‌های فنلی است، عمل می‌کند (Chattopadhyoy *et al.*, 2001). بنابراین به نظر می‌رسد که تغییر در ترکیب‌های محیط کشت به نحوی که میزان تنش‌های القایی ناشی از کشت بافت را بر ریزنمونه‌ها کاهش دهد، می‌تواند در کاهش بروز این پدیده مؤثر باشد.

در نهایت بر طبق نتایج این آزمایش بهترین ترکیب هورمونی برای القاء کالوس گیاه کرفس کوهی غلظت ۲ میلی‌گرم بر لیتر اکسین به همراه غلظت‌های ۰/۵ و ۱ میلی‌گرم بر لیتر سایتوکنین پیشنهاد می‌شود.

سپاسگزاری

از مدیر محترم گروه و پرسنل محترم پژوهشکده علوم و صنایع غذایی که حمایت مالی این پژوهش را بر عهده گرفتند و امکانات لازم را برای پیشبرد این تحقیق فراهم نمودند، سپاسگزارم.

منابع مورد استفاده

- شریفی، م.، ۱۳۷۴. بررسی مقایسه‌ای اسانس‌ها در بذر زیره‌های سیاه و سبز و قطعات جداکشت. پایان‌نامه کارشناسی ارشد علوم گیاهی، دانشگاه تهران، ۳۳۵ صفحه.

- مظفریان، و.، ۱۳۸۶. فلور ایران: چتریان. مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع کشور، تهران، ۳۴۷ صفحه.
- Ahmadi, F., Kadivar, M. and Shahedi, M., 2006. Antioxidant activity of *Kelussia odoratissima* Mozaff. in model and food systems. Food Chemistry, 105: 57-64.
- Afify, A.E.M.R., El-Beltagi, H.S., Hammama, A.E., Sidky, M.M. and Mostafa, O.F.A., 2011. Distribution of trans-anethole and estragole in fennel (*Foeniculum vulgare* Mill.) of callus induced from different seedling parts and fruits. Notulae Scientia Biologicae, 3(1):79-86.
- Aneja, K.R., 2001, Experiments in Microbiology Pant Pathology Tissue Culture and Mushroom Production Technology. New Age International Limited, 568p.
- Chattopadhyoy S., Srivastava, A.K., Bhojwani, S.S. and Bisaria, V.S., 2001. Development of suspension culture of podophyllum hexandrum for production of podophyllotoxin. Biotechnology Letters, 23(24): 2063-2066.
- Etemadi, N., Haghighi, M., Nikbakht, A. and Zamani, Z., 2010. Methods to promote germination of *Kelussia odoratissima* Mozaff. an Iranian endemic medicinal plant. Herba Polonica, 56(2): 21-28.
- George, E.F. and Sherrington, P.D., 1984. Plant Propagation by Tissue Culture: Handbook and Dictionary of Commercial Laboratories. Exegetics Limited, 709p.
- Haq, I. and Zafar, Y., 2004. Effect of nitrates on embryo induction efficiency in cotton (*Gossypium hirsutum* L.). African Journal of Biotechnology, 3: 319-323.
- Jalili, A. and Jamzad, Z., 1999. Red Data Book of Iran: A Preliminary Survey of Endemic, Rare & Endangered Plant Species in IRAN. Research Institute of Forests and Rangelands, Tehran. 748p.
- Khan, N., Alam, M.S. and Nath, U.K., 2004. In vitro regeneration of garlic through callus culture. Journal of Biological Sciences, 4(2): 189-191.
- Narayan, M.S., Thimmaraju, R. and Bhegyalakshi, N., 2005. Interplay of growth regulators during solid state and liquid state batch cultivation of anthocyanin producing cell line of *Daucus carota*. Journal of Process Biochemistry, 40:351-358.
- Nath, S. and Buragohain, A.K., 2005. Establishment of callus and suspension culture of *Centella asiatica*. Biologia Plantarum, 49(3): 411-413.
- Omidbaigi, R., Sefidkon, F. and Saeedi, K., 2008. Essential oil content and composition of *Kelussia odoratissima* Mozaff. as an Iranian endemic plant. Journal of Essential Oil Bearing Plants, 11(6): 594-597.
- Saeedi, K. and Omidbaigi, R., 2009. Evaluation of content and composition of fatty acids, total phenolic and essential oil content of *Kelussia odoratissima* Mozaff. seed. Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants, 25(1): 113-119.
- Salimi, M., Ebrahimi, A., Shojaee Asadieh, Z. and Saei Dehkordi, S.S., 2010. Essential oil copmposition of *Kelussia odoratissima* Mozaff. Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants, 26(2): 147-156.
- Saranga, Y. and Janick, J., 1991. Celery somatic embryo production and regeneration: Improved protocols. Horticulture Sciences, 26(10): 133-155.
- Sarkheil, P., Omidi, M., Peyghambari, S.A. and Davazdahemami, S., 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.
- Shahrani, M., Rafieyan, F., Pile Varian, A., Shirzad, H., Hashemzade, M., Yousefi, H. and Moradi, M.T., 2007. The effect of *Amirkabiria odoratissima* M extract on gastric acid and pepsin secretion level in rat. Journal of Shahrekord University of Medicinal Science, 8(4): 88-95.
- Singh, A., Singh, N.P. and Asthana, A.N., 1997. Callus induction and directed regeneration from immature embryo in chickpea. International Chickpea and Pigeonpea Newsletter, 4: 39-40.
- Valizadeh, M., Kazemi Tabar, S.K. and Nematzadeh, G.A., 2007. Effect of plant growth regulators on calllus induction and regeneration of *Bunium persicum* (Boiss.) B. Fedtsch. Research Journal of Medicinal Plant, 1: 48-53.
- Watts, M.J., Galpin, I.J. and Collin, H.A., 1984. The effect of growth regulators, lights and temperature on flavour production in celery tissue cultures. New Phytologist, 98(4): 583-591.

