DOI: http://dx.doi.org/10.22092/ijmapr.2013.2863

فصلنامهٔ علمی-پژوهشی تحقیقات گیاهان دارویی و معطر ایران
جلد ۲۹، شمارهٔ ۲، صفحهٔ ۳۹۸-۳۸۷ (۱۳۹۲)

مطالعه اثر نوع ریزنمونه و سطوح تنظیم‌کننده‌های رشد بر کال‌زایی در گیاه دارویی *Levisticum officinale* Koch. در محیط کشت MS تغییریافته

راحله خطیب‌زاده[1*]، مجید عزیزی[2]، حسین آرویی[3] و محمد فارسی[4]

۱*- نویسنده مسئول، دانش‌آموخته کارشناسی ارشد باغبانی، گروه باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد
پست الکترونیک: khatibzadeh_rahele@yahoo.com
۲- دانشیار، گروه باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد
۳- استادیار، گروه باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد
٤- دانشیار، گروه بیوتکنولوژی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد

تاریخ دریافت: فروردین ۱۳۹۰ تاریخ اصلاح نهایی: آبان ۱۳۹۰ تاریخ پذیرش: آذر ۱۳۹۰

چکیده

با گذشت زمان، بار دیگر پرورش و تولید گیاهان دارویی با رشد قابل‌توجهی روبرو شده‌است. پیشرفت‌های زیست‌فناوری می‌تواند کارآیی بسیاری در حفظ و تکثیر گیاهان در خطر انقراض و همچنین افزایش توان ژنتیکی گیاهان دارویی داشته باشد. تغییرات ژنتیکی رخ داده در کشت های کالوس ممکن است به بازدهی بالاتری در تولید متابولیت های ثانویه‌ی ارزشمند بیانجامد. انجدان رومی (*Levisticum officinale* Koch.) از تیره‌ی چتریان، یکی از قدیمی‌ترین گیاهان دارویی و ادویه‌ای به‌شمار می‌رود که در فارماکوپه‌های معتبر، ترکیب‌های ریشه‌ی آن به‌عنوان موادی مدر برای درمان سنگ و عفونت‌های کلیه و مجاری ادراری معرفی شده‌اند. این تحقیق به‌منظور بررسی تأثیر نوع ریزنمونه، ترکیب محیط کشت و هورمون‌های تنظیم‌کننده‌ی رشد بر روی میزان رشد کالوس انجدان رومی در قالب طرح کاملاً تصادفی فاکتوریل با ریزنمونه های هیپوکوتیل، ریشه، برگ، دمبرگ و گره طوقه و در محیط MS تغییریافته (AM1) حاوی سطوح مختلف مواد رشد گیاهی انجام شد. پس از یک ماه میزان رشد و درصد کال‌زایی مقایسه شد. نتایج نشان داد که حداکثر میزان رشد و بهترین خصوصیات ظاهری کالوس با استفاده از ریزنمونه‌ی هیپوکوتیل و ریشه، در محیط پایه‌ی AM1 و با مقادیر ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D، ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر Kin و ۰/۰۲۵ میلی‌گرم در لیتر NAA بدست آمد.

واژه‌های کلیدی: *Levisticum officinale* Koch.، گیاه دارویی، تنظیم‌کننده رشد، القای کالوس.

مقدمه

با وجود همه ی پیشرفت ها در زمینه‌ی شیمی هنوز در تولید بعضی متابولیت های ثانویه، ازجمله مواد دارویی، به منابع بیولوژیکی نیازمندیم. فرآورده‌های حاصل از متابولیسم ثانویه ی گیاهی جزء گرانبهاترین ترکیب های گیاهی هستند. از آنجا که سرعت و قابلیت تولید متابولیت‌های ثانویه در شرایط طبیعی بسیار محدود می باشد، ضروری به نظر می‌رسد که برای تولید سریع و انبوه این مواد از فنون کشت بافت گیاهی به‌طور بهینه استفاده گردد (حبیبی‌خانیانی و همکاران، ۱۳۸٤؛ شمس‌اردکانی و همکاران، ۱۳۸٤؛ Verpoorte & Memelink, 2002).

پیشرفت‌ها، جنبه‌های جدیدی را در کشت درون‌شیشه‌ای ایجاد کرده که افزایش عملکرد و نیز تولید محصولات تراریخت از آن جمله است. تکنیک‌های متعددی برای دست‌ورزی تولید متابولیت‌های ثانویه گیاهی وجود دارد. به‌منظور به‌نژادی، گیاه مادری حاوی سطوح بالا از متابولیت‌های موردنظر، انتخاب و کال‌زایی در آن القا می‌شود تا لاین‌های سلولی با عملکرد بالا بدست آیند. در حال حاضر استفاده از این تکنیک در تولید تعدادی از مواد دارویی نظیر ترکیب های ضدسرطان ارزش اقتصادی بالایی به همراه داشته است. امیدواریم که با پیشرفت علم در زمینه‌های بیوشیمی، مهندسی مسیر سنتز متابولیت‌های ثانویه و مهندسی ژنتیک، این تکنولوژی به سمت تولید طیف وسیعی از مواد دارویی طبیعی پیش برود (Tripathi & Tripathi, 2003؛ Ramawat & Merillon, 1999؛ Robins, 1994).

انجدان رومی (*Levisticum officinale* Koch.) بوته‌ای استوار و چندساله از تیره‌ی چتریان (Apiaceae) و گونه ی مهم و در عین حال، فراموش شده‌ای از گیاهان دارویی بومی ایران است که در جنوب شرق ایران (کرمان، شیب جنوبی کوه هزار با ارتفاع ۳۲۰۰ متر از سطح دریا) رویش دارد. ارتفاع گیاه ۲۰ تا ۲۰۰ سانتی متر است. برگ ها سبز تیره، درخشان، با سطح تحتانی کمرنگ‌تر، ۲ تا ۳ بار شانه ای، با دمبرگ بلند و سطحی صاف و براق هستند. ریشه ی این گیاه، مخروطی شکل و طول آن با توجه به شرایط اقلیمی محل رویش، بین ٤۰ تا ۵۰ سانتی متر است. گیاهان از سال دوم به ساقه می روند. میوه به طول ۵ تا ۷ و عرض ۳ تا ٤ میلی‌متر، بیضوی، در برش عرضی سه گوشه‌ای باریک، تقریباً بالدار و بسیار معطر است. این گیاه با نام عمومی Lovage، از قدیمیترین گیاهان دارویی و ادویه‌ای به‌شمار می‌رود. از قرن دوازدهم اسانس موجود در پیکر رویشی و ریشه ی این گیاه نزد مردم شناخته شده است. ریشه، میوه، برگ ها و حتی پیکر رویشی انجدان رومی خاصیت دارویی دارد. مردم بعضی کشورها از ریشه ی آن برای رفع سوء هاضمه، سوزش معده و نفخ شکم استفاده می کنند. از دم‌کرده ی ریشه به‌عنوان ماده ای مدر و در صنایع داروسازی از عصاره‌ی الکلی آن برای معالجه‌ی سنگ کلیه و مجاری ادراری استفاده می شود. در صنعت به‌عنوان عطر دهنده در مواد آرایشی بکارمی‌رود. همچنین از اسانس ریشه ی این گیاه در صنایع نوشابه‌سازی و غذایی به‌عنوان طعم‌دهنده استفاده می‌شود (امیدبیگی، ۱۳۷۹؛ میرحیدر، ۱۳۷۲).

طبق گزارش Hogg و همکاران (۲۰۰٦) ، میزان

اسانس در ریشه ۰/۵ تا ۱/۸٪، در برگ ۰/۱ تا ۱/٦٪، در ساقه‌ها ۰/۵۳ تا ۱/۱٦٪، در گل‌ها ۱/۵۳٪ و در دانه‌ها ۲/۷-۰/۸٪ بود. ۷۰٪ مواد تشکیل‌دهنده‌ی اسانس را فتالیدها (Phthalides) و ترپنوئیدها (Terpenoides) مانند ان-بوتیلیدین فتالید (n-Butyliden phthalide)، آلفا و بتا-ترپینول (α & β-Terpineol)، (+) بتا-فلاندرن (β-Phellandrene-(+))، اوژنول (Eugneol) و کارواکرول (Carvacrol) تشکیل می‌دهند. به لحاظ شیمیایی اسانس اندام‌های هوایی بسیار متفاوت از اسانس ریشه است. فتالیدها اجزای خاص اسانس ریشه ی بالغ هستند، در حالی‌که اسانس اندام‌های هوایی بیشتر مرکب از ترپنوئیدهاست (امیدبیگی، ۱۳۷۹؛ Hogg *et al*., 2006).

مطالعات ریزازدیادی انجدان رومی در دنیا تعداد و دسترسی بسیار محدودی دارند. در ایران به‌دلیل کاهش جمعیت و گسترش جغرافیایی محدود این گونه‌ی باارزش، لزوم حفظ، تکثیر و پیشگیری از انقراض آن بیش از گذشته احساس می شود. از آنجا که تاکنون در کشور ما هیچ مطالعه‌ی کشت بافتی روی این گیاه نادر انجام نشده‌است، پژوهش حاضر به‌منظور بررسی تأثیر نوع ریزنمونه، محیط کشت و هورمون‌های تنظیم‌کننده‌ی رشد بر روی کال‌زایی گیاه مذکور و بهینه کردن این عوامل انجام شد.

مواد و روشها

این آزمایش در تابستان ۱۳۸۷ در آزمایشگاه کشت بافت گروه باغبانی انجام شد. بذرهای سالم و رسیده انجدان رومی (توده کرمان) پس از شستشو با اتانول ۷۰٪ به مدت ۳۰ ثانیه، سپس کاربرد هیپوکلریت سدیم ۲٪ به مدت ۱۵ دقیقه و در ادامه ۳ بار آبشویی با آب مقطر استریل، در محیط کشت استریل، متشکل از محلول ۰/۷٪ آگار کشت گردید و برای رفع مشکل رکود بذر و بهبود جوانه زنی، به مدت ۱۲ هفته با سرمای ۲ ± ٤ °C تیمار شدند. دانه رست ها پس از انتقال به محیط کشت جامد MS، در فواصل زمانی ٤ هفته‌ای واکشت شدند تا به مرحله‌ی نموی بالاتری برسند. پس از حدود ٤ واکشت، گیاهان به رشد مناسبی دست یافتند و برای شروع کشت کالوس، در شرایط استریل انواع ریزنمونه های هیپوکوتیل، دمبرگ، دیسک برگی، گره طوقه و ریشه از گیاهان استریل مادری تهیه و در پتری‌دیش‌های حاوی محیط جامد کشت شدند (شکل ۱). محیط پایه‌ی مورد استفاده AM1 (Medium MS) (modified after Murashige and Skoog تغییر یافته حاوی ٤۰ گرم در لیتر ساکارز؛ مراجعه کنید به کلکسیون کشت سلول گیاهی و میکروارگانیسم DSMZ (DSMZ, German Collection of Microorganisms and Cell Cultures)، ۲۰۰۸ و جدول ۱) و طرح آزمایشی به شکل فاکتوریل، در قالب طرح کاملاً تصادفی با دو فاکتور و نوع ریزنمونه در ۵ سطح و نوع ترکیب هورمونی در ۱٦ سطح بود. انواع ترکیب‌های هورمونی عبارت بود از: اکسین (متغیر 2,4-D در ٤ سطح ۰، ۱، ۱/۵ و ۲ میلی‌گرم در لیتر و مقدار ثابت ۰/۰۲۵ میلی‌گرم در لیتر NAA) و سایتوکینین (متغیر Kin در ٤ سطح ۰، ۰/۲۵، ۰/۵ و ۱ میلی‌گرم در لیتر)؛ از هر نوع ریزنمونه ۵ تکرار و در هر تکرار ٤ ریزنمونه کشت گردید. کشت ها در تاریکی، رطوبت نسبی ۷۰٪ و دمای ۲ ± ۲۵ °C انکوبه شدند. ٤ هفته پس از کشت، درصد پاسخ کال زایی و میزان رشد

