دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری
پژوهشنامه اصلاح گیاهان زراعی

"مقاله پژوهشی"

تأثیر ترکیبات مختلف تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی در محیط کشت MS بر القای کالوس و باززایی مستقیم گیاه دارویی گالگا

رسول اصغری زکریا[۱]، مریم خضری[۲]، ناصر زارع[۳] و سمیرا مینایی میناباد[۴]

۱- استاد گروه تولید و ژنتیک گیاهی، دانشگاه محقق اردبیلی، (نویسنده مسوول: r-asghari@uma.ac.ir)
۲- دانشجوی دکتری بیوتکنولوژی، دانشگاه محقق اردبیلی
۳- دانشیار گروه تولید و ژنتیک گیاهی، دانشگاه محقق اردبیلی
۴- دانش‌آموخته کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشگاه محقق اردبیلی
تاریخ ارسال: ۹۹/۰۷/۱۱ تاریخ پذیرش: ۹۹/۱۲/۲۰
صفحه: ۹۴ تا ۱۰۸

چکیده

این پژوهش با هدف ارزیابی اثر نوع و غلظت‌های مختلف تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی بر کالوس‌زایی و باززایی ریزنمونه‌های مختلف گیاه دارویی گالگا (*Galega officinalis*) در محیط کشت MS انجام شد. به‌منظور القای کالوس، ریزنمونه‌های برگ، ریشه، هیپوکوتیل و ساقه گره‌دار این گیاه روی محیط کشت MS حاوی غلظت‌های مختلف از 2,4-D (۰/۵، ۱، ۳ و ۵ میلی‌گرم در لیتر) در ترکیب با BAP و یا Kin (هر یک صفر، ۰/۵، ۱ و ۳ میلی‌گرم در لیتر) کشت شدند. نتایج نشان داد که 2,4-D در ترکیب با Kin در القای کالوس بسیار مؤثر بوده و در بیشتر غلظت‌های مورد استفاده منجر به القای ۱۰۰ درصدی کالوس شد. از بین آنها، ترکیب ۵ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D با ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر Kin در ریزنمونه ساقه گره‌دار موجب بیشترین رشد کالوس با میانگین ۱۴۵۰ میلی‌گرم وزن تر کالوس شد. به‌منظور القای باززایی، ریزنمونه‌های برگ، کوتیلدون و ساقه گره‌دار در محیط حاوی غلظت‌های مختلف از BAP یا Kin در ترکیب با NAA کشت شدند. با این حال باززایی تنها در ریزنمونه ساقه گره‌دار مشاهده شد. بیشترین میزان باززایی مربوط به غلظت ۰/۱: ۰/۲۵ در هر دو ترکیب BAP:NAA و Kin:NAA با میانگین ۹۳/۳۳ درصد بود. بیشترین میزان شاخساره القا شده (با میانگین ۲/۸۶ شاخساره) و بیشترین طول شاخساره (با میانگین ۵/۶ سانتی‌متر) در هر ریزنمونه مربوط به ترکیب BAP:NAA به‌ترتیب با غلظت ۰/۵ :۲ و ۰/۱: ۲ میلی‌گرم در لیتر بود. نوساقه‌های حاصل از آزمایش باززایی جهت ریشه‌دار شدن، به محیط کشت MS حاوی سطوح مختلف NAA و IAA منتقل شدند. نتایج مقایسات میانگین نشان داد که غلظت‌های ۰/۲۵ و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA یا IAA منجر به بیشترین درصد ریشه‌زایی با میانگین حدود ۹۰ درصد شدند. بیشترین تعداد ریشه القا شده مربوط به گیاهچه‌های کشت‌شده در تیمار ۰/۲۵ میلی‌گرم در لیتر از هر دو تنظیم‌کننده رشد NAA و IAA (با میانگین ٤ ریشه در ریزنمونه) و همچنین بیشترین طول ریشه، در گیاهچه‌های کشت‌شده در غلظت ۰/۲۵ میلی‌گرم در لیتر IAA (با میانگین ٦/٥ سانتی‌متر) مشاهده شد. در این پژوهش، مناسب‌ترین ترکیب محیط کشت و ریزنمونه به‌منظور کالوس‌زایی و باززایی مستقیم گیاه گالگا معرفی شد که می‌تواند در مطالعات زیست‌فناوری آتی در این گیاه دارویی مفید باشد.

واژه‌های کلیدی: باززایی، کالوس، کشت درون شیشه‌ای، هورمون‌های گیاهی، *Galega officinalis*

مقدمه

گالگا (*Galega officinalis*)، یا علف شیرآور یکی از گیاهان دارویی مهم دنیا است که گزارش‌های مختلفی در مورد خواص دارویی آن از جمله خواص ضدباکتریایی و ضددیابتی وجود دارد (۱۳،۳۲). گالگا از خانواده لگومینوز و زیر خانواده Faboideae، یک گیاه چند ساله با گل‌های سفید، آبی و بنفش و ریشه‌های بلند است که در بیشتر مناطق معتدل از جمله جنوب شرقی اروپا، خاورمیانه، آسیای غربی و بخشی از ایالات متحده آمریکا یافت می‌شود (۱۰) و در آرژانتین، شیلی، اکوادور، نیوزیلند، ایالات متحده آمریکا، روسیه و چین نیز شناخته شده است (۳۵). بر اساس گزارش‌های مختلف این گیاه بومی اروپا، روسیه و ایران است که به‌ویژه در مناطق مرطوب رشد می‌کند (۳۷،۴۷). شرکت‌های دارویی مانند شرکت زردبند ارقام وارداتی این گیاه را در سطح نسبتاً وسیعی از کشور به‌ویژه استان گلستان برای استفاده دارویی کشت می‌کنند. ارتفاع این گیاه به ۱/۵ متر می‌رسد و از طریق دانه تکثیر می‌شود (۱۹،۱۸). غلاف دانه گالگا به‌طول حدود ۲/۵ سانتی‌متر، باریک و در مقطع عرضی مدور است (۵۷). گالگا در ماه‌های تابستان و در خاک‌های مرطوب رشد می‌کند. این گیاه بدون بو است، فقط زمانی که لهیده شود بوی نامطبوعی تولید می‌کند (۳۷). گالگا در امتداد آبراهه‌ها و در مناطق مرطوب گسترش یافته است، این گیاه نور خورشید را ترجیح می‌دهد، اما سایه را نیز تحمل می‌کند (۳۴).

حدود ۲۰ ماده فعال بیولوژیکی از *G. officinalis* جدا شده‌اند که از این بین می‌توان به آلکالوئیدها (مانند گالگین)، ساپونین‌ها، فلاونوئیدها (مانند ساتیوان و مدیکارپین) (۳۶)، فیتواستروژن‌ها (مانند تری‌گلیکوزید فلاونول، کامفرول و کوئرستین) (۴۸) تانن‌ها (۱۵) و اسیدهای چرب (مانند اسید آلفا-لینولنیک، اسید پالمیتیک و اسید لینولئیک) (۴۸)، گلیکوزیدها، فنول‌ها، رزین‌ها، ترپن‌ها و استروئیدها اشاره کرد که منجر به خواص ضددیابتی، ضدسرطانی (۳۶)، ضدباکتریایی (۵)، ضد التهابی (۳۱) و شیرافزایی (۲۵) در این گیاه می‌شوند.

گالگا در طب سنتی برای درمان علائمی که امروزه به دیابت نوع ۲ نسبت داده شده مورد استفاده قرار می‌گرفته است (۳۱،۱۰). در واقع، متفورمین، داروی ضددیابت متداول، مطمئن و ارزانی است که در سال ۱۹۵۰ در ایالات متحده آمریکا، از گالگین که از مشتقات گوانیدینی *G. officinalis* است، ایجاد شد (۵۸،۱۳).