Impact of hormonal combination on callus induction of *Kelussia odoratissimia* Mozaff. and evaluating its growth in broth

L. Razeghi[1*], M. Azizi[2], S.M. Ziaratnia[3], A.R. Bagheri[4] and S.H. Nemati[2]

1*-Corresponding author, Faculty of Horticulture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran
E-mail: Leila.ry@gmail.com
2- Faculty of Horticulture, Department of Agriculture, Ferdowsi University, Mashhad, Iran
3- Research Institute of Food Science and Technology (RIFST), Mashhad, Iran
4- Faculty of Biothecnology, Department of Agriculture, Ferdowsi University, Mashhad, Iran

Received: November 2012 Revised: April 2013 Accepted: May 2013

Abstract

K. odoratissima Mozaff., belonging to the Apiaceae family, is a known medicinal and forage species, endemic to Iran. It has not been reported in other regions of the world. Due to the excessive harvesting in the early period of growth and the relatively high time required for the establishment and seed production, this species does not have the opportunity to revitalize and seed production and for this reason, it is considered as one of the endangered species of Iran. Advances in tissue culture can be most effective in propagation of endangered plants as well as increasing the genetic potential of medicinal plants. To study the effect hormonal treatments on callus induction sterile seedling explants were prepared. Treatments included MS basal medium along with different hormonal levels (2,4-D (0.5, 1 and 2 mg/l) or a1, a2, a3 + Kin (0, 0.5 and 1 mg/l) or b1, b2, b3) and Ms basal medium with (NAA (0.5, 1 and 2 mg/l) or a4, a5, a6 + BA (0, 0.5 and 1 mg/l) or b4, b5, b6). After a month, growth (size), weight and callus induction percentage were measured and compared. Considering the above traits, the maximum size of callus (6.41mm) and the most callus induction percentage (93%) were obtained at 2,4-D ($2mgl^{-1}$)+kin ($0.5mgl^{-1}$) while the highest callus weight was obtained at NAA ($1mgl^{-1}$) + BA ($0.5mgl^{-1}$).Combined hormones (2mg/l 2,4-D + 0.5 mg/l kin) and (2mg/l NAA + 0.5mg/l BA) in two media, MS and B5, along with three antioxidants (PVP, PVPP and PVP + PVPP), totally 12 treatments, were evaluated within four consecutive weeks under broth condition and cell suspension establishment. According to the results, significant differences were found ($p< 0.05$) among the factors affecting cell dry weight while these factors had no significant effect on fresh weight. The highest fresh and dry weights were obtained at B5 medium with PVP (0.1) (1.6940 gr). Fresh and dry weight of cells showed an increasing trend during the consecutive weeks.

Keywords: Callus induction, *Kelussia odoratissima* Mozaff., cell suspension culture, media composition.