براساس میانگین قطر کالوس ارزیابی شد. پیش از تحلیل آماری، داده های غیرکمّی نرمال سازی شدند، به این ترتیب که از سرعت جوانه‌زنی (داده‌ی نسبی) جذر و از داده‌های درصد آرک‌سینوس گرفته شد. داده‌های حاصل با استفاده از نرم‌افزار SPSS، MSTATC و Excel 2003 آنالیز شدند. نتایج در قالب نمودار ستونی و داده های آن به‌صورت میانگین ± خطای معیار به نمایش درآمدند.

نتایج

نتایج تجزیه‌ی واریانس دوطرفه در مورد اثر دو عامل ریزنمونه و تیمارهای مختلف هورمونی و همچنین اثر متقابل آنها بر درصد کال زایی، حکایت از تفاوت‌های معنی‌دار بین سطوح مختلف هورمونی و نیز انواع ریزنمونه در سطح ۰/۰۱ داشت. همچنین بررسی نتایج تجزیه‌ی واریانس دوطرفه برای اثر دو عامل ریزنمونه و تیمارهای مختلف هورمونی و همچنین اثر متقابل آنها بر رشد قطری کالوس، بیانگر وجود اختلاف معنی‌دار بین ترکیب‌های مختلف هورمونی و انواع ریزنمونه بود ($p \leq$ ۰/۰۱). باوجوداین، اثر متقابل این عوامل در هیچ مورد معنی‌دار نشد (جدول ۲).

آزمون تعقیبی دانکن برای پیدا کردن محل اختلاف میانگین‌های درصد کال‌زایی در سطوح مختلف ریزنمونه نشان داد که ریزنمونه ی هیپوکوتیل و بعد ریشه نسبت به سایر ریزنمونه ها پاسخ بهتری در روند کال زایی بروز دادند (شکل ۳). همچنین با استفاده از این آزمون برای پیدا نمودن ترکیب هورمونی برتر، مشخص گردید که ترکیب (۰/۰۲۵ mgl^{-1}) NAA + (۰/۲۵ mgl^{-1}) Kin + (۱/۵ mgl^{-1})2,4-D حداکثر پاسخ کال زایی را به دنبال داشته‌است. باوجوداین، بین کاربرد سطوح ۰/۲۵ و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر Kin اختلاف معنی‌داری وجود نداشت (شکل ٤). مقایسه‌ی اثر سطوح مختلف تنظیم کننده های رشد بر قطر کالوس با استفاده از آزمون دانکن نیز، بر مزیت ترکیب هورمونی (۰/۰۲۵ mgl^{-1}) NAA + (۰/۲۵ mgl^{-1}) یا (۰/۵) Kin + (۱/۵ mgl^{-1}) 2,4-D نسبت به سایر ترکیب ها دلالت داشت. همچنین این آزمون نشان داد که رشد قطری کالوس در ریزنمونه های هیپوکوتیل، ریشه و برگ، به‌طور معنی داری بیشتر از رشد قطری کالوس دمبرگ بود (شکل‌های ۵ و ٦).

بحث

مقایسه‌ی ساده‌ای بین نتایج این آزمایش و نتایج Zhang و Cheng (۱۹۹۳) نشان داد که تغییر محیط MS، مبتنی بر پروتکل AM1، باعث بهبود کال‌زایی شده‌است. نگاهی به جدول ۱ نشان می‌دهد که وجه اصلی تمایز دو محیط MS و AM1، نسبت کمتر آمونیوم به نیترات در محیط AM1 (۰/۲٤ به جای ۰/۵۲)، ۱۰۰ برابر بودن غلظت تیامین، ۲ برابر بودن غلظت پیریدوکسین و نیکوتینیک‌اسید و استفاده از ٤٪ ساکارز به جای ۳٪ است. همچنین یون فسفات و پتاسیم در محیط AM1 افزایش یافته (به‌ترتیب ۲/۹٤ mM و ۲۷/۷ mM به‌جای ۱/۲۵ mM و ۲۰/۱ mM)، و از نظر ریزمغذی‌ها، AM1 غلظت بیشتری از آهن دارد (۱/۲٦ µM به‌جای ۱ µM).

جدول ۱- مقایسه دستورالعمل محیط‌های AM1 و MS

نمک‌های مغذی پرمصرف و کم‌مصرف (Macro-and micro nutrients)	غلظت در محیط AM1	غلظت در محیط MS
	mgl^{-1} medium	
NH_4NO_3	۶۲۰	۱۶۵۰
KNO_3	۲۵۰۰	۱۹۰۰
$MgSO_4.\ 7H_2O$	۳۷۰	۳۷۰
KH_2PO_4	۴۰۰	۱۷۰
$CaCl_2.\ 2H_2O$	۴۴۰	۴۴۰
$Na_2EDTA.\ 2H_2O$	۴۴/۶	۳۷/۳
$FeSO_4.\ 7H_2O$	۳۵/۰۳	۲۷/۸
H_3BO_3	۶/۲	۶/۲
$MnSO_4.\ H_2O$	۱۰	۰
$MnSO_4.\ 4H_2O$	۰	۲۲/۳
$ZnSO_4.\ 7H_2O$	۸/۶	۸/۶
KI	۰/۷۵	۰/۸۳
$Na_2MoO_4.\ 2H_2O$	۰/۲۵	۰/۲۵
$CuSO_4.\ 5H_2O$	۰/۰۲۵	۰/۰۲۵
$CoCl_2.\ 6H_2O$	۰/۰۲۵	۰/۰۲۵
ویتامین‌ها و مکمل‌های آلی (Vitamins and organic substances)		
Nicotinic acid	۱	۰/۵
Thiamine hydrochloride	۱۰	۰/۱
Pyridoxal hydrochloride	۱	۰/۵
Myo-inositol	۱۰۰	۱۰۰
سایر اجزا (Others)		
Sucrose	۴۰۰۰۰	۳۰۰۰۰
Agar	۹۰۰۰	۸۰۰۰
pH = ۵/۸		

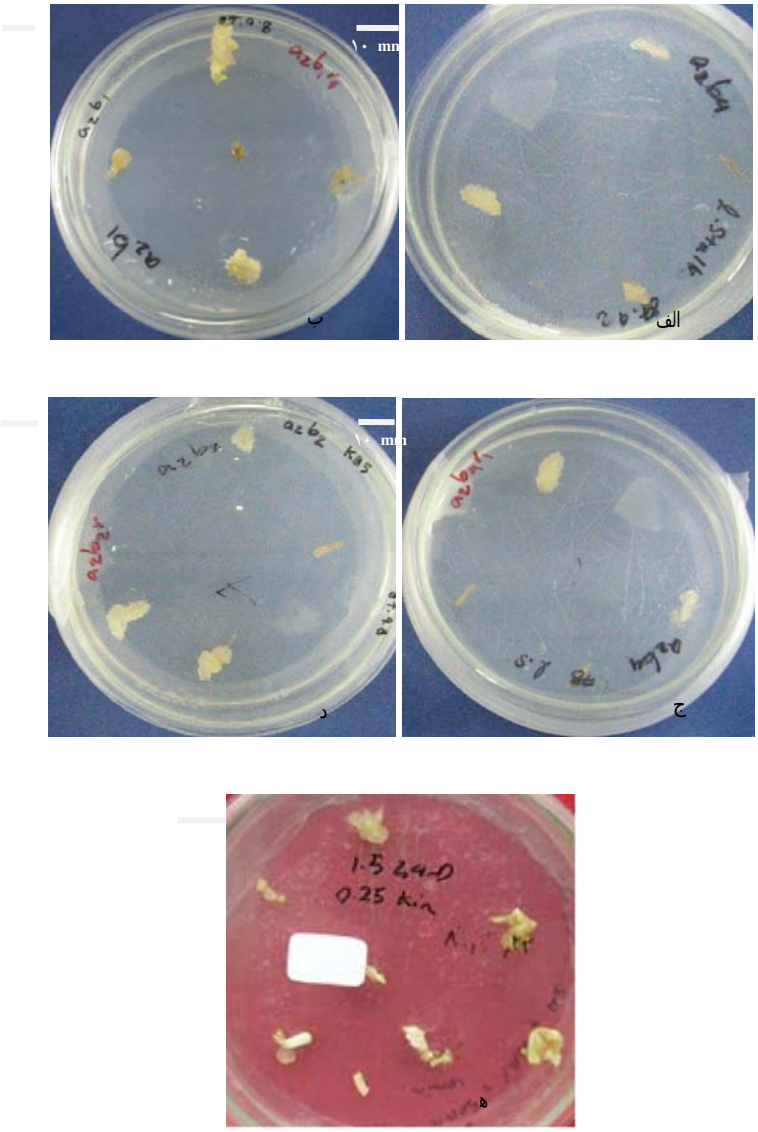
جدول ۲- **نتایج تجزیه‌ی واریانس اثرهای نوع ریزنمونه‌ی *L. officinale* Koch. و ترکیب هورمونی بر درصد القای کالوس و قطر آن در محیط AM1**

منابع تغییرات	درجه‌ی آزادی	میانگین مربعات		F	
		درصد کال‌زایی[1]	قطر کالوس[2]	درصد کال‌زایی	قطر کالوس
ریزنمونه	٤	١٥٦٤/٦٧٦	٠/٣٠٨	٦/٠٣٩ **	٥/٢٧١ **
ترکیب هورمونی	١٥	٦٢٢٣/٠٥٠	١/٥٣٨	٢٤/٠١٧ **	٢٦/٣٢٩ **
ریزنمونه × ترکیب هورمونی	٦٠	٣٣٣/٠٢٨	٠/٠٧٧	١/٢٨٥ ns	١/٣١٧ ns
خطا	٣٢٠	٢٥٩/١١٠	٠/٠٥٨		

ns: غیرمعنی‌دار، **: معنی‌دار در سطح ٠/٠١

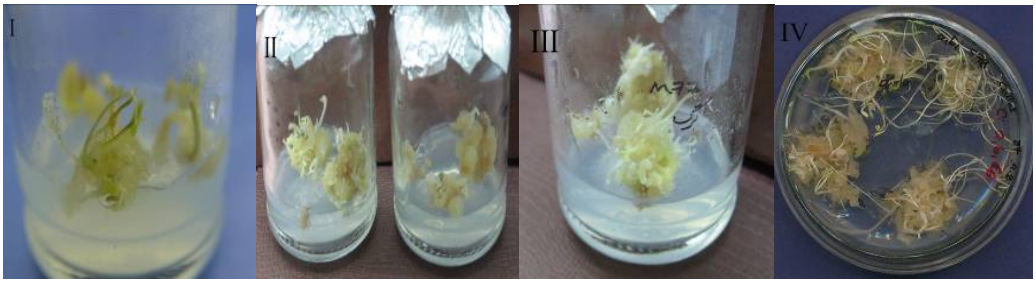
١- به منظور نرمال‌سازی داده‌های غیرکمّی از داده‌های درصد کال‌زایی آرک سینوس گرفته شد.