امروزه گیاهان دارویی به‌دلیل عدم وجود عوارض جانبی و سازگاری زیستی بیشتر با بافت‌های انسانی دارای اثرات درمانی بیشتری بوده و از اهمیت ویژه‌ای برخوردارند (۲،۹،۳۹). شهرنشینی، تخریب جنگل‌ها، آلودگی، تغییرات آب و هوا و بلاهای طبیعی موجب شده که این گیاهان در زیستگاه طبیعی خود در معرض خطر باشند (۱۴). همچنین برخی از این گیاهان دارویی در زیستگاه‌های طبیعی خود به‌صورت بی‌رویه‌ای جمع‌آوری می‌شوند و هیچ اقدامی برای کشت مجدد آنها انجام نمی‌شود. در نتیجه، این گیاهان در معرض خطر انقراض قرار دارند (۱۲). با توجه به اینکه تکثیر و محافظت از گونه‌های گیاهی در معرض خطر از طریق روش‌های سنتی دشوار است، چنین تهدیداتی را می‌توان از طریق روش‌های زیست‌فناوری مانند کشت بافت جهت تولید تعداد زیادی از گیاهان، که از نظر ژنتیکی و بیوشیمیایی مشابه گیاه مادری هستند، برطرف کرد (۳). تکنولوژی کشت بافت گیاهی به‌طور گسترده‌ای برای تکثیر گیاهان به‌منظور کاربردهای تجاری مورد استفاده قرار می‌گیرد (۵۴). یک ریزنمونه منفرد می‌تواند در مدت کوتاه و فضای محدودی در شرایط کنترل‌شده و صرف‌نظر از تغییرات فصلی و آب و هوایی در طول سال، به چندین هزار گیاهچه تبدیل شود (۲۶). در سال‌های اخیر، گونه‌های بومی در معرض خطر و نادر به‌طور موفقیت‌آمیزی با استفاده از فناوری کشت بافت گیاهی تکثیر و محافظت شده‌اند (۵۶). همچنین انجام مطالعات بیوتکنولوژیکی مانند انتقال ژن و دستکاری ژنتیکی (۲۸) و دستیابی به تنوع سوماکلونال (۲۹)، و نیز مهندسی مسیرهای متابولیکی در جهت افزایش تولید متابولیت‌های مهم گیاهی نیازمند وجود یک سیستم بهینه کالوس‌زایی و باززایی در گیاه مورد نظر است.

برهمکنش تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی به‌ویژه اکسین و سیتوکینین نقش مهمی در موفقیت کالوس‌زایی و باززایی ریزنمونه در شرایط کشت بافت دارند (۱۶) تکثیر، پرآوری و ریشه‌زایی شاخساره‌های حاصل از کشت درون شیشه‌ای تحت تأثیر عوامل زیادی از جمله: گونه، ژنوتیپ، محیط کشت، نمک‌های معدنی، مواد آلی، کربوهیدرات‌ها، تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی و شرایط محیطی قرار می‌گیرد که از این بین، نقش نسبت اکسین به سیتوکینین از همه مهم‌تر است (۲۴). انتخاب ریزنمونه به همراه انتخاب تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی مناسب، تاثیر چشم‌گیری بر القای کالوس و همچنین باززایی نوساقه‌ها دارد (۳۳).

باززایی به شکل‌های متفاوت از قبیل باززایی مستقیم، باززایی غیرمستقیم و جنین‌زایی سوماتیکی قابل مشاهده است که برای این منظور بایستی تیمارهای مختلف شیمیایی برای مدت زمان مناسب استفاده گردد. در روش باززایی مستقیم شاخساره‌های فراوانی از بافت ریزنمونه بدون واسطه (کالوس) تولید می‌شود ولی در باززایی غیرمستقیم شاخه‌زایی با واسطه کالوس صورت می‌گیرد (۸).

بر اساس منابع علمی قابل دسترس، گزارش‌های کمی در مورد القای کالوس و باززایی در گیاه گالگا وجود دارند (۳۰، ۴۳). در یک مطالعه ناشینک و نمکوف (۴۳) محیط کشت مناسب برای کالوس‌زایی این گیاه را محیط کشت B5 حاوی ۲-۱ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D در ریزنمونه‌های ریشه و هیپوکوتیل و نوک ساقه اعلام کردند در حالی که ریزنمونه‌های برگ، کوتیلدون و دمبرگ پاسخ مناسبی به کالوس‌زایی نداشتند. از سوی دیگر باززایی کالوس‌ها هم به تعداد خیلی کم (در حدود ۵٪) و فقط از ریزنمونه‌های نوک ساقه در محیط کشت B5 حاوی ۲-۱ میلی‌گرم در لیتر BA، ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر NAA، ۳٪ ساکارز و ۰/۰۲٪ کاس‌اسیدآمینه‌ها به‌دست آمد. از سوی دیگر، کاراقاش و همکاران (۳۰) نیز در باززایی مستقیم بیشترین تعداد شاخساره را از ریزنمونه‌های گره در محیط MS حاوی ترکیبات NAA:BA با نسبت ۰/۲۵:۱ و بزرگترین کالوس سبز و متراکم (با قطر ۲ سانتی‌متر) را با استفاده از کشت ریشه در محیط MS حاوی نسبت NAA:BA ۲:۲ گزارش کردند (۳۰). بنابراین با توجه به مطالعات محدود در مورد کشت بافت گیاه گالگا در شرایط درون شیشه، این پژوهش با هدف ارزیابی اثر نوع و غلظت‌های مختلف تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی بر کالوس‌زایی و باززایی ریزنمونه‌های مختلف این گیاه دارویی برای استفاده در مطالعات بیوتکنولوژیکی آن انجام گرفت.

مواد و روش‌ها

تحقیق حاضر تابستان و پاییز سال ۱۳۹۸ در آزمایشگاه بیوتکنولوژی گروه تولید و ژنتیک گیاهی دانشگاه محقق اردبیلی اجرا شد. بذور گیاه گالگا از شرکت تکنوبذر تهیه شد. به‌منظور شکستن خواب بذر، بذور به‌مدت نیم ساعت با اسید سولفوریک ۹۸ درصد تیمار شدند، سپس ضدعفونی سطحی بذور در زیر هود لامینار انجام شد، بدین‌صورت که بذور به‌مدت یک دقیقه در اتانول ۷۰ درصد و به‌مدت ۱۰ دقیقه در هیپوکلریت سدیم ۲/۵ درصد غوطه‌ور شدند. سپس ۴ الی ۵ بار و هر بار به‌مدت یک دقیقه با آب مقطر استریل شستشو شدند. بذور ضدعفونی‌شده، به‌منظور جوانه‌زنی در آب آگار کشت شده (۳۰) و در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد در شرایط تاریکی قرار گرفتند. پس از گذشت ۵ روز، بذور جوانه‌زده به محیط کشت MS (حاوی ۳۰ گرم در لیتر ساکارز و ۸ گرم در لیتر آگار، pH=۵/۸) منتقل شده و در اتاقک رشد با دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و دوره نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی نگهداری شدند. برای تهیه ریزنمونه جهت القای کالوس و باززایی مستقیم، از گیاهچه‌های سه هفته‌ای استفاده شد.

القای کالوس

به‌منظور القای کالوس، ریزنمونه‌های برگ، ریشه، هیپوکوتیل و ساقه گره‌دار گیاه *G. officinalis* روی محیط

کشت MS حاوی چهار سطح 2,4-D (۰/۵، ۱، ۳ و ۵ میلی‌گرم در لیتر) به‌عنوان اکسین به‌تنهایی یا همراه با غلظت‌های مختلف سیتوکینین (BAP یا Kin) کشت شدند (جدول ۱). برای هر تیمار سه تکرار در نظر گرفته و در هر تکرار تعداد ۷ ریزنمونه کشت شد. سپس ریزنمونه‌ها در اتاقک رشد با دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و در تاریکی نگهداری شدند. ۴۵ روز پس از کشت، صفات درصد القای کالوس و وزن تر کالوس مورد اندازه‌گیری قرار گرفت. به این ترتیب که در هر تکرار تعداد ریزنمونه‌هایی که به کالوس تبدیل شده بودند بر تعداد کل ریزنمونه‌های کشت‌شده تقسیم و در ۱۰۰ ضرب شد (۵۲). برای اندازه‌گیری وزن تر کالوس نیز کالوس‌های به‌دست‌آمده از هر تیمار با استفاده از ترازو (۰/۰۰۱ گرم AND مدل GF200) وزن و بر تعداد کل کالوس‌های به‌دست‌آمده از آن تیمار تقسیم شد.

