



## تأثیر تنظیم‌کننده‌های مختلف رشد گیاهی بر کالوس‌زایی و باززایی گونه دارویی *Papaver fugax* Poir.

زهراء علیایی<sup>۱</sup>, رسول اصغری زکریا<sup>۲</sup>, ناصر زارع<sup>۳</sup> و داود برنجی<sup>۴</sup>

۱- دانش آموخته کارشناسی ارشد اصلاح بیات، دانشگاه محقق اردبیل  
(r-asghari@uma.ac.ir)  
۲- استاد گروه زراعت و اصلاح بیات، دانشگاه محقق اردبیل، (نویسنده مسؤول)  
۳- دانشیار گروه زراعت و اصلاح بیات، دانشگاه محقق اردبیل  
۴- گروه تکنولوژی و آموزش، اداره کل آموزش و پژوهش استان اردبیل، اردبیل، ایران  
تاریخ دریافت: ۹۸/۱۰/۱۴  
تاریخ پذیرش: ۹۸/۱۱/۷  
صفحه: ۲۰۱ تا ۱۹۲

### چکیده

گونه *Papaver fugax* Poir. از بخش Meconidium جنس *Papaver* منع مهمی برای آلالکالوئیدها است. با توجه به وجود تباينین، مورفين و کدئین در این گیاه، مطالعات بیوتکنولوژی به ویژه کشت درون شیشه‌ای این گیاه حائز اهمیت است. در این پژوهش تولید کالوس و باززایی درون شیشه‌ای این گونه از ریزنمونه‌های برگ در محیط کشت MS حاوی سطوح مختلف تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی نفتالین استیک اسید (NAA)، ۲،۴-دی‌کلروفونوکسی استیک اسید (Kin) و بنزیل آدنین پورین (BAP) در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و دوره نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت روزنایی در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار بررسی شد. تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که از لحاظ درصد کالوس‌زایی و وزن تر کالوس اختلاف معنی‌داری بین محیط‌های مختلف کشت در سطح احتمال یک درصد وجود دارد. بر اساس نتایج حاصل، محیط کشت مناسب برای تولید کالوس در ریزنونه برگی، محیط کشت MS حاوی ۱ میلی‌گرم در لیتر از BAP بود. بیشترین مقدار وزن تر کالوس در محیط کشت MS حاوی BAP و NAA هر یک به میزان ۱ میلی‌گرم در لیتر به دست آمد. باززایی درون شیشه‌ای این گونه از ریزنمونه‌های برگ در محیط کشت (MS) حاوی سطوح مختلف (NAA، Kin و BAP) مطالعه شد و بهترین محیط کشت برای ساقه‌زایی محیط کشت MS حاوی Kin و NAA هر یک به میزان ۱ میلی‌گرم در لیتر بود. با بررسی ریشه‌زایی گیاهچه‌ها در محیط کشت MS حاوی سطوح مختلف ایندول اسید (IAA) به همراه Kin یا BAP، بیشترین درصد ریشه‌زایی در محیط کشت MS حاوی IAA و Kin هر یک به میزان ۱ میلی‌گرم در لیتر به دست آمد.

واژه‌های کلیدی: باززایی، کالوس، کشت درون شیشه‌ای، هورمون‌های گیاهی، *Papaver fugax*

### مقدمه

آلkalوئید تباينین که در غلظت بيشتر در ساقه و در غلظت کم در سایر اندام‌های اين گیاه وجود دارد (۲۴)، قابل تبدیل به کدئین و داروهای دیگر مانند نالوكسان، هیدروکدئین و اکسی‌کدئین است (۷). فوگاپاونین، مکامبرین، پرونوسیفرین، نورنوسیفرین، رومرین، سالوتاریدین، پروتوپین، تباينین از آلkalوئیدهای موجود در *Papaver fugax* هستند (۲۴). محمدی و همکاران (۱۷) بيان کردنده که بیشترین میزان آلkalوئید در *P. pseudo-bracteatum* و *P. bracteatum* در کپسول و ریشه آنها وجود دارد در حالی که در گونه *P. fugax* در ساقه مشاهده می‌شود. طبق گزارش آنها مقدار کدئین در ساقه *P. fugax* به مراتب بيشتر از دو گونه *P. fugax* و *P. bracteatum* است. صالحی و همکاران (۲۱) در مطالعه‌ای روی *P. fugax* مقدار کدئین را ppm ۱۷۹/۶ و مقدار تباينین را ۳۴/۲ ppm گزارش کردن. فخاری و همکاران (۸) نيز حضور کدئین در *P. fugax* را گزارش کرده‌اند.

بنما به اطلاعات ما تاکنون گزارشی درباره کالوس‌زایی و باززایی گونه *P. fugax* ارائه نشده است. اما در گونه‌های دیگر *Papaver* گزارش‌هایی وجود دارد. حقیقت حور و همکاران (۱۰) تولید کالوس و باززایی درون شیشه‌ای گونه *P. pseudo-orientale* از ریزنونه‌های هیپوکوتیل-کوتیدون را در محیط کشت پایه MS و B5 حاوی سطوح مختلف نفتالین استیک اسید (NAA)، کیتین (Kin) و بنزیل-

ارزش بازارهای جهانی داروهای گیاهی که شامل گیاهان دارویی و فراورده‌های آنهاست، با رشد قابل توجهی رو به افزایش است. بخش اعظم بازار گیاهان دارویی دنیا به تولید و عرضه متابولیت‌های ثانویه مشتق از این گیاهان مربوط می‌شود، لذا این مواد از ارزش افزوده بسیار بالایی برخوردار هستند (۲۷). گروه مهمی از این ترکیبات، آلkalوئیدها هستند که با داشتن اثرات بیولوژیکی متنوع از نظر دارویی از اهمیت فراوانی برخوردارند. آلkalوئیدهای ایزوکینولینی انتشار وسیعی در گیاهان تیره پاپاوراسه دارند و مصرف آنها در درمان بیماری‌ها از قدمی‌ایام معمول بوده است. جنس *Papaver* از خانواده Papaveraceae دارای گونه‌های متعددی با پاتنسیل استفاده در صنعت داروسازی است (۲۲). گونه *Papaver fugax* از بخش درون جنسی *Papaver* است که در استان اردبیل به عدد پایه کروموزومی آن ۷ است (۱۵) که در اثر میانی از *Papaver* و پیزه در مناطق مرتفع رویش دارد. این گونه گیاهی است علفی و دو ساله به ارتفاع ۶۰-۲۰ سانتی‌متر که در شیب‌های تند مناطق استپی به صورت افراشته می‌روید. ساقه آن به ویژه در قسمت‌های پایین خیلی شکننده است. روی برگ‌ها و غنچه‌های آن کرک‌های ریزی وجود دارد. میوه به صورت کپسول به طول ۱۴-۱۶ میلی‌متر و قطر ۴-۸ میلی‌متر است. گل‌های آن اثر آرام بخش، معرق، خلط‌آور، ضد برونشیت، سرفه، آسم و غیره و دانه‌های آن اثر ملین ملایم دارند (۳۱).