٢- قطر کالوس برحسب میلی‌متر اندازه‌گیری شد.



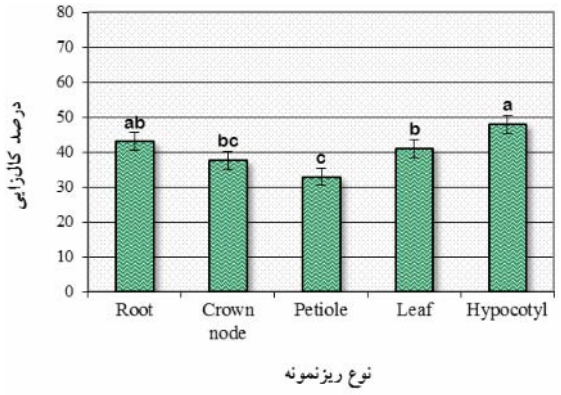
شکل ۱- کالوس‌های القاء شده در محیط AM1 از ریزنمونه‌های مختلف

برگ (الف)، جوانه‌ی طوقه (ب)، ریشه (ج)، دمبرگ (د) و هیپوکوتیل (ه) در *L. officinale* Koch.



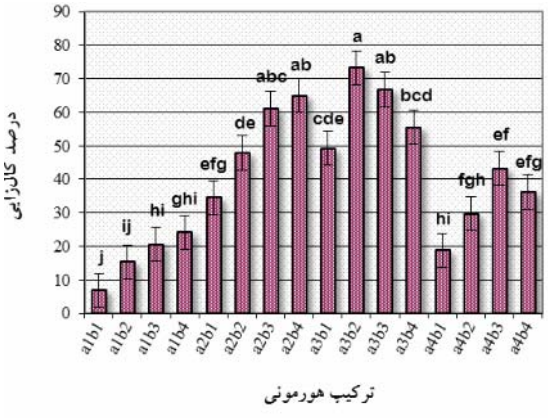
شکل ۲- کشت کالوس *L. officinale* Koch. از ریزنمونه‌های

طوقه (I)، ریشه (II)، برگ (III) و هیپوکوتیل (IV) در محیط AM*



شکل ۳- اثر انواع مختلف ریزنمونه بر روند کالزایی *L. officinale* Koch. در محیط AM1؛

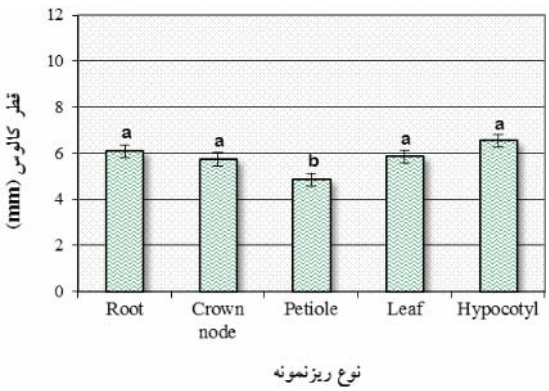
میانگین‌هاي داراي حرف و یا حروف مشترك در سطح α=۰/۰۵ اختلاف معني‌داري ندارند.



شکل ۴- اثر ترکیب‌های مختلف هورمونی بر روند کالزایی *L. officinale* Koch. در محیط AM1؛

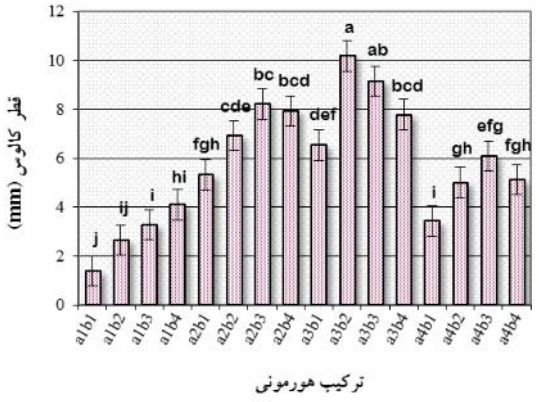
میانگین‌هاي داراي حرف و یا حروف مشترك در سطح α=۰/۰۵ اختلاف معني‌داري ندارند (توضیح در پاورقی).

۱



شکل ۵- اثر انواع مختلف ریزنمونه بر قطر کالوس *L. officinale* Koch. در محیط AM1؛

میانگین‌هاي داراي حرف و یا حروف مشترك در سطح α=۰/۰۵ اختلاف معني‌داري ندارند.



شکل ۶- اثر ترکیب‌های مختلف هورمونی بر قطر کالوس *L. officinale* Koch. در محیط AM1؛

میانگین‌هاي داراي حرف و یا حروف مشترك در سطح α=۰/۰۵ اختلاف معني‌داري ندارند (توضیح در پاورقی).

*، انواع ترکیبات هورموني شامل جزء ثابت NAA (mgl^{-1} ۰/۰۲۵) و اجزاء متغیر 2,4-D (mgl^{-1} ۰، ۱، ۱/۵ و ۲، به‌ترتیب a1، a2، a3 و a4) و Kin (mgl^{-1} ۰، ۰/۲۵، ۰/۵ و ۱، به‌ترتیب b1، b2، b3 و b4) بودند.