باززایی مستقیم

جهت القای باززایی مستقیم، ریزنمونه‌های برگ، کوتیلدون و ساقه گره‌دار حاصل از گیاهان سه هفته‌ای جدا شده و در محیط کشت MS حاوی غلظت‌های ۰/۱، ۰/۵ و ۱ میلی‌گرم در لیتر NAA همراه با غلظت‌های ۰/۲۵، ۰/۵، ۱ و ۲ میلی‌گرم در لیتر از سیتوکینین‌های BAP یا Kin (به‌صورت مجزا) کشت شدند. برای هر تیمار سه تکرار در نظر گرفته شده و در هر تکرار حداقل تعداد ۵ ریزنمونه کشت شد. پس از سه هفته، صفات درصد باززایی، تعداد و طول نوساقه در هر ریزنمونه اندازه‌گیری شد. برای محاسبه صفت درصد باززایی، در هر تکرار تعداد ریزنمونه‌هایی که به شاخساره تبدیل شده بودند بر تعداد کل ریزنمونه‌های کشت‌شده تقسیم و در ۱۰۰ ضرب شد (۵۲). جهت ریشه‌دار کردن نوساقه‌های تولیدشده، ساقه‌هایی که رشد مناسبی داشتند به محیط حاوی اکسین منتقل شدند. به این منظور محیط کشت MS حاوی تنظیم‌کننده‌های NAA یا IAA به‌صورت جداگانه و هر یک در غلظت‌های ۰/۲۵، ۰/۵، ۱ و ۲ میلی‌گرم در لیتر در سه تکرار مورد استفاده قرار گرفته و مقایسه شدند (در هر تکرار تعداد ۴ گیاهچه کشت شد). سه هفته پس از کشت، صفات درصد ریشه‌زایی، میانگین تعداد و طول ریشه در هر گیاهچه اندازه‌گیری شد. برای محاسبه صفت درصد ریشه‌زایی، تعداد ریزنمونه‌هایی که ریشه داده بودند به تعداد کل ریزنمونه‌های کشت‌شده در هر تکرار تقسیم و در ۱۰۰ ضرب شد (۵۲). همچنین برای اندازه‌گیری صفات طول نوساقه و طول ریشه از خط‌کش استاندارد استفاده شده و میانگین آنها در هر ریزنمونه یادداشت شد. گیاهان ریشه‌دار شده پس از سازگارسازی به گلدان منتقل شدند (شکل ۶، C، D، E).

لازم به ذکر است که در آزمایش دیگری به‌منظور القای باززایی غیرمستقیم، کالوس‌های به‌دست‌آمده در آزمایش القای کالوس در محیط کشت حاوی غلظت‌های مختلف تنظیم‌کننده‌های رشد فوق‌الذکر کشت شده و در اتاقک رشد در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و دوره نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی قرار داده شدند. اما، باززایی در این محیط‌ها مشاهده نشد.

تجزیه‌های آماری

تجزیه داده‌های حاصل از آزمایش القای کالوس با ۲۸ ترکیب تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی و چهار نوع ریزنمونه به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار انجام گردید. تجزیه و تحلیل داده‌های حاصل از آزمایشات باززایی و ریشه‌زایی نیز به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی صورت گرفت. مقایسات میانگین نیز به‌ترتیب با استفاده از آزمون LSD و چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ۵ درصد با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۹ انجام شد.

جدول ۱- ترکیبات تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی مورد استفاده در محیط کشت MS برای القای کالوس

Table 1. Plant growth regulator combinations used in MS medium for callus induction

ردیف	2,4-D (mg/l)	BAP (mg/l)	Kin (mg/l)	ردیف	2,4-D (mg/l)	BAP (mg/l)	Kin (mg/l)
۱	۰/۵	۰	۰	۱۵	۵	۱	۰
۲	۱	۰	۰	۱۶	۵	۳	۰
۳	۳	۰	۰	۱۷	۰/۵	۰	۰/۵
۴	۵	۰	۰	۱۸	۰/۵	۰	۱
۵	۰/۵	۰/۵	۰	۱۹	۰/۵	۰	۳
۶	۰/۵	۱	۰	۲۰	۱	۰	۰/۵
۷	۰/۵	۳	۰	۲۱	۱	۰	۱
۸	۱	۰/۵	۰	۲۲	۱	۰	۳
۹	۱	۱	۰	۲۳	۳	۰	۰/۵
۱۰	۱	۳	۰	۲۴	۳	۰	۱
۱۱	۳	۰/۵	۰	۲۵	۳	۰	۳
۱۲	۳	۱	۰	۲۶	۵	۰	۰/۵
۱۳	۳	۳	۰	۲۷	۵	۰	۱
۱۴	۵	۰/۵	۰	۲۸	۵	۰	۳

نتایج و بحث

در این تحقیق جهت خراش‌دادن سطح و شکستن خواب بذور گیاه گالگا از اسید سولفوریک ۹۸ درصد استفاده شد که به‌طور مؤثری منجر به غلبه بر خواب فیزیکی بذر شد. همانند سایر لگوم‌ها، بذرهای گالگا به‌دلیل وجود لایه‌های ضدآب در پوسته بذر خود، خواب فیزیکی دارند (۲۰). این سلول‌ها می‌توانند از هم جدا شوند و اجازه ورود آب برای رفع دورمانسی را فراهم کنند. این فرآیند در دانه‌هایی که زخمی

می‌شوند و یا نفوذپذیری طبیعی به‌دست می‌آورند، رخ می‌دهد (۴۱). در تحقیقی نشان داده شد که بدون خراش‌دهی سطح بذر، جوانه‌زنی بذر در این گیاه حدود ۸ درصد است اما پس از تیمار بذور با اسید سولفوریک غلیظ به‌مدت ۶۰ دقیقه به ۱۰۰ درصد افزایش یافت. اسید سولفوریک نفوذناپذیری پوشش بذر را رفع می‌کند (۴۴)، و بنابراین اجازه جذب آب و جوانه‌زنی را می‌دهد. همچنین درصد بسیار پایینی از بذور ضدعفونی‌شده پس از انتقال مستقیم به محیط کشت MS، جوانه‌زنی داشتند اما با کشت آنها در آب آگار تقریباً تمامی بذور جوانه زدند که پس از جوانه‌زنی به محیط کشت MS انتقال یافتند.

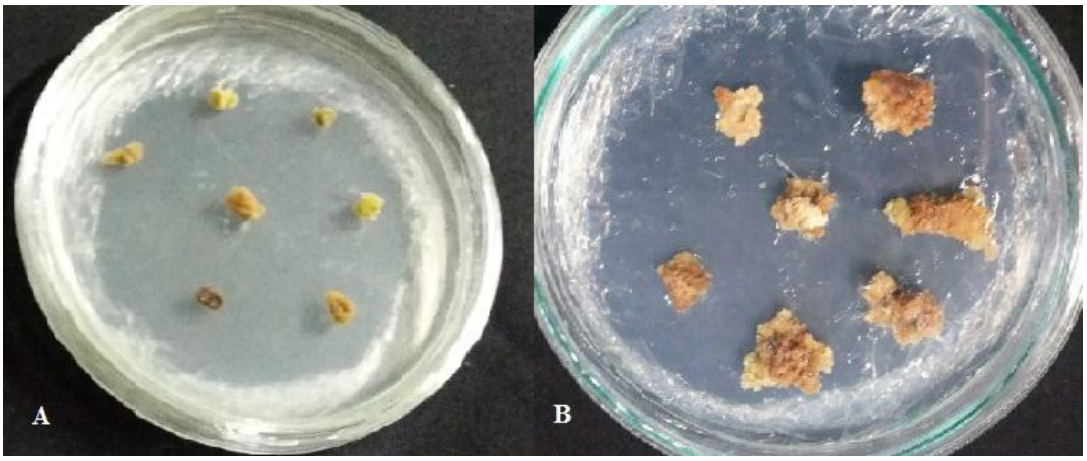
القای کالوس

القای کالوس در ریزنمونه‌های مختلف، یک هفته پس از کشت شروع شد ولی سرعت رشد آن در محیط‌های مختلف متفاوت بود (شکل ۱، A و B). مطابق جدول تجزیه واریانس (جدول ۲)، هم از نظر القای کالوس و هم از نظر وزن تر کالوس بین ریزنمونه‌های مختلف و نیز بین ترکیبات تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی مختلف، اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۱ درصد وجود داشت. اثر متقابل بین ریزنمونه و ترکیبات تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی نیز از نظر هر دو صفت اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۱ درصد نشان داد. برش اثر متقابل در هر یک از سطوح ریزنمونه نیز نشان داد که بین ترکیبات تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی در داخل هر یک از ریزنمونه‌های برگ، ریشه، هیپوکوتیل و گره اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۱ درصد وجود دارد. از سوی دیگر، تفکیک اثر ترکیبات تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی به اثر غلظت اکسین (2,4-D)، اثر نوع و غلظت سیتوکینین (BAP یا KIN) و اثر متقابل اکسین × سیتوکینین نشان داد که بین غلظت‌های مختلف 2,4-D، بین ترکیبات مختلف هورمون‌های سیتوکینینی و نیز اثر متقابل آنها اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۱ درصد وجود دارد. اثر متقابل ریزنمونه نیز با هر یک از اجزای ترکیبات هورمونی معنی‌دار به‌دست آمد (جدول ۲). بر این اساس مقایسه بین ترکیبات هورمونی در هر یک از ریزنمونه‌ها انجام گرفت که نتایج آن در شکل ۲ آمده است.

نتایج مقایسه میانگین ترکیبات تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی (شکل ۲) نشان داد که 2,4-D در ترکیب با Kin در بیشتر غلظت‌های استفاده‌شده منجر به القای ۱۰۰ درصدی کالوس در ریزنمونه‌های ریشه، هیپوکوتیل و گره شد، اما میزان القای کالوس در ریزنمونه برگ کمتر و بسته به غلظت متفاوت بود. نتایج نشان داد که کشت ریزنمونه‌های مختلف در محیط کشت MS حاوی غلظت‌های مختلف 2,4-D به‌تنهایی منجر به القای قابل ملاحظه کالوس در این گیاه نشد. اما، استفاده از سیتوکینین به ویژه Kin در ترکیب با 2,4-D به القای کالوس انجامید. این امر نشان می‌دهد که وجود اکسین به‌تنهایی نمی‌تواند باعث کالوس‌زایی در ریزنمونه‌های مختلف گیاه گالگا شود و برای این منظور ترکیب مناسبی از تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی از نوع اکسین و سیتوکینین مورد نیاز است.

از لحاظ وزن تر کالوس اختلاف معنی‌داری بین محیط‌های کشت حاوی ترکیبات هورمونی مختلف، در سطح احتمال یک درصد وجود داشت (جدول ۲ و شکل ۳). مقایسه میانگین نشان داد که وزن تر کالوس ریزنمونه‌های گره و برگ در محیط کشت MS حاوی ۵ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر Kin بیشترین مقدار (به‌ترتیب با میانگین ۱۴۵۰ و ۱۰۹۰ میلی‌گرم) بود. این امر نشان می‌دهد که محیط کشت حاوی ترکیب فوق نه‌تنها باعث القاء مطلوب کالوس در گالگا می‌شود بلکه در رشد مطلوب کالوس هم محیط کشت مناسب برای این ریزنمونه‌ها محسوب می‌شود (شکل ۲). در مورد ریزنمونه هیپوکوتیل و ریشه بهترین محیط کشت برای رشد کالوس (به‌ترتیب با میانگین ۱۴۱۶ و ۱۲۲۰ میلی‌گرم)، محیط کشت MS حاوی 2,4-D و Kin هر کدام به‌میزان ۱ میلی‌گرم در لیتر بود.

القای کالوس در شرایط آزمایشگاهی به عوامل مختلفی از قبیل شرایط رشد، سطح تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی (اکسین، سیتوکینین)، نوع ریزنمونه و شرایط محیط بستگی دارد (۴۳،۱۱). با وجود این، ژنوتیپ گیاهان مهمترین عامل در القای کالوس است (۶). افزودن اکسین به محیط کشت می‌تواند به القای کالوس و رشد سلول کمک کند در حالی که سیتوکینین‌ها برای القای باززایی و تقسیم سلولی مورد استفاده قرار می‌گیرند (۵۵،۲۱). با وجود این، غلظت‌های کم سیتوکینین در ترکیب با اکسین القای کالوس را افزایش می‌دهد (۶۰،۴۵). پالئی و همکاران (۴۶) گزارش کردند که اکسین در ترکیب با سیتوکینین در مقایسه با اکسین به‌تنهایی در القاء کالوس توت‌فرنگی مؤثرتر است. همچنین آنها گزارش کردند که محیط MS حاوی ۲ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D به‌همراه ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر BAP بالاترین درصد القای کالوس و بالاترین وزن تر کالوس را در برداشت. ال‌علیم و همکاران (۱۷) نیز گزارش کردند که ترکیب 2,4-D و سیتوکینین در تسهیل القای کالوس در سیب‌زمینی مؤثر است. در این تحقیق نیز کشت ریزنمونه‌های مختلف در محیط کشت MS حاوی غلظت‌های مختلف 2,4-D به‌تنهایی منجر به القای کالوس نشد اما استفاده از سیتوکینین به‌ویژه Kin در ترکیب با 2,4-D القای کالوس را تحریک کرد. سرعت رشد کالوس نیز تحت تأثیر ژنوتیپ و نوع هورمون مورد استفاده قرار دارد (۴۲). در تحقیق حاضر بالاترین غلظت مورد استفاده از 2,4-D یعنی غلظت ۵ میلی‌گرم در لیتر در ترکیب با پایین‌ترین غلظت سیتوکینین یعنی ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر Kin منجر به بیشترین میزان رشد کالوس با میانگین ۱۴۵۰ میلی‌گرم شد.



شکل ۱- کالوس‌های حاصل از کشت گره ساقه در محیط کشت MS حاوی: (A) ۳ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP و (B) ۵ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D و ۰/۵میلی‌گرم در لیتر Kin

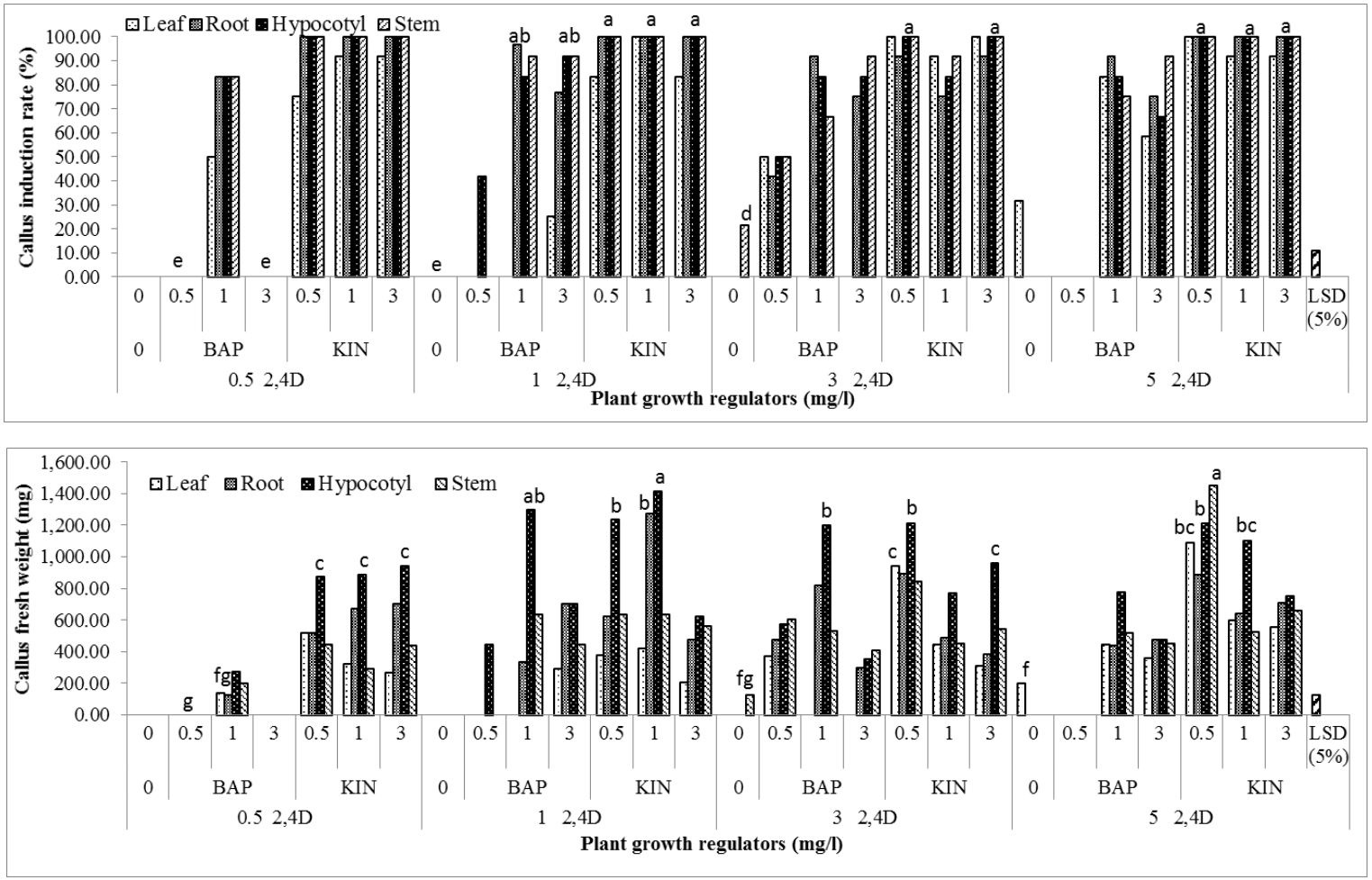
Figure 1. Calli obtained from stem nodes on MS medium containing: (A) 3 mg/l 2,4-D and 0.5 mg/l BAP, and (B) 5 mg/l 2,4-D and 0.5 mg/l Kin

جدول ۲- تجزیه واریانس اثر ترکیبات مختلف تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی و ریزنمونه‌های مختلف بر القای کالوس و وزن تر کالوس گالگا

Table 2. Analysis of variance of the different combinations of plant growth regulators and different explants effects on callus induction and callus fresh weight of *G. officinalis*

منبع تغییر	درجه آزادی	درصد القای کالوس	وزن تر کالوس
ریزنمونه (E)	۳	۵۶۱۳/۷۹۰**	۲۰۸۳۶۵۳/۴۷۹**
ترکیبات تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی	۲۷	۱۸۱۲۰/۶۰۲**	۱۲۹۳۹۰۰/۴۲۸**
اکسین (A)	۳	۷۵۷۵/۰۹۹**	۱۲۰۹۱۷۲/۸۴۳**
سیتوکینین (C)	۶	۵۹۶۸۳/۳۳۳**	۳۹۵۰۷۵۹/۷۴۹**
A × C	۱۸	۶۰۲۳/۹۴۲**	۴۲۲۴۰۱/۹۱۸**
ریزنمونه × ترکیبات تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی	۸۱	۱۲۴۳/۴۷۱**	۱۱۸۸۳۰/۹۶۹**
E × A	۹	۱۸۴۳/۶۱۸**	۲۱۷۹۰۴/۳۲۶**
E × C	۱۸	۱۹۷۹/۲۹۹**	۲۰۸۶۳۶/۶۲۷**
E × A × C	۵۴	۸۹۸/۱۷۰**	۷۲۳۸۳/۵۲۳**
خطا	۲۲۴	۱۵۳/۶۴۶	۱۳۳۷۳/۸۹۶
ضریب تغییرات (٪)		۱۹/۱۳	۲۲/۵۶

**: نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار در سطح احتمال ۱٪



شکل ۲- مقایسه میانگین درصد کالوس‌زایی (نمودار بالا) و وزن تر کالوس (نمودار پایین) هر یک از ریزنمونه‌های برگ، ریشه، هیپوکوتیل و ساقه گره‌دار گالگا در محیط کشت MS حاوی ترکیبات متفاوت از تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی به روش LSD در سطح احتمال ۵ درصد

Figure 2. Mean comparison of callogenesis percentage (upper graph) and callus fresh weight (lower graph) of leaf, root, hypocotyl, and nodal stem explants of *G. officinalis* in MS medium containing different combinations of plant growth regulators using LSD method at the 5% probability level

باززایی مستقیم

در باززایی مستقیم از میان ریزنمونه‌های برگ، ساقه گره‌دار و کوتیلدون مورد آزمایش، تنها ریزنمونه‌های ساقه گره‌دار در کمتر از یک هفته پس از کشت، شروع به باززایی کرد (شکل ۳). بر اساس نتایج تجزیه واریانس، در ریزنمونه مذکور اثر ترکیبات مختلف تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی بر صفات درصد باززایی، تعداد و طول شاخساره‌های باززا شده در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بود (جدول ۴). طبق جدول ۳ اثر غلظت اکسین و سیتوکینین بر صفات مورد مطالعه معنی‌دار بود، اما اثرات متقابل این دو بر درصد باززایی و تعداد شاخساره معنی‌دار ولی در مورد طول شاخساره معنی‌دار نبود. از لحاظ نوع سیتوکینین مورد استفاده نیز بین BAP و Kin از لحاظ درصد باززایی و طول شاخساره‌های باززا شده اختلاف معنی‌دار ولی از لحاظ تعداد شاخساره غیرمعنی‌دار به‌دست آمد. اثرات متقابل سه جانبه (غلظت اکسین × نوع سیتوکینین × غلظت سیتوکینین) از لحاظ تعداد و طول شاخساره‌های باززا شده معنی‌دار ولی بر درصد باززایی معنی‌دار نبود. بر این اساس مقایسات میانگین بین ترکیبات تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی انجام شد که نتایج آن در شکل ۴ نشان داده شده است.

وضعیت سلول از نظر مرحلهٔ تقسیم سلولی، توانایی انتقال یا قابلیت دسترسی به تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی و توانایی متابولیکی سلول، از عوامل اصلی تنوع در قابلیت باززایی ریزنمونه‌ها هستند. ریزنمونه‌های حاوی انتهاهای مریستمی نظیر جوانه‌های انتهایی ساقه و ریشه و همچنین جوانه‌های جانبی از پتانسیل باززایی بالایی برخوردارند. چنین بافت‌هایی قدرت تقسیم بالایی دارند و با تولید و تجمع تنظیم‌کننده‌های رشد مورد نیاز، قابلیت باززایی بالایی نشان می‌دهند و تحت شرایط درون شیشه‌ای موجب القای شاخساره‌های نابجا می‌شوند (۲۶،۲۷).

افزودن تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی به محیط کشت می‌تواند باعث تغییر در سنتز آنزیم‌ها شود (۲۲) که به‌نوبه خود منجر به تغییر غلظت هورمون‌های داخلی و تشکیل نوساقه می‌شود (۴۲). این می‌تواند نشان دهد که سطح هورمون‌های درون‌زا یا واکنش‌پذیری آنها ممکن است در بین اعضای گیاه متفاوت باشد (۵۹). سیتوکینین‌ها به‌عنوان تقویت‌کننده‌های تقسیم سلولی، تمایز، تشکیل و طویل‌شدن شاخساره شناخته شده‌اند (۲۳). نتایج آزمایشات مختلف نشان داده است که در بسیاری از ژنوتیپ‌ها، سیتوکینین در غلظت مناسب برای تکثیر شاخساره مورد نیاز می‌باشد، اما حضور غلظت‌های پایین اکسین نیز در کنار سیتوکینین، نرخ تکثیر شاخساره را افزایش می‌دهد (۵۱). BAP با شکستن غالبیت انتهایی، موجب شکستن خواب جوانه‌های جانبی و القای شاخساره می‌شود (۲۴). گزارش شده که BAP یکی از مؤثرترین سیتوکینین‌ها برای تکثیر جوانه‌های جانبی هم در گونه‌های علفی و هم در گونه‌های درختی خانواده لگوم است (۵۶).

بر این اساس به‌منظور دست‌یافتن به بهترین ترکیب و بهترین غلظت هورمونی در تحقیق حاضر از محیط کشت MS حاوی سیتوکینین‌های BAP و Kin در ترکیب با اکسینِ NAA برای القای شاخساره در ریزنمونه گره استفاده شد. همان‌طور که از شکل ۴ استنباط می‌شود، در یک سطح ثابت از سیتوکینین (هم BAP و هم Kin) با افزایش غلظت NAA القای شاخساره، تعداد و طول شاخساره کاهش یافت. در مورد القای شاخساره کاربرد پایین‌ترین غلظت BAP و Kin منجر به بیشترین درصد القای شاخساره با میانگین ۹۳/۳۳ درصد شد به‌طوری که غلظت ۰/۲۵:۰/۱ از هر دو ترکیب BAP:NAA و Kin:NAA منجر به بیشترین میزان باززایی با میانگین ۹۳/۳۳ درصد شد (شکل ۴، بالا). ترکیب ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر از NAA و ۲ میلی‌گرم در لیتر از BAP در القای بیشترین تعداد شاخساره با میانگین ۲/۸۶ شاخساره در هر ریزنمونه موفق‌تر بود (شکل ۴، وسط). همچنین بیشترین طول شاخساره (۵/۶ سانتی‌متر) مربوط به شاخساره‌های باززا شده از گره‌های کشت شده در محیط حاوی ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر NAA و ۲ میلی‌گرم در لیتر BAP، و کمترین آن (۰/۹۳۳ سانتی‌متر) در محیط حاوی ۱ میلی‌گرم در لیتر NAA و ۰/۲۵ میلی‌گرم در لیتر به دست آمد (شکل ۴، پایین و شکل ۵-A). نکته جالب توجه این است که به‌وضوح طول شاخساره‌ها با صفت تعداد شاخساره القا شده رابطه معکوس داشت. به گونه‌ای که در ریزنمونه‌هایی که تعداد بیشتری شاخساره القا شده بود طول شاخساره کمتر بود. هر چند این صفت (طول شاخساره) به‌شدت تحت تأثیر ترکیب تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی مورد استفاده نیز بود. این نتایج از نظر ترکیب هورمونی مناسب برای القای حداکثر تعداد شاخساره همسو با نتایج کاراقاش و همکاران (۳۰) است بر اساس نتایج آنها بیشترین تعداد ساقه (۰/۱۲ ± ۱/۱۲ ساقه در هر ریزنمونه) از ریزنمونه‌های گره در محیط MS حاوی ترکیبات NAA:BA با نسبت ۰/۲۵:۱ به‌دست آمد.

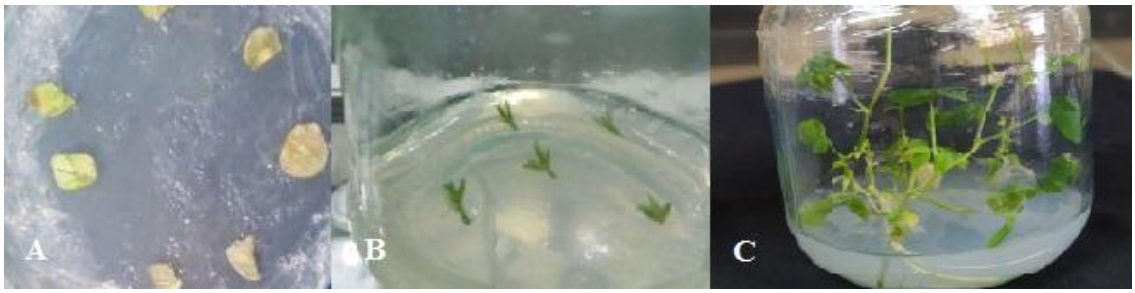
ونکاتاچالام و همکاران (۵۶) گزارش کردند که کاربرد BAP با غلظت ۲/۲۲ میکرومول بر لیتر منجر به حداکثر القای شاخساره در جوانه‌های گیاه *Prosopis cineraria* شد. همچنین براساس نتایج آنها، بیشترین تعداد القای شاخساره مربوط به گره‌های کشت‌شده در محیط کشت حاوی ۲/۲۲ میکرومول در لیتر BAP به‌همراه ۰/۴۶ میکرومول در لیتر Kin با میانگین ۳/۵ شاخساره در هر ریزنمونه بود. همچنین بر اساس نتایج جنگجو و همکاران (۲۷)، بیشترین تعداد القای جوانه در ریزنمونه گره، مربوط به گره‌های کشت شده در محیط کشت حاوی ۸/۸ میکرومولار BAP مشاهده شد. همچنین براساس نتایج به‌دست‌آمده از تحقیق عبداله‌پور و همکاران (۱)، محیط کشت حاوی ۰/۱ میلی‌گرم لیتر بنزیل آدنین (BA) برای تکثیر شاخساره از ریزنمونه‌های نوک ساقه *H. perforatum* مؤثر بود.

جدول ۳- تجزیه واریانس اثر ترکیبات تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی بر صفات درصد باززایی، تعداد و طول شاخساره باززا شده در هر ریزنمونه *G. officinalis*

Table 3. Analysis of variance of the effect of different combinations of plant growth regulators on regeneration percentage, number and length of regenerated shoots in each *G. officinalis* explants

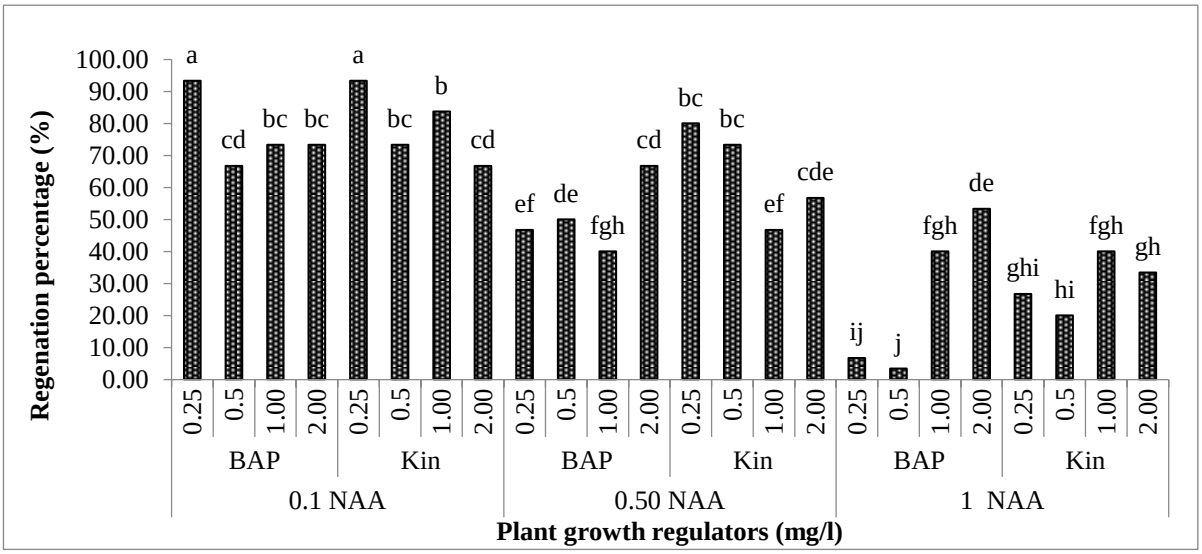
منبع تغییر	درجه آزادی	میانگین مربعات		
		درصد باززایی	تعداد شاخساره	طول شاخساره
ترکیبات تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی	۲۳	۱۸۸۳/۸۱۶**	۱/۰۳۵**	۵/۱۵۳**
غلظت اکسین (A)	۲	۱۵۴۰۴/۱۶۷**	۲/۹۳۱**	۲۳۸۴/۳۱۶**
نوع سیتوکینین (B)	۱	۸۶۸/۰۵۶*	۰/۰۲۹^{ns}	۲۵۸/۷۸۱**
غلظت سیتوکینین (C)	۳	۴۲۳/۶۱۱*	۱/۱۷۴**	۱۵۲۸/۷۰۷**
A × B	۲	۱۸۴/۷۲۲^{ns}	۰/۰۶۸^{ns}	۴۳۱/۲۶۰**
A × C	۶	۱۱۹۸/۶۱۱**	۱/۴۲۷**	۳۰/۴۶۴^{ns}
B × C	۳	۸۳۸/۴۲۶**	۲/۲۸۱**	۱۱۶/۵۲۲*
A × B × C	۶	۱۶۰/۶۴۸^{ns}	۰/۳۴۶*	۱۲۹/۱۶۸**
خطا	۴۸	۱۵۰/۰۲۰	۰/۱۳۶	۳۰/۲۱۹
ضریب تغییرات (٪)		۲۲/۴۳	۲۴/۴۷	۱۶/۰۶

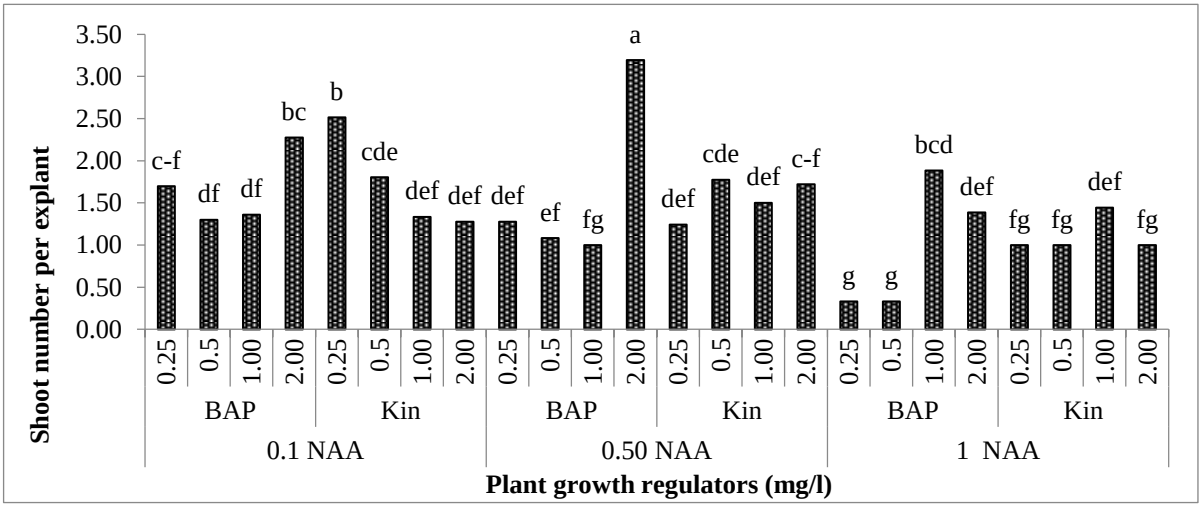
ns: غیرمعنی‌دار و *، **: تفاوت معنی‌دار به‌ترتیب در سطح احتمال ۵٪ و ۱٪

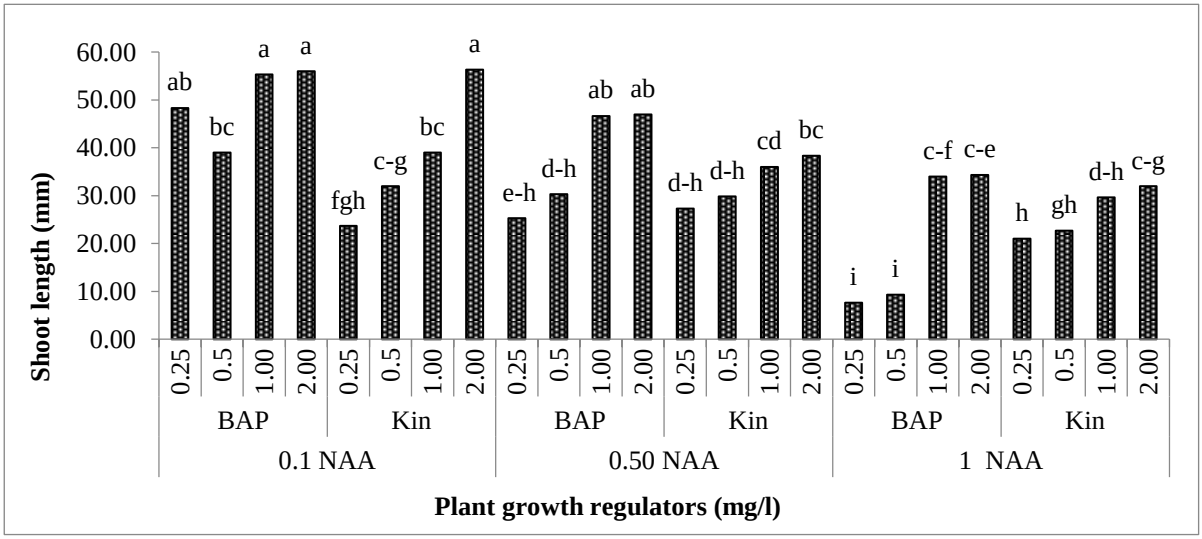


شکل ۳- ریزنمونه‌های برگ (A) و ساقه گره‌دار (B) کشت‌شده در محیط کشت باززایی، (C) گیاهان باززا شده از گره‌های کشت‌شده در محیط کشت حاوی ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر NAA و ۲ میلی‌گرم در لیتر BAP

Figure 3. Explants from leaf (A) and stem nods (B) grown in regeneration medium, Regenerated plants (C) from nodes grown in medium containing 0.1 mg/l NAA and 2 mg/l BAP







شکل ۴- نمودار تغییرات درصد باززایی (بالا)، تعداد (وسط) و طول شاخساره (پایین) باززا شده از ریزنمونه گره ساقه گالگا در محیط کشت MS حاوی سطوح مختلف NAA و BAP یا Kin. حروف غیرمشابه نشان‌دهندهٔ اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۵ % در آزمون دانکن است.

Figure 4. Diagram of changes in direct regeneration percentage (upper graph), number (middle) and length (lower) of shoots regenerated from *G. officinalis* stem nodes in MS medium containing different concentrations of NAA and BAP or Kin. The dissimilar letters indicate a significant difference at the 5% probability level using the Duncan test.

ریشه‌زایی

بر اساس نتایج تجزیه واریانس، بین غلظت‌های مختلف NAA و IAA از نظر درصد القای ریشه، میانگین تعداد و طول ریشه در هر ریزنمونه اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۱ درصد وجود داشت (جدول ۴). نتایج مقایسات میانگین (شکل ۶) نشان داد که ۰/۲۵ و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر از اکسین‌های NAA و IAA منجر به بیشترین درصد ریشه‌زایی با میانگین حدود ۹۰ درصد شدند. بیشترین تعداد ریشه القا شده با میانگین حدود ۴ ریشه در هر گیاهچه مربوط به غلظت ۰/۲۵ میلی‌گرم در لیتر NAA و نیز غلظت‌های ۰/۲۵ و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر IAA بود. بیشترین طول ریشه با میانگین حدود ۶/۵ سانتی‌متر نیز در غلظت ۰/۲۵ IAA مشاهده شد (شکل ۶). القای ریشه در شاخه‌های در حال رشد چه پس از حذف سیتوکینین از محیط کشت و چه به کمک تنظیم‌کننده‌های رشد مصنوعی بستگی به گونه و رقم دارد. از طرفی توانایی تولید ریشه به برهمکنش فاکتورهای بیرونی و درونی وابسته است. اغلب پژوهشگران موفق به ریشه‌دار کردن شاخه‌های پرآوری شده کشت بافتی در محیط‌های حاوی غلظت‌های کم IBA، NAA و IAA شده‌اند (۴،۷،۴۰،۵۰). در مطالعه‌ای روی گونه *Eriocephalus africanus* بیشترین تعداد و طول ریشه در هر شاخه در غلظت‌های پایین‌تر IBA به‌دست آمد (۳۸). گزارش شده است که NAA بهترین اکسین برای ریشه‌دار کردن شاخساره‌های باززا شده درون‌شیشه‌ای است (۵۳،۴۹). همان طور که در شکل ۶ نشان داده شده است، با افزایش غلظت اکسین‌های مورد استفاده درصد القا، تعداد و طول ریشه کاهش یافت. به‌طوری که در غلظت ۲ میلی‌گرم در لیتر NAA القای ریشه مشاهده نشد. در این تحقیق بر خلاف گزارش‌های قبلی (۳۰)، غلظت پایین NAA در القای ریشه در شاخساره‌های کشت‌شده در محیط MS مؤثر بود. قابل ذکر است که در تحقیق ما، از بین ریشه‌های القا شده در هر شاخه طول یکی از ریشه‌ها بسیار بلند و گاهی به ۱۵ سانتی‌متر می‌رسید و طول سایر ریشه‌ها متوسط یا کوتاه بود (شکل ۵، B). گیاهان ریشه‌دار شده پس از سازگار سازی به گلدان انتقال یافتند (شکل ۵، D،C و E).

در کل، هدف از تحقیق حاضر تهیه پروتکل کارآمد برای کالوس‌زایی و باززایی این گونه مهم دارویی جهت پاسخگویی به نیاز آینده بود. در مورد کالوس‌زایی در این گیاه مشخص شد که استفاده از 2,4-D به‌عنوان اکسین و Kin به‌عنوان سیتوکینین در محیط کشت MS منجر به تولید کالوس در ریزنمونه‌های برگ، ریشه، هیپوکوتیل و ساقه گره‌دار شده و بیشترین رشد کالوس (میانگین ۱۴۵۰ میلی‌گرم وزن تر) در ترکیب ۵ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر Kin در ریزنمونه ساقه گره‌دار حاصل شد. به‌منظور باززایی مستقیم هم کشت ریزنمونه‌های برگ، کوتیلدون و ساقه گره‌دار در محیط کشت MS حاوی غلظت‌های مختلف از BAP و Kin در ترکیب با NAA صورت گرفت که تنها ریزنمونه ساقه گره‌دار باززا شد و از بین ترکیبات تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی مورد استفاده، غلظت‌های کم NAA و BAP از نظر درصد القای شاخساره، مؤثرتر بودند. به‌طوری که بیشترین میزان باززایی مربوط به ترکیب ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر NAA و ۰/۲۵ میلی‌گرم در لیتر از BAP و یا Kin با میانگین ۹۳/۳۳ درصد بود. اما، غلظت‌های بالاتر منجر به چند شاخساره‌زایی شدند، به‌طوری که غلظت ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA در ترکیب با ۲ میلی‌گرم در لیتر BAP منجر به القای ۲/۸۶ شاخساره در هر ریزنمونه شد. به‌همین ترتیب، در القای ریشه از شاخساره‌های به‌دست‌آمده، غلظت‌های کم اکسین مؤثرتر بودند به‌طوری که در غلظت‌های بالاتر از ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA و IAA تشکیل ریشه بسیار اندک بود. همچنین در مورد صفات تعداد و طول ریشه‌های القایی از هر ریزنمونه نیز غلظت‌های پایین NAA و IAA یعنی غلظت ۰/۲۵ و ۰/۵ موفق‌تر بودند. اما القای باززایی غیرمستقیم از طریق کالوس با استفاده از ترکیبات مورد استفاده موفقیت‌آمیز نبود و نیاز است با استفاده از سطوح مختلف تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی دیگر از جمله TDZ به‌عنوان سیتوکینین مورد بررسی قرار گیرد.

تشکر و قدردانی

این تحقیق با حمایت مالی معاونت پژوهشی دانشگاه محقق اردبیلی انجام شده است که بدین‌وسیله قدردانی می‌شود.

جدول ۴- تجزیه واریانس اثر غلظت‌های مختلف NAA و IAA بر ریشه‌زایی، تعداد و میانگین طول ریشه در هر گیاهچه از گالگا

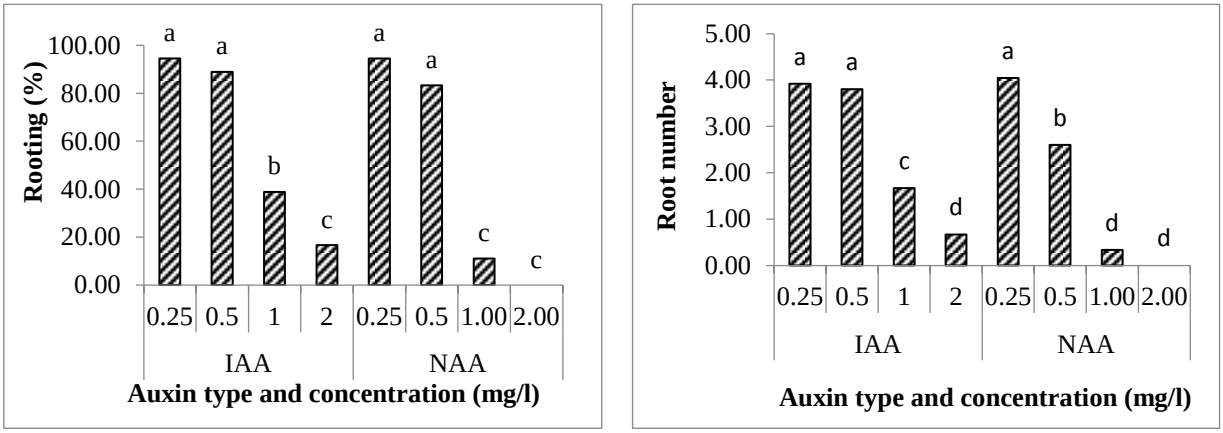
Table 4. Analysis of variance of the effect of different concentrations of NAA and IAA on rooting, number and average root length in each plantlet of *G. officinalis*

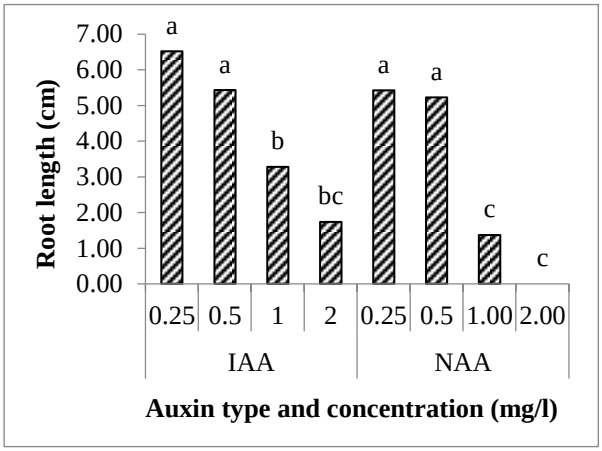
منبع تغییر	درجه آزادی	میانگین مربعات		
		درصد ریشه‌زایی	تعداد ریشه	طول ریشه
ترکیبات تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی	۷	۵۰۲۴/۷۴۴**	۸/۵۷۰**	۱۶/۸۴۹**
نوع اکسین (A)	۱	۹۳۷/۳۷۵*	۳/۵۵۰**	۹/۱۶۴**
غلظت اکسین (B)	۳	۱۱۱۸۴/۳۶۰**	۱۸/۱۵۷**	۳۵/۳۶۹**
A × B	۳	۲۲۷/۵۸۵^{ns}	۰/۶۵۵*	۰/۸۹۱**
خطا	۱۶	۱۶۲/۰۵۳	۰/۱۹۳	۱/۰۳۶
ضریب تغییرات (٪)		۲۳/۸۰	۲۰/۶۳	۲۲/۱۱

ns: غیرمعنی‌دار و *، **: تفاوت معنی‌دار به‌ترتیب در سطح احتمال ۵٪ و ۱٪

شکل ۵- (A) طول شاخساره به‌دست‌آمده از کشت در محیط MS حاوی ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر NAA و ۲ میلی‌گرم در لیتر Kin و (B) طول ریشه به‌دست‌آمده از کشت در محیط کشت MS حاوی ۰/۲۵ میلی‌گرم در لیتر IAA، (C، D و E) سازگارسازی گیاهان باززا شده

Figure 5. (A) Shoot length of plants obtained from MS medium containing 0.1 mg/l NAA and 2 mg/l Kin, and (B) Root length of plants obtained from MS medium containing 0.25 mg/l IAA, (C, D, E) acclimatization of regenerated plants





شکل ۶- مقایسه میانگین تأثیر غلظت‌های مختلف NAA و IAA بر ریشه‌زایی، تعداد و طول ریشه در گالگا

Figure 6. Mean comparison of different concentrations of NAA and IAA on rooting, number and root length in *G. officinalis*

منابع

1. Abdollahpoor, M., S. Kalantari, M. Azizi and Y.A. Saadat. 2017. *In vitro* shoot proliferation of *Hypericum perforatum* L. through indirect and direct plant regeneration. Journal of Medicinal Plants and By-Product, 6(1): 81-89.
2. Agyare, C., V. Spiegler, A. Asase, M. Scholz, G. Hempel and A. Hensel. 2018. An ethnopharmacological survey of medicinal plants traditionally used for cancer treatment in the Ashanti region, Ghana. Journal of Ethnopharmacology, 212: 137-152.
3. Amoo, S.O., A.O. Aremu and J. Van Staden. 2012. *In vitro* plant regeneration, secondary metabolite production and antioxidant activity of micropropagated *Aloe arborescens* Mill. Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC), 111(3): 345-358.
4. Asadi, A., C. Vedadi, M. Rahimi and B. Naserian. 2009. Effect of plant growth hormones on root and shoot regeneration in Rose (Morrasia) under invitro conditions. Bioscience Research, 6(1): 40-45.
5. Atanasov, A. 2016. Anti-platelet fraction isolated from *Galega officinalis*. Acta Medica Bulgarica, 43(2): 5-10.
6. Awan, M.F., M.S. Iqbal, M.N. Sharif, B. Tabassum, M. Tariq and K.N. Soumendra. 2019. Evaluation of genotypic and hormone mediated callus induction and regeneration in sugarcane (*Saccharum officinarum* L.). International Journal of Botany Studies, 4(6): 70-76.
7. Azadi, P., M. Khosh-Khui, E. Beyramizadeh and H. Bagheri. 2007. Optimization of factors affecting *in vitro* proliferation and rooting of *Rosa hybrida* L. cv.'Rafaela.' International Journal of Agricultural Research, 2(7): 626-631.
8. Bagheri, A. and M. Safari. 2009. Fundamentals of plant tissue culture. Mashhad Ferdowsi University Press, 406 pp (In Persian).
9. Bagherniya, M., V. Nobili, C.N. Blesso and A. Sahebkar. 2018. Medicinal plants and bioactive natural compounds in the treatment of non-alcoholic fatty liver disease: A clinical review. Pharmacological Research, 130: 213-240.
10. Bailey, C. and C. Day. 2004. Metformin: Its botanical background. Practical Diabetes International, 21: 115-117.
11. Baravardi, H., G.A. Ranjbar and F.A. Kamali. 2015. Comparison of amount of callus induction in *Juniperus Excelsa* on MS and WPM culture media using different concentration of NAA, 2, 4-D and Kin. Journal of Crop Breeding, 7(16):149-157 (In persian).
12. Behera, S., S. K. Kar, K.K. Rout, D.P. Barik, P.C. Panda, K.N. Soumendra. 2019. Assessment of genetic and biochemical fidelity of field-established *Hedychium coronarium* J. Koenig regenerated from axenic cotyledonary node on meta-topolin supplemented medium. Industrial Crops and Products, 134: 206-215.
13. Chan, M., J. Zhao, P. Brown and I.A. Khan. 2010. Phytochemical study of *Galega officinalis*. Planta Medica, 76(05): 62.
14. Chen, S.L., H. Yu., H.M. Luo, Q. Wu, C.F. Li and A. Steinmetz. 2016. Conservation and sustainable use of medicinal plants: problems, progress, and prospects. Chinese Medicine, 11: 37.
15. Chevallier, A. 1998. The Encyclopedia of Medicinal Plants. DK Publishing Inc.
16. Custers, J.B.M. and E.C. Verstappen. 1989. Improvement of *in vitro* growth of cucumber. Report of Cucurbit Genetics Cooperative, (12): 20-22.
17. Elaleem, K.G.A., R.S. Modawi and M.M. Khalafalla. 2009. Effect of plant growth regulators on callus induction and plant regeneration in tuber segment culture of potato (*Solanum tuberosum* L.) cultivar Diamant. African Journal of Biotechnology, 8(11): 2529-2534.
18. Evans, J.O. 1984. Goatsrue eradication- A realistic goal. Utah State Science. 45:9-11.
19. Evans, J., C. Dalley and M. Larson. 1997. Prospects and challenges for goats rue eradication. Western Society of Weed Science, 50: 25-26.
20. Finch- Savage, W.E. and G. Leubner-Metzger. 2006. Seed dormancy and the control of germination. New Phytologist, 171(3): 501-523.
21. Gamborg, O.L., T. Murashige, T.A. Thorpe and I.K. Vasil. 1976. