دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری
پژوهشنامه اصلاح گیاهان زراعی

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

زهرا علیایی[۱]، رسول اصغری زکریا[۲]، ناصر زارع[۳] و داود برنجی[۴]

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

چکیده

گونهٔ *Papaver fugax* Poir. از بخش Meconidium جنس Papaver منبع مهمی برای آلکالوئیدها است. با توجه به وجود تبائین، مورفین و کدئین در این گیاه، مطالعات بیوتکنولوژی به ویژه کشت درون شیشه‌ای این گیاه حائز اهمیت است. در این پژوهش تولید کالوس و باززایی درون‌شیشه‌ای این گونه از ریزنمونه‌های برگ در محیط کشت MS حاوی سطوح مختلف تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی نفتالین استیک اسید (NAA)، ۲،٤ دی‌کلروفنوکسی استیک اسید (2,4-D)، کینتین (Kin) و بنزیل آدنین پورین (BAP) در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و دوره نوری ١٦ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی در قالب طرح کاملا 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 ریزنمونه برگی، محیط کشت MS حاوی ۱ میلی‌گرم در لیتر NAA و ۰/۵ یا ۱ میلی‌گرم در لیتر از BAP بود. بیشترین مقدار وزن تر کالوس در محیط کشت MS حاوی NAA و BAP هر یک به میزان ۱ میلی‌گرم در لیتر به دست آمد. باززایی درون‌شیشه‌ای این گونه از ریزنمونه‌های برگ در محیط کشت (MS) حاوی سطوح مختلف NAA، Kin وBAP 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 استیک 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

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، آلکالوئیدها هستند که با داشتن اثرات بیولوژیکی متنوع از نظر دارویی از اهمیت فراوانی برخوردارند. آلکالوئیدهای ایزوکینولینی انتشار وسیعی در گیاهان تیره پاپاوراسه دارند و مصرف آنها در درمان بیماری‌ها از قدیم‌الایام معمول بوده است. جنس *Papaver* از خانواده Papaveraceae دارای گونه‌های متعددی با پتانسیل استفاده در صنعت داروسازی است (۲۲). گونهٔ *Papaver fugax* از بخش درون جنسی Meconidium، دیپلوئید و عدد پایه کروموزومی آن ۷ است (۱۵) که در استان اردبیل به ویژه در مناطق مرتفع رویش دارد. این گونه گیاهی است علفی و دو ساله به ارتفاع ۲۰-۶۰ سانتی‌متر که در شیب‌های تند مناطق استپی به صورت افراشته می‌روید. ساقهٔ آن به ویژه در قسمت‌های پایین خیلی شکننده است. روی برگ‌ها و غنچه‌های آن کرک‌های ریزی وجود دارد. میوه به صورت کپسول به طول ۱۶-۱۴ میلی‌متر و قطر ۸-۴ میلی‌متر است. گل‌های آن اثر آرام بخش، معرق، خلط‌آور، ضد برونشیت، سرفه، آسم و غیره و دانه‌های آن اثر ملین ملایم دارند (۳۱). آلکالوئید تبائین که در غلظت بیشتر در ساقه و در غلظت کم در سایر اندام‌های این گیاه وجود دارد (۲۴)، قابل تبدیل به کدئین و داروهای دیگر مانند نالوکسان، هیدروکدئین و اکسی‌کدئین است (۷). فوگاپاوین، مکامبرین، پرونوسیفرین، نورنوسیفرین، رومرین، سالوتاریدین، پروتوپین، تبائین از آلکالوئیدهای موجود در *Papaver fugax* هستند (۲۴). محمدی و همکاران (۱۷) بیان کردند که بیشترین میزان آلکالوئید در *P. bracteatum* و *Papaver pseudo-orientale* در کپسول و ریشه آنها وجود دارد در حالی که در گونه *P. fugax* در ساقه مشاهده می‌شود. طبق گزارش آنها مقدار کدئین در ساقهٔ *P. fugax* به مراتب بیشتر از دو گونهٔ *P. orientale* و *P. bracteatum* است. صالحی و همکاران (۲۱) در مطالعه‌ای روی *P. fugax* مقدار کدئین را ppm ۱۷۹/۶ و مقدار تبائین را ppm ۳۴/۲ گزارش کردند. فخاری و همکاران (۸) نیز حضور کدئین در *P. fugax* را گزارش کرده‌اند.

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

آدنین (BA) گزارش کردند. همچنین در تحقیق انجام گرفته روی گیاه *P. orientale* حداکثر 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 کلروفنوکسی 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 غلظت 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 کینتین (Kin) ساقه و در محیط کشت MS حاوی نفتالین استیک اسید (NAA) و Kin ریشه 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 باززایی و تولید شاخساره، 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 باززایی در گیاه مورد نظر 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 غلظت‌های مختلف تنظیم‌کننده‌های رشد بر کالوس‌زایی و باززایی ریز نمونه‌های برگ این گیاه دارویی انجام گرفت.

مواد و روش‌ها

برای تهیه ریزنمونهٔ قطعات برگی و انجام کشت بافت از بذرهای جمع‌آوری‌شدهٔ *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 ضدعفونی سطحی بذرها پس از شستشو با آب مقطر، به مدت ۱۵ دقیقه در هیپوکلریت 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 اتاقک رشد با شرایط دمایی ۲±۲۵ 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 درون‌شیشه‌ای جدا شده و با استفاده از اسکالپل تیز و در داخل آب مقطر استریل به قطعات کوچک بریده شدند. ریزنمونه‌های تهیه شده (به تعداد ۱۰ ریزنمونه در هر ظرف پتری)، روی محیط کشت‌های MS حاوی سطوح مختلف اکسین 2,4-D یا NAA (هر کدام در سه غلظت 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 پتری کشت شدند. در مجموع ۲۴ نوع ترکیب مختلف از تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی در قالب طرح کاملا تصادفی با سه تکرار مورد ارزیابی قرار گرفتند. در این مطالعه از اسید آسکوربیک به مقدار ۱۵ میلی‌گرم در لیتر برای جلوگیری از قهوه‌ای شدن کالوس‌ها استفاده شد (۲۰). کشت‌ها در اتاقک رشد با دمای ۲±۲۵ 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 شاخسار 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 غلظت (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 باززایی، 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 باززایی 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.

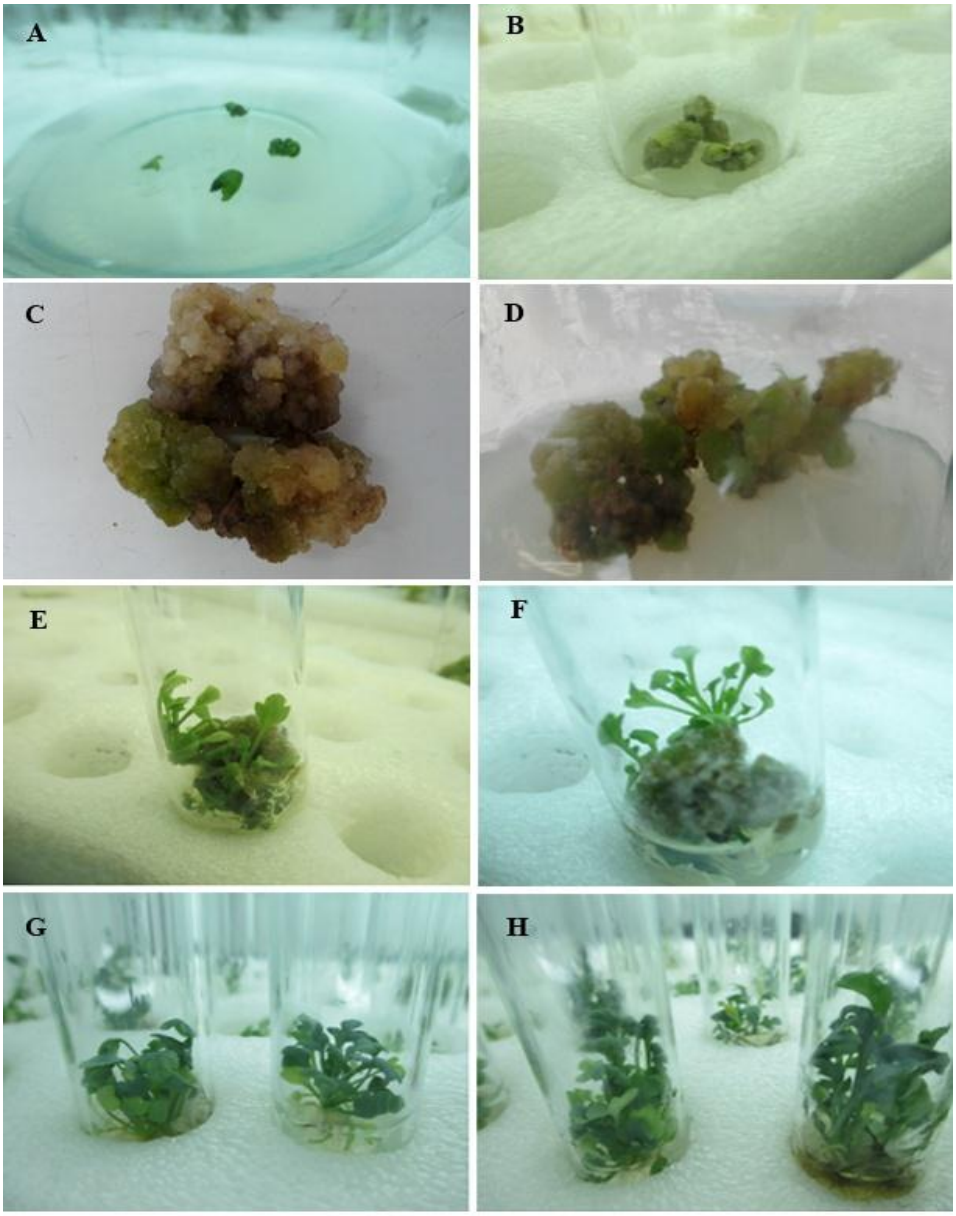
نتایج و بحث

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

(شکل ۱ B، C و D). تجزیه واریانس داده‌ها (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 2,4-D یا NAA به تنهایی کالوس تولید نکردند و این نشان می‌دهد که وجود اکسین به تنهایی 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 القا کالوس مشاهده نشد و این امر نشان‌دهندهٔ این است که وجود BAP و Kin در محیط کشت به تنهایی 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 2,4-D به همراه ۰/۵ یا ۱ میلی‌گرم در لیتر Kin، القاء کالوس صورت نگرفت. بنابراین، برای القاء کالوس در *P. fugax* نیاز به ترکیب مناسبی از تنظیم کننده‌های رشد گیاهی از نوع اکسین و سیتوکینین وجود دارد. در محیط حاوی 2,4-D تشکیل کالوس به مراتب کمتر از محیط‌های حاوی NAA بود (جدول ۱). با توجه به شکل ۲ مشاهده می‌شود که 2,4-D 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 محیط‌کشت حاوی ۱ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D و ۱ میلی‌گرم در لیتر BAP به میزان ۷۵ درصد مشاهده شد. در حالی‌که میزان کالوس‌زایی در حضور 2,4-D و Kin خیلی کمتر بود و بیشترین مقدار آن در محیط کشت حاوی ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر Kin به میزان ۵۰ درصد به دست آمد. با این حال، در حضور اکسین NAA تفاوت 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 یا ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر از هر یک از تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی BAP و Kin 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 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 2,4D 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 MS حاوی ۱ میلی‌گرم در لیتر NAA و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP 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 ۸۶/۷ 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 Kin و BAP 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 و 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- کالوس‌زایی و باززایی درون شیشه‌ای در *P. fugax*: A) ریزنمونه‌های 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 گذشت 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 کاملا تصادفی و برخی مقایسات متعامد بین محیط‌های مختلف کشت برای صفات مورد مطالعه در کالوس‌زایی *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	میانگین مربعات	
		درصد کالوس‌زایی	وزن تر کالوس
ترکیبات محیط کشت	۲۳	۴۴۷۷/۵۸**	۵۰۴۸۸۷/۳۷**
NAA vs 2,4-D	۱	۱۷۹۰/۱۰**	۱۵۹۱۶۸۶/۱۶**
BAP vs Kin در داخل NAA	۱	۷۸/۴۱^{ns}	۹۱۱۷۶۷/۲۱**
BAP vs Kin در داخل 2,4-D	۱	۴۹۲۳/۱۳**	۴۹۳۲۸/۴۱^{ns}
BAP vs Kin بدون NAA و 2,4-D	۱	۳/۶۳^{ns}	۴۸۴/۲^{ns}
خطا	۷۲	۲۳۴/۱۳	۲۴۳۷۶۸/۱۳
ضریب تغییرات (٪)		۲۴/۶۱	۳۷/۳۴

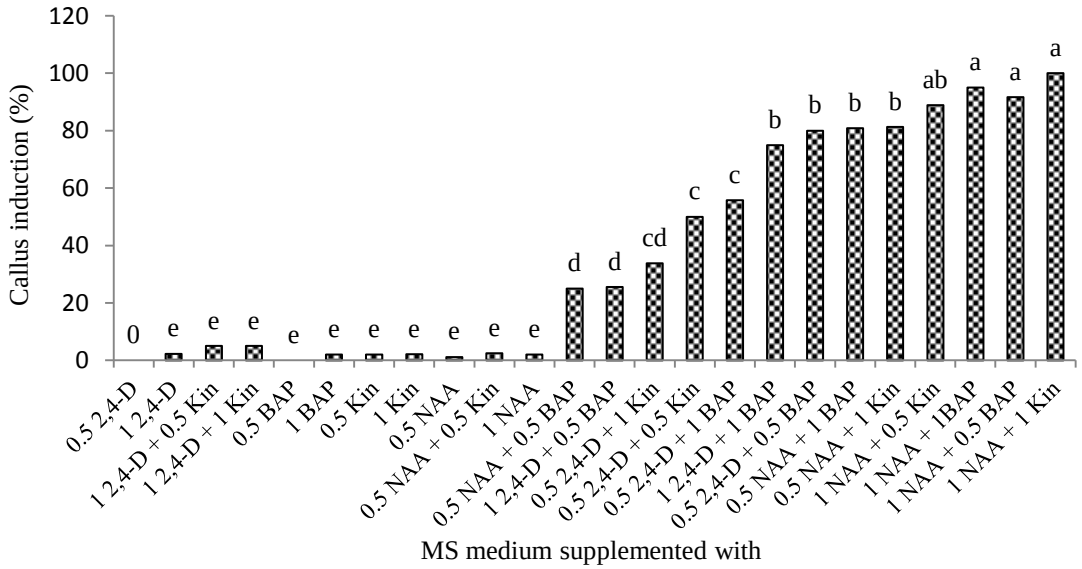
**: معنی‌دار در سطح احتمال یک درصد، ns: غیر معنی‌دار

جدول ۲- جدول تجزیه واریانس بر اساس طرح کاملا 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.

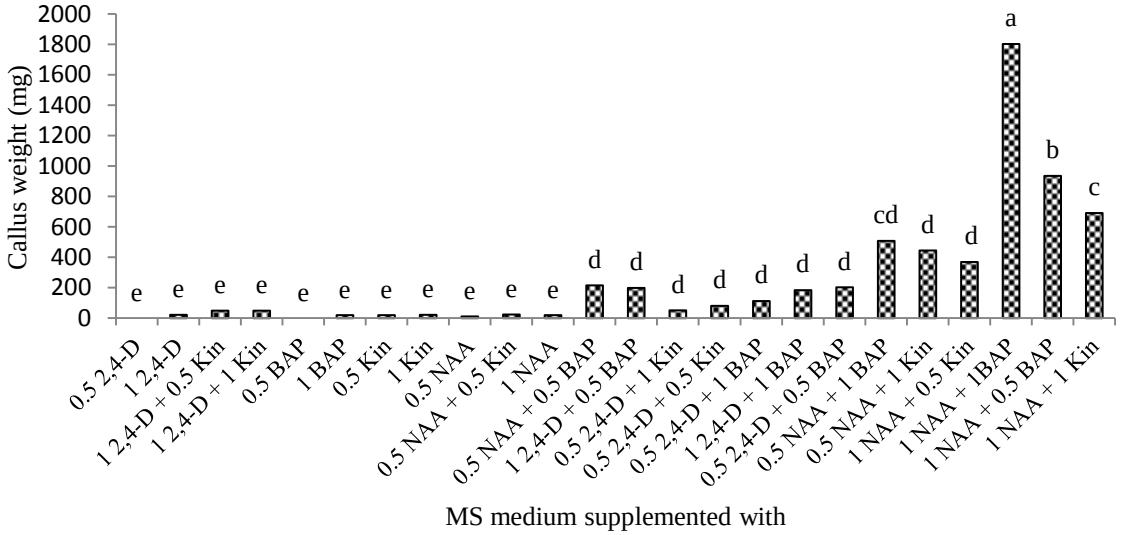
درصد ساقه‌زایی			درصد ریشه‌زایی		
منبع تغییر	درجه آزادی	میانگین مربعات	منبع تغییر	درجه آزادی	میانگین مربعات
ترکیبات محیط کشت	۱۳	۶۸۱۳/۶۲**	ترکیبات محیط کشت	۹	۵۹۲۶/۳۶**
1 NAA vs 0.5 NAA	۱	۲۵۸۵۱/۴۸**	1 IAA vs 2 IAA	۱	۷۴/۴۸^{ns}
BAP vs Kin	۱	۶۷/۳۵^{ns}	BAP vs Kin	۱	۲۵۴۰۶/۶۴**
BAP vs Kin در داخل 1 NAA	۱	۴۵۱۸/۴۰**	BAP vs Kin در داخل 1 IAA	۱	۲۲۹۵۳/۶۸**
BAP vs Kin در داخل 0.5 NAA	۱	۱۹/۶۰^{ns}	BAP vs Kin در داخل 2 IAA	۱	۶۲/۲۵^{ns}
BAP vs Kin بدون NAA	۱	۰/۰۳^{ns}	0.5 BAP vs 1 BAP	۱	۳۳۹/۸۹^{ns}
خطا	۲۸	۱۱۲۵/۱۴	خطا	۲۰	۱۸۴۲/۲۶
ضریب تغییرات (٪)		۳۳/۸۷	ضریب تغییرات (٪)		۳۲/۹۲

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



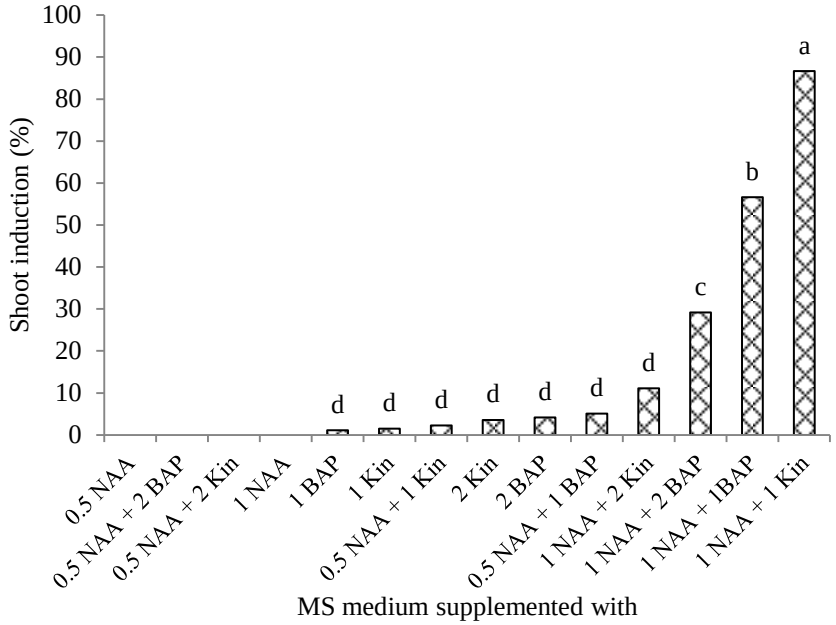
شکل ۲- نمودار تغییرات درصد کالوس‌زایی گونه *P. fugax* در محیط کشت MS حاوی ترکیبات متفاوت از تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی. حروف غیرمشابه نشان‌دهندهٔ اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد در آزمون توکی است.

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.



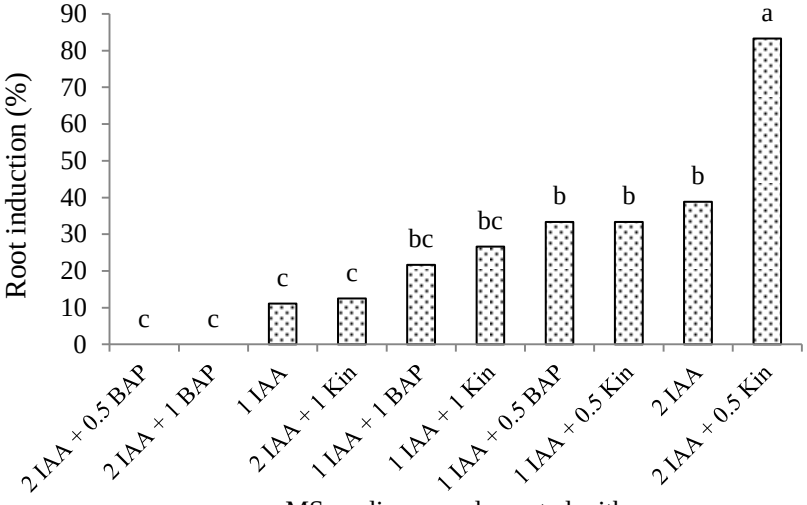
شکل ۳- نمودار تغییرات وزن کالوس گونه *P. fugax* در محیط کشت MS حاوی ترکیبات متفاوت از تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی. حروف غیرمشابه نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد در آزمون توکی است.

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.



شکل۴- نمودار تغییرات درصد باززایی *P. fugax* در محیط کشت MS حاوی سطوح مختلف NAA و BAP یا Kin. حروف غیرمشابه نشان‌دهندهٔ 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 غیرمشابه نشان‌دهندهٔ 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.

از اواخر 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 سوسپانسیون سلولی می توان در مقیاس وسیع سلول‌های گیاهی را کشت و متابولیت‌های ثانویه استخراج کرد (۲۹). تشکیل کالوس به ژنوتیپ 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 غلظت هورمون‌های درون‌زاد گیاه بستگی دارد (۱۹). در کشت بافت اغلب از اکسین‌ها و سیتوکینین‌ها و بیشتر به صورت ترکیبی استفاده می‌شود (۹). پژوهش‌هایی ثابت کرده‌اند 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* نشدند. بهترین محیط کشت برای تولید کالوس در *P. fugax* محیط کشت MS حاوی ۱ میلی‌گرم در لیتر NAA به همراه ۰/۵ یا ۱ میلی‌گرم در لیتر BAP یا Kin 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 ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر و NAA به میزان ۱ میلی‌گرم 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 میلی‌گرم در لیتر و NAA به مقدار ۰/۵ یا ۱ میلی‌گرم بر لیتر، ۷۰ درصد و در محیط کشت B5 حاوی Kin به مقدار ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر و NAA به مقدار ۱ میلی‌گرم بر لیتر، ۷۵/۵ درصد گزارش کردند. همچنین در گونه *P. orientale* گزارش شده است که بیشترین وزن تر کالوس در محیط‌کشت MS حاوی BAP به میزان ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر و NAA به میزان ۰/۵ یا ۱ میلی‌گرم در لیتر به دست می‌آید (۱). حسینی و همکاران (۱۱) نیز نشان دادند که بیشترین درصد کالوس‌زایی در ریزنمونه هیپوکوتیل در گونه شقایق سیاه (*Papaver bracteatum*) در محیط کشت حاوی ۵ میلی‌گرم در لیتر NAA و ۰/۵ میلی‌گرم 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 و 2,4-D در گونه *P. somniferum* گزارش نمودند. در گیاهان دیگر بسته به نوع ریز نمونه مانند *Salvia officinalis* (۳)، *Artemisia annua* (۴)، *Anthurium andraeanum* (۲۳)، *Aristolochi indica* (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 و NAA هر کدام به میزان ۱ میلی‌گرم در لیتر بود. دانشور (۵) توانست با به کار بردن Kin به میزان ۱ میلی‌گرم در لیتر، NAA به میزان ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر و GA3 به میزان ۰/۱ میلی‌گرم 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 میلی‌گرم در لیتر و NAA به میزان ۰/۵ یا ۱ میلی‌گرم در لیتر مناسب‌ترین محیط‌کشت برای ساقه‌زایی در گونه *P. orientale* است. درصد ساقه‌زایی در این محیط‌های

کشت ۷۱/۴ و ۶۶/۷ درصد بود. یوشیکاوا و فرویا (۳۰) کالوس‌های *P. somniferum* را در محیط کشت MS حاوی Kin به میزان ۰/۱ 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* تولیدکردند. 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 2,4-D و ۰/۱ 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 شاخساره‌های 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 ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر Kin بیشترین درصد ریشه‌زایی را داشت. کامو و همکاران (۱۳) در گیاه *P. somniferum* توانستند با استفاده از محیط کشت MS حاوی IPA (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 BAP است. همچنین بهترین محیط کشت برای ساقه‌زایی کالوس در این گیاه، محیط کشت MS حاوی تنظیم‌کننده‌های 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 IAA و Kin 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.

منابع

1. Asghari Zakaria, R., M. Haghighat Hour and N. Zare. 2011. Callus production and regeneration of the medicinal plant *Papaver orientale*. African Journal of Biotechnology, 10(54): 11152-11156.
2. 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.
3. 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.
4. 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.
5. Daneshvar, Sh. 2005. Adventitious shoot regeneration in *Papaver bracteatum* and *Papaver pseudo-orientale*. MS thesis in plant breeding of Ankara University. Ankara. Turkey.
6. 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.
7. Fairbairn, J.W. and F. Hakim. 1973. *Papaver bracteatum* Lindl. : A new plant source of opiates. Journal of Pharmacy and Pharmacology 25: 353-358.
8. 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.
9. 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.
10. Haghighat 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).
11. Hosseini B., A. Salimi and A. Sharafi. 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).
12. 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.
13. 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.
14. 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.
15. 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.
16. 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.
17. Mohammadi, F., R. Heidari, S. Hosieni and R. Jamei. 2015. Extraction and determination of

morphinane 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 Planetarium, 15: 473-479.
19. Rao, S., P. Patil, and C.P. Kaviraj. 2005. Callus induction and organogenesis from various explants in *Vinga 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[1], Rasool Asghari Zakaria[2], Nasser Zare[3] and Davoud Berenji[4]

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
Recived: January 4, 2020 Accepted: January 27, 2020

Abstract

Papavear 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