اسکالپل تیز و در داخل آب مقطر استریل به قطعات کوچک بریده شدند. ریزنمونه‌های تهیه شده (به تعداد ۱۰ ریزنمونه در هر ظرف پتربال)، روی محیط کشت‌های MS حاوی سطوح مختلف اکسین ۲,۴-D یا NAA (هر کدام در سه غلاظت صفر، ۰/۵ و ۱ میلی‌گرم در لیتر) هر یک به صورت جداگانه در ترکیب با سیتوکینین‌های Kin و یا BAP (هر یک در سه سطح صفر، ۰/۵ و ۱ میلی‌گرم در لیتر) در ظروف پتربال کشت شدند. در مجموع ۲۴ نوع ترکیب مختلف از تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار مورد ارزیابی قرار گرفتند. در این مطالعه از اسید آسکوربیک به مقدار ۱۵ میلی‌گرم در لیتر برای جلوگیری از قهقهه‌ای شدن کالوس‌ها استفاده شد (۲۰). کشت‌ها در اتفاق رشد با دمای  $۲۵\pm 2$  درجه سانتی‌گراد نگهداری و هر دو هفته یک بار واکشت شدند. پس از تولید کالوس، درصد کالوس‌زایی در محیط‌های مختلف کشت محاسبه شد و پس از اینکه کالوس‌ها به حد کافی رشد کردند (سه ماه بعد از کشت) وزن کالوس‌ها اندازه‌گیری شد. لازم به ذکر است که از ریزنمونه‌های دیگر شامل ریشه و دمبرگ نیز استفاده شد که به دلیل کالوس‌زایی ضعیف آنها نتایج حاصل در تجزیه و تحلیل استفاده نشدند.

در آزمایشی دیگر ساقه‌زایی و تولید شاخصار از کالوس‌های حاصل از آزمایش قبلی، محیط کشت MS حاوی سطوح مختلف NAA (صفر، ۰/۵ و ۱ میلی‌گرم در لیتر) به همراه Kin و یا BAP هر کدام در سه غلاظت (صفر، ۱ و ۲ میلی‌گرم در لیتر) استفاده شد و درصد ساقه‌زایی بعد از گذشت ۵ ماه از کشت کالوس‌ها اندازه‌گیری شد. هر کالوس به عنوان ریزنمونه در لوله‌های آزمایش به قطر ۳ و طول ۱۶ سانتی‌متر در محیط کشت MS حاوی ترکیبات مورد نظر از تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی کشت داده شدند. آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار (هر تکرار شامل ۱۰ لوله آزمایش) انجام گرفت. در آزمایشی دیگر برای القاء ریشه‌زایی در گیاهچه‌های حاصل از آزمایش بازازایی، محیط کشت MS حاوی سطوح مختلف IAA (صفر، ۱ و ۲ میلی‌گرم در لیتر) به همراه Kin و یا BAP هر کدام در دو سطح ۰/۵ و ۱ میلی‌گرم در لیتر) استفاده شد. در این جا هم هر گیاهچه حاصل از بازازایی کالوس به عنوان ریزنمونه در لوله‌های آزمایش به قطر ۳ و طول ۱۶ سانتی‌متر در محیط کشت MS حاوی ترکیبات مورد نظر از تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار (هر تکرار شامل ۱۰ لوله آزمایش) کشت داده شدند. درصد ریشه‌زایی در هر یک از ترکیبات مورد استفاده از تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی پس از گذشت ۳۰ روز ثبت شد. تجزیه و تحلیل داده‌ها در قالب طرح کاملاً تصادفی و مقایسه میانگین صفات به روش توکی انجام شد. برای تجزیه آماری از نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۹ استفاده شد.

## نتایج و بحث

ریزنمونه‌های برگی کشت شده بعد از گذشت دو هفته در تعدادی از محیط‌های کشت شروع به تولید کالوس کردند.

آدنین (BA) گزارش کردند. همچنین در تحقیق انجام گرفته روی گیاه *P. orientale* حداقل وزن تر کالوس در تیمار ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA و BAP حاصل شد (۱). مطالعات الهی و گوهری نیز (۱۲) نشان داد که اضافه کردن ۲,۴ دی کلروفتوکسی استیک اسید (2,4-D) به مقدار یک میلی‌گرم در لیتر به همراه بنزیل آدنین به مقدار ۰/۵ یا ۱ میلی‌گرم در لیتر به محیط کشت نیم غلاظت MS باعث ایجاد کالوس در *P. bracteatum* می‌شود. کامو و همکاران (۱۳) در گیاه *P. somniferum* توانستند با استفاده از محیط کشت MS حاوی IPA (ایزوپنتیل آدنین) یا کیتین (Kin) (ساقه و در محیط کشت MS حاوی نفتالین استیک اسید (NAA) و ریشه Kin تولید کنند.

امروزه، استفاده از تکنولوژی کشت سلول و بافت گیاهی برای تولید مواد مؤثره گیاهی در شرایط درون شیشه و بیوراکتورها مورد توجه است (۱۶). مطالعات زیادی در مورد کشت کالوس در شرایط درون شیشه‌ای و استقرار سوسپانسیون سلولی برای تولید مواد مؤثره و بررسی عوامل مؤثر بر آن در حال انجام است. همچنین تغییر نسبت اکسین به سیتوکینین در محیط کشت می‌تواند به بازازایی و تولید شاخصاره، ریشه و رویان‌های سوماتیکی منجر شود. علاوه بر این، مهندسی ژنتیک گیاهی ابزار مفیدی را برای مهندسی مسیرهای متابولیکی در جهت افزایش تولید متابولیت‌های مهم گیاهی فراهم می‌کند که پیش نیاز اصلی و مهم همه این موارد وجود یک سیستم بهینه کالوس‌زایی و بازازایی در گیاه موردنظر است.

با توجه به مطالعات محدود در مورد کشت بافت گیاه *Papaver fugax* در شرایط درون شیشه، این پژوهش با هدف ارزیابی اثر نوع و غلاظت‌های مختلف تنظیم‌کننده‌های رشد بر کالوس‌زایی و بازازایی ریز نمونه‌های برگ این گیاه دارویی انجام گرفت.

## مواد و روش‌ها

برای تهیه ریزنمونه قطعات برگی و انجام کشت بافت از بذرهای جمع‌آوری شده *P. fugax* از اطراف شهرستان اردبیل با مختصات جغرافیایی ۳۸ درجه و ۴/۴۲ دقیقه شمالی و ۴۸ درجه و ۳۶/۸۹ دقیقه شرقی استفاده شد. برای ضدغوفونی سطحی بذرها پس از شستشو با آب مقطر، به مدت ۱۵ دقیقه در هیبیوکلریت سدیم ۱٪ قرار داده شدند. پس از آبکشی با آب مقطر استریل، به مدت ۱ دقیقه در الکل ۹۶ درجه غوطه‌ور شده و بعد از سه بار آبکشی با آب مقطر استریل، بذور در ظروف شیشه‌ای حاوی محیط کشت MS (۱۸) نیمه جامد (۸ گرم در لیتر آگار) کشت شده و در اتفاق رشد با شرایط دمایی  $۲۵\pm 2$  درجه سانتی‌گراد و تناوب نوری ۸ ساعت تاریکی و ۱۶ ساعت روشنایی با نور فلورسنت به منظور رشد و تهیه ریزنمونه قرار داده شدند.

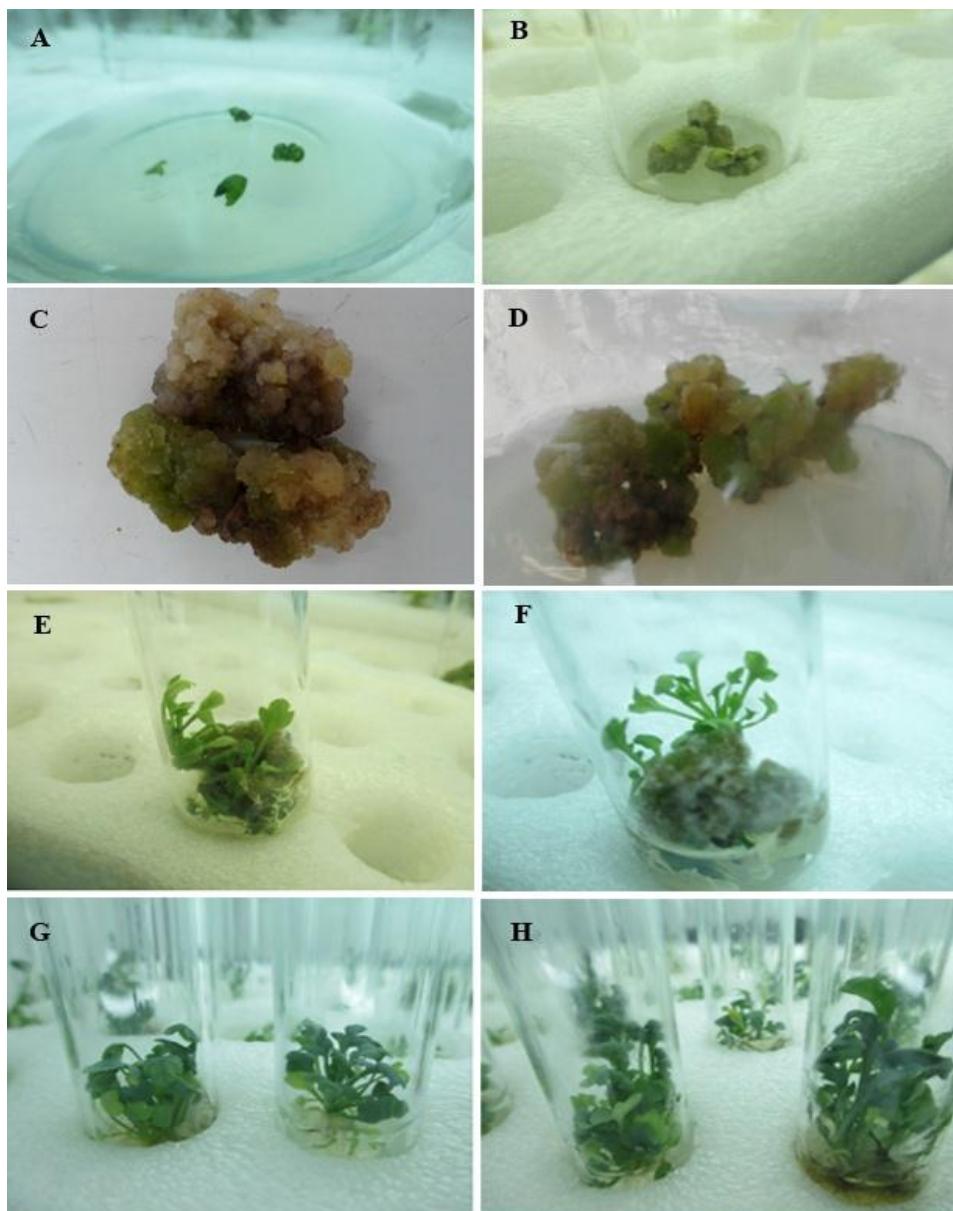
برای تهیه ریزنمونه برگ از گیاهچه‌های رشد کرده در شرایط درون شیشه‌ای (گیاهچه‌های ۲۰ روزه) استفاده شد. به این صورت که برگ‌های تازه و با رشد مناسب تحت شرایط استریل از گیاهان درون شیشه‌ای جدا شده و با استفاده از

میلی‌گرم در لیتر به میزان ۱۰۰ درصد مشاهده شد (شکل ۲). با توجه به این نتایج می‌توان گفت که در مجموع برای القاء کالوس در گونه *P. fugax* وجود تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی اکسینی و سیتوکینینی لازم است و در این ارتباط NAA به مراتب بهتر از ۴D عمل می‌کند (جدول ۱).

از لحاظ وزن تر کالوس اختلاف معنی‌داری بین محیط‌های کشت مختلف، در سطح احتمال یک درصد وجود داشت (شکل ۳). در برخی از محیط‌های کشت کالوس‌ها رشد بیشتری نسبت به محیط‌های دیگر داشتند. مقایسه میانگین نشان داد که وزن تر کالوس ریزنمونه‌های برگی در محیط کشت MS حاوی NAA و BAP هر کدام به میزان ۱ میلی‌گرم در لیتر بیشترین مقدار (۱۸۰۳ میلی‌گرم) بود. این امر نشان می‌دهد که محیط کشت حاوی NAA و BAP هر یک به میزان ۱ میلی‌گرم در لیتر نه تنها باعث القاء مطلوب کالوس در گونه *P. fugax* می‌شود بلکه در رشد مطلوب کالوس هم یک محیط کشت مناسب محسوب می‌شود و محیط کشت حاوی ۱ میلی‌گرم در لیتر NAA و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر MS با ۹۳۶ میلی‌گرم در رتبه بعدی قرار داشت (شکل ۳).

در محیط‌های باززایی بعد از گذشت ۳ ماه از کشت، کالوس‌های تولید شده در برخی از محیط‌های کشت، ساقه نابجا تولید کردند (شکل ۱ E و F). اختلاف معنی‌داری از لحاظ درصد ساقه‌زایی در بین محیط‌های مختلف کشت در سطح احتمال یک درصد وجود داشت (جدول ۲). محیط کشت MS حاوی NAA به میزان ۱ میلی‌گرم در لیتر به همراه ۱ میلی‌گرم در لیتر Kin با ۸/۷ درصد باززایی مناسب‌ترین محیط کشت برای ساقه‌زایی در این گونه بود و محیط کشت MS حاوی NAA به میزان ۱ میلی‌گرم در لیتر به همراه ۱ میلی‌گرم در لیتر BAP با ۵۶/۶ درصد در رتبه بعدی قرار داشت (شکل ۴). انتقال گیاهچه‌های حاصل به محیط کشت MS حاوی غلظت‌های مختلف IAA به همراه BAP و Kin باعث القاء ریشه‌زایی در برخی از محیط‌های کشت شد (شکل ۱ H و G). اختلاف معنی‌داری از لحاظ درصد ریشه‌زایی در بین محیط‌های مختلف کشت در سطح احتمال یک درصد وجود داشت (جدول ۲). مقایسه میانگین نشان داد که محیط کشت MS حاوی Kin به میزان ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر IAA به میزان ۲ میلی‌گرم در لیتر، محیط کشت مناسبی برای ریشه‌زایی است (شکل ۵). درصد ریشه‌زایی در این محیط کشت ۸۳/۳ درصد بود.

(شکل ۱ C، D و B). تجزیه واریانسدادهای (جدول ۱) نشان داد که بین محیط‌های مختلف کشت از لحاظ درصد کالوس‌زایی اختلاف معنی‌داری ( $p < 0.01$ ) وجود داشت. ریزنمونه‌های برگی در محیط کشت حاوی ۰/۴-D یا NAA به تنها‌ی کالوس تولید نکردند و این نشان می‌دهد که وجود اکسین به تنها‌ی نمی‌تواند باعث القای کالوس‌زایی از ریزنمونه برگ در *P. fugax* شود. همچنین در محیط کشت‌های حاوی فقط تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی سیتوکینینی مورد استفاده شامل BAP و Kin نیز القای کالوس مشاهده نشد و این امر نشان‌دهنده این است که وجود BAP و Kin در محیط کشت به تنها‌ی قادر به القای کالوس در این گونه نیست. در محیط کشت‌های حاوی NAA و Kin از هر کدام به میزان ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر و نیز محیط‌های حاوی ۱ میلی‌گرم در لیتر ۰/۵ به همراه ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر Kin، القاء کالوس صورت نگرفت. بنابراین، برای القاء کالوس در *P. fugax* بیاز به ترکیب مناسبی از تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی از نوع اکسین و سیتوکینین وجود دارد. در محیط حاوی ۰/۴-D تشکیل کالوس به مراتب کمتر از محیط‌های حاوی NAA بود (جدول ۱). با توجه به شکل ۲ مشاهده می‌شود که فقط در حضور سیتوکینین BAP به القای کالوس در گونه *P. fugax* کمک می‌کند به طوری که بیشترین مقدار کالوس‌زایی در حضور این هورمون در محیط کشت حاوی ۱ میلی‌گرم در لیتر ۰/۴-D و ۱ میلی‌گرم در لیتر BAP به میزان ۷۵ درصد مشاهده شد. در حالی که میزان کالوس‌زایی در حضور ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر ۰/۴-D و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر Kin به دست آمد. با این حال، در حضور اکسین چندانی بین دو سیتوکینین BAP و Kin وجود نداشت. به طوری که در محیط کشت‌های حاوی ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP یا Kin میزان کالوس‌زایی خیلی کمتر (۲۵ درصد) بود. ولی در محیط کشت‌های حاوی ۱ میلی‌گرم در لیتر NAA و ۱ میلی‌گرم در لیتر Kin به دست آمد. با این حال، در حضور اکسین چندانی بین دو سیتوکینین BAP و Kin وجود نداشت. به طوری که در محیط کشت‌های حاوی ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP بیشترین مقدار کالوس‌زایی مشاهده شد. هر چند اختلاف معنی‌داری بین این چهار محیط کشت از لحاظ القاء کالوس وجود نداشت، ولی بالاترین مقدار کالوس‌زایی در محیط کشت حاوی NAA و Kin از هر یک به میزان ۱



شکل ۱- کالوس‌زایی و باززایی درون شیشه‌ای برگی کشت شده در محیط کشت MS حاوی تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی، (B) شروع کالوس‌زایی در ریز نمونه برگ، C و (D) کالوس‌های تولید شده بعد ۷۰ روز از کشت در محیط کشت MS حاوی NAA و BAP هر کدام به میزان ۱ میلی‌گرم در لیتر، حاوی، E و (F) باززایی کالوس بعد از گذشت ۵ ماه از کشت کالوس‌ها در محیط کشت MS حاوی NAA و Kin هر کدام به میزان ۱ میلی‌گرم در لیتر، G و (H) ریشه‌دار کردن گیاهچه‌های حاصل از کالوس در محیط کشت MS حاوی ۲ میلی‌گرم در لیتر IAA و ۱ میلی‌گرم در لیتر Kin.

Figure 1. *In vitro* callus formation and regeneration of *P. fugax*: A) leaf explants cultured in MS medium, B) callus initiation in leaf explants, C and D) calli produced after 70 days of culture in MS medium containing 1 mg/l of NAA and BAP, E and F) Callus regeneration after 5 months of callus cultivation in MS medium containing 1 mg/l of NAA and Kin, G and H) rooting of callus plantlets in MS medium containing 2 mg/l IAA and 1 mg/l Kin.

جدول ۱- جدول تجزیه واریانس بر اساس طرح کاملاً تصادفی و برخی مقایسات متعامد بین محیط‌های مختلف کشت برای صفات مورد  
مطالعه در کالوس زایی *P. fugax* از ریزنمونه‌های برگی

Table 1. Analysis of variance based on completely randomized design and some of the orthogonal comparisons  
between different media for traits studied in *P. fugax* callus induction from leaf explants

منبع تغییر	درجه آزادی	درصد کالوس زایی	میانگین مربعات	وزن تر کالوس
ترکیبات محیط کشت	۲۳	۴۴۷۷/۵۸ <sup>**</sup>	۵۰۴۸۸/۳۷ <sup>**</sup>	۱۵۹۱۶۸/۱۶ <sup>**</sup>
NAA vs 2,4-D	۱	۱۷۹۰/۱۰ <sup>**</sup>	۹۱۱۷۶/۲۱ <sup>**</sup>	۴۹۳۲/۴۱ ns
NAA در داخل BAP vs Kin	۱	۷۸/۴۱ ns	۴۸۴/۲ ns	۴۸۴/۲ ns
2,4-D در داخل BAP vs Kin	۱	۴۹۲۳/۱۷ <sup>**</sup>	۲۴۳۷۶/۱۳	۲۴۳۷۶/۱۳
2,4-D بدون BAP vs Kin	۱	۲/۶۲ ns	۳۷/۳۴	۳۷/۳۴
خطا	۷۲	۲۳۴/۱۳	۲۴/۶۱	۲۴/۶۱
ضریب تغییرات (%)				

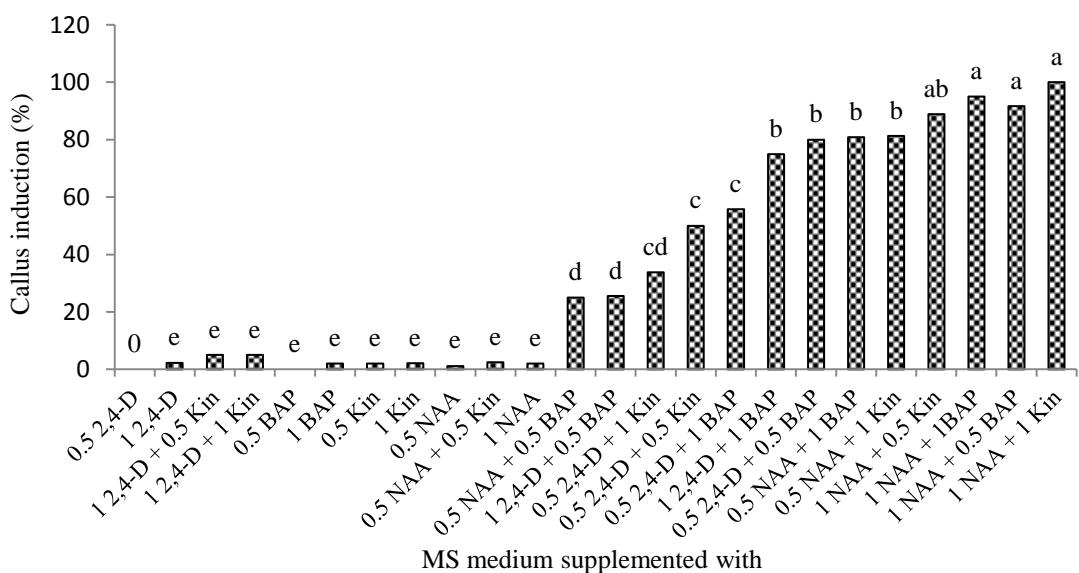
ns: معنی‌دار در سطح احتمال یک درصد، ns: غیر معنی‌دار

جدول ۲- جدول تجزیه واریانس بر اساس طرح کاملاً تصادفی و برخی مقایسات متعامد بین محیط‌های مختلف کشت برای درصد ساقه‌زایی و  
درصد ریشه‌زایی *P. fugax*

Table 2. Analysis of variance based on completely randomized design and some of orthogonal comparisons between  
different media for shoot and root induction percentage of *P. fugax* and some orthogonal comparisons.

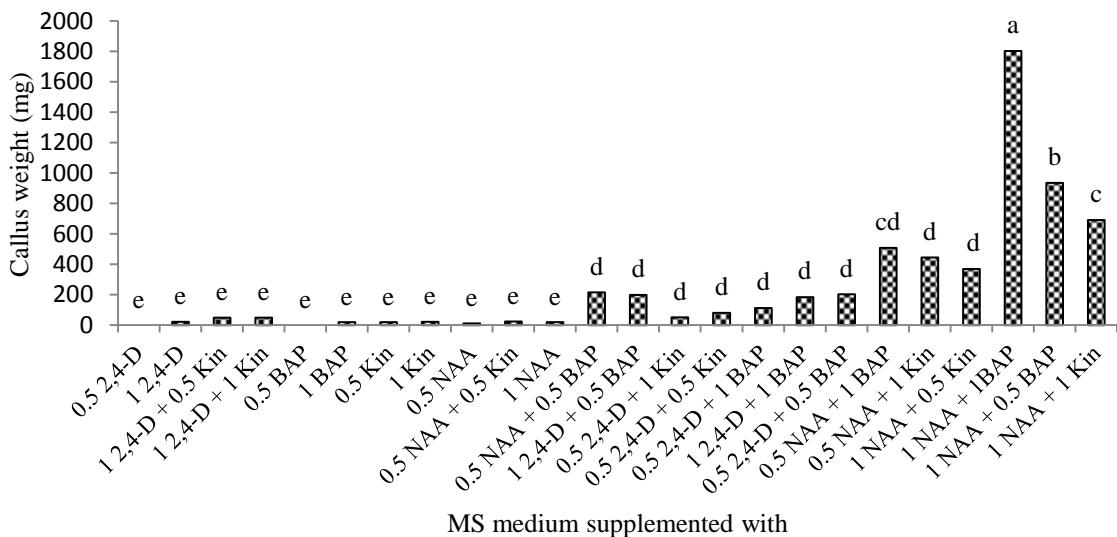
منبع تغییر	درجه آزادی	میانگین مربعات	درصد ریشه‌زایی	منبع تغییر	درصد ساقه‌زایی
ترکیبات محیط کشت	۹	۵۹۶۶/۳۶ <sup>**</sup>	۷۴/۴۸ ns	۶۸۱۳/۶۲ <sup>**</sup>	۱۳
1 IAA vs 2 IAA	۱	۲۵۴۰/۶۴ <sup>**</sup>	۲۵۴۰/۶۴ <sup>**</sup>	۱ NAA vs 0.5 NAA	۱
BAP vs Kin	۱	۵۷/۳۵ ns	۲۲۹۵۲/۵۸ <sup>**</sup>	BAP vs Kin	۱
1 IAA در داخل BAP vs Kin	۱	۴۵۱۸/۴۰ <sup>**</sup>	۶۲/۲۵ ns	1 NAA در داخل BAP vs Kin	۱
2 IAA در داخل BAP vs Kin	۱	۱۹/۶ ns	۳۳۹/۸۹ ns	0.5 NAA در داخل BAP vs Kin	۱
0.5 BAP vs 1 BAP	۱	۰/۴ ns	۱۸۴۲/۲۶	NAA بدون BAP vs Kin	۱
خطا	۲۰	۱۱۲۵/۱۴	۳۲/۹۲	خطا	۲۸
ضریب تغییرات (%)		۳۲/۸۷	۳۲/۸۷	ضریب تغییرات (%)	

ns: معنی‌دار در سطح احتمال یک درصد، ns: غیر معنی‌دار



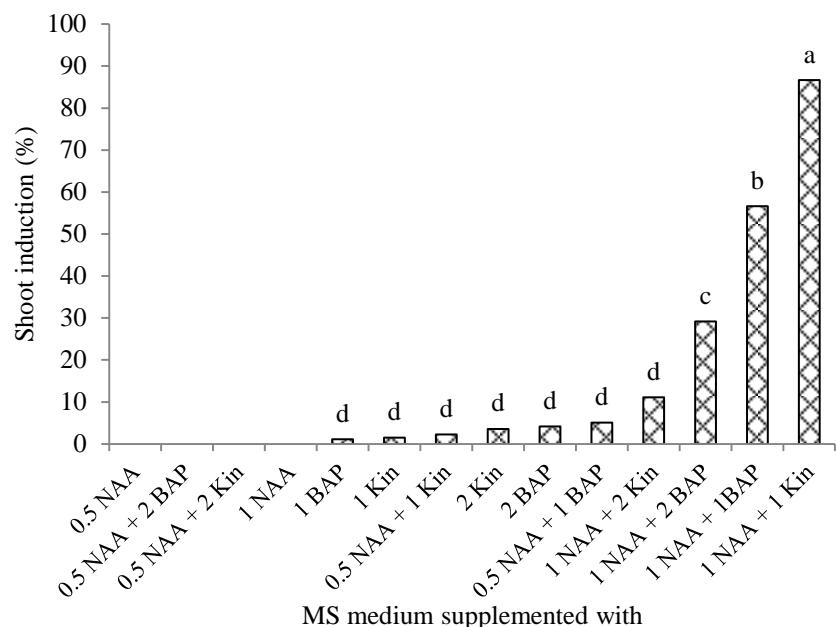
شکل ۲- نمودار تغییرات درصد کالوس زایی گونه *P. fugax* در محیط کشت MS حاوی ترکیبات متفاوت از تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی.  
حرروف غیر مشابه نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد در آزمون توکی است.

Figure 2. Diagram of changes in the callogenesis percentage of *P. fugax* in MS medium containing different  
hormonal combinations. The dissimilar letters indicate a significant difference at the 5% probability level in the  
Tukey test.



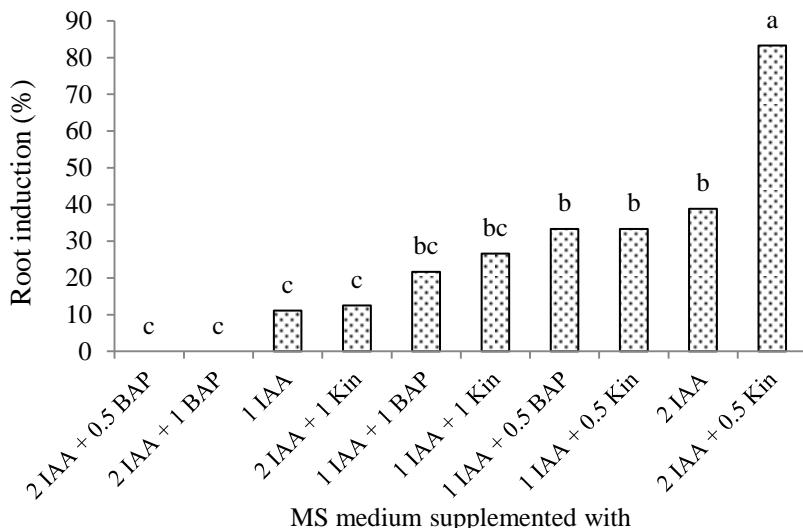
شکل ۳- نمودار تغییرات وزن کالوس گونه *P. fugax* در محیط کشت MS حاوی ترکیبات متفاوت از تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی. حروف غیر مشابه نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد در آزمون توکی است.

Figure 3. Diagram of changes in callus weight of *P. fugax* in MS medium containing different hormonal combinations. The dissimilar letters indicate a significant difference at the 5% probability level in the Tukey test.



شکل ۴- نمودار تغییرات درصد باززایی *P. fugax* در محیط کشت MS حاوی سطوح مختلف NAA و BAP یا Kin. حروف غیر مشابه نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد در آزمون توکی است.

Figure 4. Diagram of changes in regeneration percentage of *P. fugax* in MS medium containing different levels of NAA, BAP or Kin. The dissimilar letters indicate a significant difference at the 5% probability level in the Tukey test.



شکل ۵- نمودار تغییرات میانگین درصد ریشه‌زایی *P. fugax* در محیط کشت MS حاوی سطوح مختلف IAA و BAP یا Kin. حروف غیر مشابه نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد در آزمون توکی است.

Figure 5. Diagram of changes in rooting percentage of *P. fugax* in MS medium containing different levels of IAA, BAP or Kin. The dissimilar letters indicate a significant difference at the 5% probability level in the Tukey test.

*P. orientale* ۷۵/۵ درصد گزارش کردند. همچنین در گونه ۵/۵ گزارش شده است که بیشترین وزن تر کالوس در محیط کشت MS حاوی BAP به میزان ۱/۵ میلی گرم در لیتر و NAA به میزان ۰/۵ یا ۱ میلی گرم در لیتر به دست می‌آید (۱). حسینی و همکاران (۱۱) نیز نشان دادند که بیشترین درصد کالوس‌زایی در ریزنمونه هبیوکوتیل در گونه شقاقیق سیاه (*Papaver bracteatum*) در محیط کشت حاوی ۵ میلی گرم در لیتر NAA و ۰/۵ میلی گرم در لیتر BAP به دست می‌آید. کایا و لاکوود (۱۴) نیز تفاوت‌های بین واریتهای از لحاظ تولید کالوس در محیط کشت MS حاوی غلظت‌های مختلف Kin ۲,4-D در گونه *P. somniferum* ۲,۴-د ۲,۴ در گونه *P. bracteatum* نمودند. در گیاهان دیگر بسته به نوع ریز نمونه مانند *Salvia*, *Anthurium annua*, (۳) *Artemisia annua*, (۴) *officinalis*, *Aristolochia indica*, (۲۳) *andraeanum* (۲۵) و *Anthemis hyalina* (۲۸) نیز ترکیب تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی اکسینی و سیتوکینینی برای القاء کالوس مناسب شناخته شده است. در کل طبق نتایج حاصل در گونه مورد مطالعه در این پژوهش نیز ترکیب مناسب از اکسین و سیتوکینین برای القای کالوس و رشد آن لازم است.

بهترین محیط کشت برای تولید ساقه در *P. fugax* محیط کشت MS حاوی تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی Kin NAA هر کدام به میزان ۱ میلی گرم در لیتر بود. دانشور (۵) توانست با به کار بردن Kin به میزان ۱ میلی گرم در لیتر، NAA به میزان ۱/۵ میلی گرم در لیتر و GA3 به میزان ۰/۱ میلی گرم در لیتر در محیط کشت MS از کالوس *P. bracteatum* ساقه تولید کند. حقیقت حور و همکاران (۱۰) بیان کردند که محیط کشت MS حاوی Kin به میزان ۰/۵ میلی گرم در لیتر و NAA به میزان ۱/۵ میلی گرم در لیتر مناسب‌ترین محیطکشت برای ساقه‌زایی در گونه *P. orientale* است. درصد ساقه‌زایی در این محیط‌های

از اوخر دهه ۶۰ میلادی، تکنولوژی کشت بافت و سلول به عنوان ابزاری جهت مطالعه و تولید متابولیت‌های ثانویه گیاهی معرفی شده است. با استفاده از سیستم کشت بافت و سوپرانسیسیون سلولی می‌توان در مقیاس وسیع سلول‌های گیاهی را کشت و متابولیت‌های ثانویه استخراج کرد (۲۹). تشکیل کالوس به ژنتیک گیاه، ترکیب تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی، نوع ریزنمونه و سن گیاه مادری بستگی داشته و تاثیر میزان و نوع تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی در القاء کالوس به غلط نهادهای درون زاد گیاه بستگی دارد (۱۹). در کشت بافت اغلب از اکسین‌ها و سیتوکینین‌ها و بیشتر به صورت ترکیبی استفاده می‌شود (۹). پژوهش‌هایی ثابت کردند که انواع اکسین‌ها در غلظت‌های مختلف نقش مهمی در تولید کالوس به عهده دارند (۲). در مطالعه حاضر مشخص شد که برای القاء کالوس در *P. fugax* نیاز به ترکیب مناسبی از تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی اکسینی و سیتوکینینی وجود دارد. وجود تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی اکسینی یا سیتوکینینی به تنهایی باعث القای کالوس‌زایی از ریزنمونه برگ در *P. fugax* نشدن. بهترین محیط کشت برای تولید کالوس در *P. fugax* محیط کشت MS حاوی ۱ میلی گرم در لیتر NAA به همراه ۰/۵ یا ۱ میلی گرم در لیتر Kin یا BAP بود. در گونه‌های دیگر *Papaver* نتایج مشابهی گزارش شده است. الهی و گوهری (۱۲) نیز بیان داشتند که بهترین محیط کشت برای تولید کالوس در گونه *P. bracteatum* محیط کشت MS حاوی BAP به میزان ۱/۵ میلی گرم در لیتر و NAA به میزان ۱ میلی گرم در لیتر است. حقیقت حور و همکاران (۱۰)، درصد کالوس‌زایی در گونه *p. pseudo-orientale* را در محیط کشت MS حاوی BAP به مقدار ۰/۵ میلی گرم در لیتر و NAA به مقدار ۰/۵ میلی گرم در لیتر و ۰/۵ میلی گرم بر لیتر، ۷۰ درصد و در محیط کشت B5 حاوی Kin به مقدار ۰/۵ میلی گرم در لیتر و NAA به مقدار ۱ میلی گرم بر لیتر،

۰/۵ میلی‌گرم در لیتر Kin بیشترین درصد ریشه‌زایی را داشت. کامو و همکاران (۱۳) در گیاه *P. somniferum* IPA توانستند با استفاده از محیط کشت MS حاوی (ایزوپنتیل آدنین) و Kin ساقه و در محیط کشت MS حاوی NAA و Kin ریشه تولید کنند. نتیجه کلی این که محیط کشت مناسب برای تولید کالوس در ریزنمونه برگی *P. fugax*, محیط کشت MS حاوی ۱ میلی‌گرم در لیتر NAA و ۰/۵ یا ۱ میلی‌گرم در لیتر است. همچنین بهترین محیط کشت برای ساقه‌زایی BAP کالوس در این گیاه، محیط کشت MS حاوی تنظیم کننده‌های رشد گیاهی Kin و NAA هر یک به میزان ۱ میلی‌گرم در لیتر می‌باشد. بیشترین درصد ریشه‌زایی گیاه‌چه‌های حاصل نیز در محیط کشت MS حاوی و IAA از هر یک به میزان ۱ میلی‌گرم در لیتر به دست آمده است. این نتایج می‌تواند در استقرار کشت سوسپانسیونی برای تولید درون شیشه‌ای متابولیت‌های ثانویه این گیاه و نیز برای انجام مهندسی ژنتیک و متابولیک در این گیاه به منظور بهبود تولید ترکیبات فعال مفید در این گونه سودمند باشد.

کشت ۷۱/۴ و ۶۶/۷ درصد بود. یوشیکاوا و فرویا (۳۰) کالوس‌های *P. somniferum* را در محیط کشت MS حاوی Kin به میزان ۱۰/۱ تا ۱ میلی‌گرم در لیتر واکشت کرده و ساقه تولید کردند. سوانکار و بوهرا (۲۶) بیان داشتند که Kin و IAA باعث ساقه‌زایی از کالوس *P. somniferum* می‌شود. همچنین دی و همکاران (۶) به طور موفقیت‌آمیز گیاهانی را از کشت کالوس‌های دو واریته *P. bracteatum* تولید کردند. رستمپور و همکاران (۲۰) در مطالعه‌ای روی پاسخ به کشت بافت *P. bracteatum* دریافتند که بهترین محیط کشت برای کالوس‌زایی، محیط کشت MS حاوی ۱ میلی‌گرم در لیتر ۲,۴-D و ۱۰/۰ میلی‌گرم در لیتر Kin و ۱۵ میلی‌گرم در لیتر اسید آسکوربیک و بهترین محیط کشت برای تولید ساقه محیط کشت MS دارای ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BA و ۱ میلی‌گرم در لیتر NAA بود.

ریشه‌زایی گیاه‌چه‌های حاصل از کشت کالوس قدم بعدی در استقرار گیاهان درون شیشه‌ای است. در این مطالعه برای ریشه‌زایی شاخصاره‌های حاصل از کشت کالوس از تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی IAA و BAP یا Kin استفاده شد که در آن محیط کشت حاوی ۲ میلی‌گرم در لیتر IAA و

## منابع

- Asghari Zakaria, R., M. Haghigat Hour and N. Zare. 2011. Callus production and regeneration of the medicinal plant *Papaver orientale*. African Journal of Biotechnology, 10(54): 11152-11156.
- Baskaran, P., B. Raja Rajeswari and N. Jayabalan. 2006. Development of an *In vitro* regeneration system in sorghum [*Sorghum bicolor* (L.) Moench] using root transverse thin cell layers (tTCLs). Turkish Journal of Botany, 30: 1- 9.
- Bolta, I., E. Dea Bari, B. Bohanec and S. Andrenek. 2000. A preliminary investigation of ursolic acid (UA) in cell suspension culture of *Salvia officinalis*. Plant Cell, Tissue Organ Culture, 62: 57-63.
- Chenshu, A., X. Wang, X. Yuan, B. Zhao and Y. Wang. 2003. Optimization of cryopreservation of *Artemisia annua* L. callus. Biotechnology Letters, 25: 35-38.
- Daneshvar, Sh. 2005. Adventitious shoot regeneration in *Papaver bracteatum* and *Papaver pseudo-orientale*. MS thesis in plant breeding of Ankara University. Ankara. Turkey.
- Day, K.B., J. Draper and H. Smith. 1986. Plant regeneration and thebaine content of plants derived from callus culture of *Papaver bracteatum*. Plant Cell, 5:471-474.
- Fairbairn, J.W. and F. Hakim. 1973. *Papaver bracteatum* Lindl. : A new plant source of opiates. Journal of Pharmacy and Pharmacology 25: 353-358.
- Fakhari, A.R., S. Nojavan, S.N. Ebrahimi and C.J. Evenhuis. 2010. Optimized ultrasound-assisted extraction procedure for the analysis of opium alkaloids in *Papaver* plants by cyclodextrin-modified capillary electrophoresis. Journal of Separation Science, 33(14): 2153-2159.
- Gang, Y.Y., G.S. Du, D.J. Shi, M. Z. Wang, X.D. Li and Z.L. Hua. 2003. Establishment of *In vitro* regeneration system of the *Atrichum mosses*. Acta Botanica Sinica, 45: 1475-1480.
- Haghigat Hour, M., R. Asghari Zakaria and N. Zare. 2012. Callus production and regeneration of medicinal plant *Papaver pseudo-orientale* under *In vitro* conditions. Iranian Journal of Plant Biology 3(10): 11-22 (In Persian).
- Hosseini B., A. Salimi and A. Sharifi. 2015. A survey of the effect of explants type, plant growth regulators and activated charcoal on callus induction in *Papaver bracteatum*. Iranian Journal of Plant Biology, 7(25): 29-42 (In Persian).
- Ilahi, I. and E.G. Ghauri. 1994. Regeneration in cultures of *Papaver bracteatum* as influenced by growth hormones and temperature. Plant Cell Tissue and Organ Culture, 38: 81-83.
- Kamo, K.K., W. Kimoto, A.F. Hsu, P.G. Mahlberg and D.D. Bills. 1982. Morphinan alkaloids in cultured tissues and re-differentiated organs of *Papaver somniferum*. Phytochemistry, 21(1): 219-222.
- Kaya, N. and B. Lockwood. 1999. A Study of the Alkaloids in callusing plant tissues from a range of Turkish cultivars of *Papaver somniferum*. Turkish Journal of Agriculture and Forestry, 23: 377-381.
- Lavania, U.C. and S. Srivastava. 1999. Quantitative delineation of karyotype variation in *Papaver* as a measure of phylogenetic differentiation and origin. Current science, 77: 429-435.
- Leonard, E., W. Runguphan, S.O. Connor and K.J. Prather. 2009. Opportunity in metabolic engineering to facilitate scalable alkaloid production. Nature Chemical Biology, 5(5): 292-300.
- Mohammadi, F., R. Heidari, S. Hosieni and R. Jamei. 2015. Extraction and determination of

- morphinan alkaloids from different parts of three *Papaver* species in the flowering stage using HPLC. Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants, 31(4): 563-573 (In Persian).
18. Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. Physiologia Planatarium, 15: 473-479.
19. Rao, S., P. Patil, and C.P. Kaviraj. 2005. Callus induction and organogenesis from various explants in *Vinca radiata* (L.). Indian Journal of Biotechnology, 4(4): 556-560.
20. Rostampour, S., S. Hashemi and A. Dehestani. 2010. *In vitro* regeneration of Persian poppy (*Papaver bracteatum*). Biologia, Section Cellular and Molecular Biology, 65(4): 647-652.
21. Salehi, P., A. Sonoboli, A. Fakhari Zavareh, F. Sefidkon, M. Dayeni and B. Cheraghi. 2007. Narcotic alkaloids of four *Papaver* species from Iran. Zeitschrift fur Naturforschung, 62: 16-18.
22. Seddigh, M.D., G. Jolliff, W.M. Calhoun and J. Crane. 1982. *Papaver bracteatum* potential commercial source of codeine. Economic Botany, 36(4): 433-441.
23. Sedaghat, B., N. Babaeian, N. Bagheri and H. Salehian Aghblaq. 2015. Effect of leaf explants types and various levels of 2, 4-D on callus induction and plant regeneration in *Anthurium andraeanum*. Journal of Crop Breeding, 7(16): 203-208 (In Persian).
24. Shafiee, A., Z. Mahmoudi and N. Samadi. 1997. Alkaloids of Papaveraceae XVI. Alkaloids of *Papaver fugax* population Tarom. Journal of Science I. R. Iran, 8(3): 166-169.
25. Soniya, E.V. and M. Sujitha. 2006. An efficient *In vitro* propagation of *Aristolochia indica*. Biologia Plantarum, 50: 272-274.
26. Swankar, P.L. and S.P. Bohra. 1989. Regeneration of shoots buds from callus cultures of *Papaver somniferum*. Current Science, 58: 1382-1384.
27. Tripathi, L. and J.N. Tripathi. 2003. Role of biotechnology in medicinal plants. Tropical Journal of Pharmaceutical Research, 2: 243-253.
28. Valizadeh, M. 2017. Regeneration of medicinal plant *Anthemis hyalina* DC. Journal of Crop Breeding, 9(21): 76-81 (In Persian).
29. Vanisree, M., L. Chen-Yue, L. Shu-Fung, S.N. Nalawade, C.Y. Lin and T. Hsinsheng. 2004. Studies on the production of some important secondary metabolites from medicinal plants by plant tissue culture. Botanical Bulletin of Academia Sinica, 45: 1-22.
30. Yoshikawa, T. and T. Furuya. 1983. Regeneration and *In vitro* flowering of plants derived from callus cultures of opium poppy (*Papaver somniferum*). Experientia, 39(9): 1031-1033.
31. Zargari, A. 1992. Medicinal Plants. 4th edition, Tehran University Press, Tehran, pp: 28-42 (In Persian).

## **Effect of Different Plant Growth Regulators on Callus Induction and Regeneration of *Papaver fugax* Poir.**

**Zahra Olyaei<sup>1</sup>, Rasool Asghari Zakaria<sup>2</sup>, Nasser Zare<sup>3</sup> and Davoud Berenji<sup>4</sup>**

1- M.Sc. Student of Plant Breeding, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, Iran

2- Professor, Faculty of Agriculture and Natural Resources, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, Iran,  
(Corresponding author: r-asghari@uma.ac.ir)

3- Associate Professor, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, Iran

4- Department of Technology and Education, General Department of Education of Ardabil Province, Ardabil, Iran  
Received: January 4, 2020      Accepted: January 27, 2020

### **Abstract**

*Papaver fugax* Poir. from *Meconidium* section of *Papaver* is an important source for alkaloids. Given the presence of thebain, morphine and codeine in this plant, biotechnological studies, especially *In vitro* culture of this plant would be of importance. In this study, callus induction and *In vitro* regeneration of this species from leaf explants in MS medium containing different levels of naphthalene acetic acid (NAA), 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D), Kinetin (Kin) and Benzyl adenine purine (BAP) was investigated at 25 °C and 16 h light and 8 h darkness based on a completely randomized design with three replications. Analysis of variance showed that for callus induction rate and callus weight, there were significant ( $p<0.01$ ) differences between different culture media. Based on results, the proper medium for callus induction of leaf explants was MS medium supplemented with 1 mg/l NAA and 1 or 0.5 mg/l BAP. The highest callus fresh weight was obtained in MS medium supplemented with 1 mg/l NAA and 1 mg/l BAP. *In vitro* regeneration of this species from leaf explants was also investigated in MS medium containing different levels of NAA, Kin and BAP and the best medium for regeneration was MS medium supplemented with 1 mg/l Kin and 1 mg/l NAA. By inspecting rooting of seedlings in MS medium containing different levels of indole acetic acid (IAA) plus Kin or BAP, the highest rooting percentage was obtained in MS medium containing 1 mg/l of each of IAA and Kin.

**Keywords:** Callus induction, *In vitro* culture, *Papaver fugax*, Phytohormones, Regeneration