نتایج این تحقیق با گزارش Ekiert (۱۹۹۳) در مورد برتری ریزنمونه‌ی هیپوکوتیل از دانهال‌های استریل برای استقرار کشت کالوس زنیان (*Ammi majus* L.) مطابقت دارد. باوجوداین، وی اظهار نمود که بیشترین القای کالوس از قطعات هیپوکوتیل در محیط LS (Linsmaier & Skoog, 1965) حاوی NAA (۲ mgl^{-1}) و BAP (۲ mgl^{-1}) دیده شد و از نظر تحریک رشد، ترکیب‌های NAA-BAP قویترین و ترکیب‌های 2,4-D-BAP ضعیف‌ترین بودند، اما محیط جامد LS حاوی 2,4-D (۱۰ mgl^{-1}) و BAP (۱۰ mgl^{-1}) بهترین ترکیب برای تولید فورانوکومارین‌ها در کشت کالوس بود. این با نتایج Zhang و Cheng (۱۹۸۹) مبنی بر اثر افزایشی 2,4-D بر رشد کالوس آنجلیکای چینی مغایرت دارد. به بیان دیگر، در تأیید نتایج ما، در آنجلیکای چینی نیز محیط MS تغییریافته با غلظت‌های بیشتری از ویتامین‌ها و مواد آلی برای القای کالوس پیشنهاد شد و اثر 2,4-D بر القاء و رشد کالوس بیش از NAA و آن نیز به نوبه‌ی خود بیش از IAA بود. همچنین بهترین ریزنمونه برای القای کالوس ریشه‌های یکساله دانسته شد. در مورد آنیسون (*Pimpinella anisum* L.) رشد بهینه کالوس با استفاده از قطعات هیپوکوتیل روی محیط MS حاوی IAA (۱ mgl^{-1}) و Kin (۰/۵ mgl^{-1}) بدست آمد (Becker, 1970). به‌طور مشخص، ریزازدیادی تنها وقتی انجام می‌شود که ماده‌ی اولیه‌ی کافی مورد استفاده قرار گیرد. بنابراین منبع ماده‌ی اولیه را نمی‌توان بدون در نظر گرفتن بعضی عوامل انتخاب کرد. زیرا محدودیت استفاده از ریزنمونه‌ی هیپوکوتیل و گره طوقه، تخریبی بودن روش تهیه آنها در قیاس با تهیه دیگر ریزنمونه‌ها بود.

نتایج ما با گزارش Venkateswara و همکاران (۱۹۸۷) مبنی بر کالزایی *Cryptolepis buchanani* Roem. & Schult روی محیط B5 حاوی 2,4-D (۲ mgl^{-1}) و Kin (۰/۵ mgl^{-1}) نیز تطابق دارد، در حالی‌که با گزارش Skrzypczak و همکاران (۱۹۹۳) یعنی القای کالوس *Gentiana* sp. در محیط B5 حاوی 2,4-D (۰/۵ mgl^{-1}) و Kin (۱ mgl^{-1}) مغایرت دارد. در بررسی رفتار درون‌شیشه‌ای قطعات ساقه‌ی حاوی تک‌گره در داوودی (*Chrysanthemum morifolium* Ramat)، تشکیل کالوس در محیط MS حاوی 2,4-D (۱ mgl^{-1}) و مقادیر نسبتاً بالای BAP (۲ mgl^{-1}) بدست آمد (Vantu, 2006). در کشت درون‌شیشه‌ای *Mentha viridis* L. تنها زمانی که 2,4-D به تنهایی یا همراه با سایتوکینین به محیط کشت افزوده شد، گره، قطعات میان‌گره، برگ و ریشه، کالوس ترد کرم‌رنگ با پرآوری پایین تولید نمودند که تمایزیابی نکرد و درنهایت از بین رفت. میان‌گره و قطعات ریشه روی محیط حاوی 2,4-D یا BAP همراه با 2,4-D کالوس کرم‌رنگ، ترد در تمام سطح خود، با سرعت رشد متوسط در مورد ریشه و سرعت رشد بیشتر در مورد میان‌گره، ایجاد نمودند. در محیط کشت دارای 2,4-D رشد کالوس کمی بیشتر از محیط دارای 2,4-D و BAP بود. انتقال این کالوس به محیط کشت دارای اکسین و سایتوکینین هیچ تمایز یا رشدی به دنبال نداشت. در نهایت این کالوس پس از یک ماه قهوه‌ای شد و از بین رفت (Ghiorghita *et al*., 2006).

علاوه بر اثر متقابل بین هورمون‌ها، عوامل غیرهورمونی دیگری نظیر کلسیم و ساکارز نیز در نتیجه نهایی عمل هورمون‌ها دخالت دارند. غلظت بالای ساکارز در تشکیل ساختارهای ثانویه و نمو نوعی سلول آبکش

(بافت انتقالی) در کشت مؤثر است. در مطالعه‌ای با استفاده از بافت غده‌ای سیب‌زمینی ترشی نشان داده شد که یون کلسیم می‌تواند عمل ترکیبی اکسین-سایتوکینین را اصلاح کند. در این بررسی نشان داده شد که IAA به همراه غلظت‌های کم کینتین برای رشد و نمو سلول مفید است، اما همین که Ca^{2+} به کشت اضافه شود، تغییر ثابتی در الگوی رشد از نمو تا تقسیم سلول اتفاق می‌افتد. غلظت‌های بالای کلسیم از گسترش دیواره‌ی سلولی ممانعت می‌کند. در چنین غلظت‌هایی، سلول تغییر مسیر داده و تقسیم می‌شود. افزایش فسفات در محیط کشت موجب افزایش رشد سلول‌ها می‌شود (حبیبی‌خانیانی و همکاران، ۱۳۸٤؛ Taji *et al.*, 2002؛ Pasqua *et al.*, 2001).

به‌عنوان نتیجه‌گیری نهایی می‌توان گفت موفقیت در باززایی گیاهان گونه‌های مختلف با منبع ریزنمونه مرتبط است. بنابراین منبع ماده‌ی اولیه را نمی‌توان بدون در نظر گرفتن سن و وضعیت فیزیولوژیک بافت انتخاب کرد. همچنین از آنجا که گونه‌های گیاهی واکنش متفاوتی به روشهای کشت سلولی خاص نشان می‌دهند، بنابراین ارائه‌ی روشهای کشت به‌صورت عام با مشکل مواجه است. ازاین‌رو، اجزای محیط کشت در موفقیت کشت بافت سهم بسزایی دارند. نمک‌های معدنی، قند و ویتامین‌ها برای تضمین رشد خوب از اجزای متشکله‌ی محیط‌های مذکور به‌شمار می‌روند. بهبودهایی که در اجزای محیط کشت و شرایط آن بعمل آمده، این امکان را فراهم نموده تا بافت‌های گیاهی با موفقیت کشت شوند و طیف وسیعی از گونه‌های گیاهی به باززایی برسند (حبیبی‌خانیانی و همکاران، ۱۳۸٤؛ عبدمیشانی و شاه‌نجات‌بوشهری، ۱۳۷۷).

تکنولوژی‌های تکثیر و پرآوری رویشی از طریق کالوس امکانی برای تهیه و تکثیر ژنوتایپ‌های برتر فراهم می‌کند. تهیه‌ی زیرکشت‌های مجدد از کالوس مجال تکثیر سریع مواد کشت‌شده را فراهم می‌کند. باید به خاطر داشت که با زیرکشت‌های متوالی، استعداد باززایی گیاه کاهش یافته و ثبات ژنتیکی مواد گیاهی در اثر تنوع سوماکلونی (تغییرات ژنتیکی القاء شده در سلول‌های رویشی کشت شده) ممکن است دستخوش تغییر شود. گیاهان حاصل از این زیرکشت‌ها فوق‌العاده متنوع هستند و سطوح پلوئیدی آنها افزون می‌گردد.

در مرحله‌ی تکثیر و پرآوری معمولاً کالوس‌ها به یک محیط کشت با ترکیب‌های هورمونی مشابه منتقل می‌شوند. همان‌گونه که اشاره شد، در محیط کشت AM1 با ترکیب هورمونی Kin + (۰/۲۵ mgl^{-1}) NAA + (۰/۰۲۵ mgl^{-1}) 2,4-D (۱/۵ mgl^{-1}) کالوس‌ها ترد و روشن بودند و سیر رشدی خوبی داشتند، بنابراین ترکیب مزبور (که به‌طور قراردادی *AM نامیده شد) به‌عنوان ترکیب برتر از نظر رشد و کیفیت کالوس شناسایی شد و پس از القای کال‌زایی، در مرحله‌ی واکشت و استقرار کشت کالوس، کالوس‌ها هر ٤ هفته یک‌بار در محیط تازه‌ی *AM با ترکیب گفته‌شده واکشت و در تاریکی، رطوبت نسبی ۷۰٪ و دمای ۲ ± ۲۵ $^{\circ}C$ انکوبه شدند (شکل ۲). در هر واکشت، کالوس‌ها به قطعات ریزتری تقسیم شدند تا رشد سریعتری پیدا کنند. این نتایج و عوامل می‌توانند برای تلاش‌های آینده در زمینه‌ی تکثیر گیاه و تولید درون شیشه‌ای متابولیت‌های ارزشمند آن مورد استفاده قرار گیرند.

سپاسگزاری

بدین‌وسیله از معاونت پژوهشی و کارشناسان محترم آزمایشگاه کشت بافت و تحصیلات تکمیلی گروه باغبانی دانشگاه فردوسی مشهد به دلیل همکاری و حمایتشان قدردانی می‌گردد.

منابع مورد استفاده

- امیدبیگی، ر.، ۱۳۷۹. تولید و فرآوری گیاهان دارویی (جلد ۳). به‌نشر، مشهد، ۳۹۷ صفحه.
- حبیبی‌خانیانی، ب.، معینی، ا. و عبدالهی، م.ر.، ۱۳۸٤. تولید متابولیت‌های ثانویه و مواد دارویی از طریق کشت بافت و سلول‌های گیاهی. گیاهان دارویی، ٤(١٤): ٦-١.
- شمس‌اردکانی، م.، حاجی‌آخوندی، ع.، جمشیدی، ا.ح. و عبدی، خ.، ۱۳۸٤. مطالعه‌ی روغن فرّار کشت بافت رازیانه (*Foeniculum vulgare* Miller.) و مقایسه‌ی آن با گیاه کامل. گیاهان دارویی، ٤(١٥): ٨٠-٧٣.
- عبدمیشانی، س. و شاه‌نجات‌بوشهری، ع.ا.، ۱۳۷۷. اصلاح نباتات تکمیلی (بیوتکنولوژی گیاهی) (جلد ۲). مؤسسه انتشارات و چاپ دانشگاه تهران، تهران، ۳۵۷ صفحه.
- میرحیدر، ح.، ۱۳۷۲. معارف گیاهی، کاربرد گیاهان در پیشگیری و درمان بیماری‌ها (جلد ۲). دفتر نشر فرهنگ اسلامی، تهران، ۵۳۵ صفحه.
- DSMZ GmbH, 2008. The DSMZ Online Catalogue. The DSMZ Division of Plant Cell Cultures. German Collection of Microorganisms and Cell Cultures (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH), Braunschweig, Germany. http://www.dsmz.de./plant_cell_lines. PC-No.:1031.
- Becker, H., 1970. Studies on the formation of volatile substances in plant tissue cultures. Biochemie und Physiologie der Pflanzen, 161: 425-441.
- Ekiert, H., 1993. *Ammi majus* L. (bishop's weed): In vitro culture and the production of coumarin compounds. Biotechnology in Agriculture and Forestry: Medicinal and Aromatic Plants IV, 21: 1-17.
- Ghiorghita, G., Maftei, D.E., Gille, E. and Nicuta, D., 2006. Morphogenetical and biochemical studies of *Mentha viridis* L. in In vitro cultures. Proceedings from the Third Conference on Medicinal and Aromatic Plants of Southeast European Countries. Belgrade, 31 December: 54-58.
- Hogg, C. L., Svoboda, K. P. Hampson, J. B. and Brocklehurst, S. 2001. Investigation into the composition and bioactivity of essential oil from lovage (*Levisticum officinale* W. D. J. Koch). The International Journal of Aromatherapy, 11 (3): 567-575.
- Linsmaier, E.M. and Skoog, F., 1965. Organic growth factor requirements of tobacco tissue cultures. Physiologia Plantarum, 18: 100-128.
- Murashige, T. and Skoog, F., 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiologia Plantarum, 15(3): 473-497.
- Pasqua, G., Monacelli, B., Silvestrini, A. and Manganaro, R., 2001. In vitro root differentiation and essential-oil accumulation in *Angelica archangelica*. *In Vitro* Cellular and Developmental Biology-Plant, 37(6): 763-766.
- Ramawat, K.G. and Merillon, J.M., 1999. Biotechnology: Secondary Metabolites. Science Publisher, 393p.
- Robins, R.I., 1994. Secondary products from cultured cells and organs: I. molecular and cellular approaches: 169-198. In: Dixon, R.A. and Gonzales, R.A., (Eds.). Plant Cell Culture. IRL Press, Oxford, 230p.
- Skrzypczak, L., Wesolowska, M. and Skrzypczak, E., 1993. *Gentiana* species: *XII. In vitro* culture, regeneration, and production of secoirridoid glucosides. Biotechnology in Agriculture and Forestry: Medicinal and Aromatic, 21: 172-186.
- Taji, A., Kumar, P.P. and Lakshmanan, P., 2002. In Vitro Plant Breeding. The Haworth Press Inc. Binghamton, New York, 167p.
- Tripathi, L. and Tripathi, J.N., 2003. Role of biotechnology in medicinal plants. Tropical Journal of Pharmaceutical Research, 2(2): 243-253.
- Vantu, S., 2006. Indirect caulogenesis at *Chrysanthemum morifolium* Ramat. Proceedings from the Third Conference on Medicinal and Aromatic Plants of Southeast European Countries. Belgrade, Serbia, 31 December: 74-76.
- Venkateswara, R., Rao, S.K. and Vaidyanathan, C.S., 1987. Cryptosin-a new cardenolide in tissue culture and intact plants of *Cryptolepis buchanani* Roem. & Schult. Plant Cell Reports, 6(4): 291-293.
- Verpoorte, R. and Memelink, J., 2002. Engineering secondary metabolite production in plants. Current Opinion in Biotechnology, 13(2): 181-187.
- Zhang, S.Y. and Cheng, K.C., 1993. *Levisticum officinale* Koch. (Garden lovage): micropropagation and the production of essential oils. Biotechnology in Agriculture and Forestry: Medicinal and Aromatic Plants, 24: 229-241.
- Zhang, S.Y. and Cheng, K.C., 1989. *Angelica sinensis* Oliv. (Garden lovage): In vitro culture, regeneration and the production of medicinal compounds. Biotechnology in Agriculture and Forestry: Medicinal and Aromatic Plants, 7: 1-22.

Effect of explants types and levels of plant growth substances on callogenesis in *Levisticum officinale* Koch. on a modified MS medium

R. Khatibzadeh[1*], M. Azizi[2], H. Arouiee[2] and M. Farsi[3]

1*- Corresponding author, Horticulture Department, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran, E-mail: khatibzadeh_rahele@yahoo.com
2- Horticulture Department, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran
3- Plant Biotechnology Department, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran

Received: March 2011 Revised: October 2011 Accepted: December 2011

Abstract

Over time, once again there has been a significant growth in growing and producing medicinal plant species. The biotechnological developments have far-reaching implications in conservation and propagation of endangered species, as well in the genetic improvement of medicinal plant. The genetic variation occurred in calli holds tremendous potential for increasing production efficiency of valuable secondary metabolites. *Levisticum officinale* Koch. is considered as one of the oldest medicinal plants and spices from Apiaceae, whose root has a diuretic agent for the treatment of kidney stones and kidney and urinary tract infections, reported in many credible pharmacopoeias. In present investigation, callus cultures of lovage explants (hypocotyl, root, leaf, petiole, crown node) were initiated in modified MS medium, called AM1, supplemented with different phytohormonal combinations. After one month, the percentage and rate of callogenesis were analyzed as a completely randomized factorial design. The highest callus growth and best appearance were obtained by hypocotyl and root explants in the AM1 medium supplemented with 2,4-D (1.5 mgl^{-1}) + Kin (0.5 mgl^{-1}) + NAA (0.025 mgl^{-1}).

Key words: *Levisticum officinale* Koch., medicinal plant, plant growth regulators, callus induction.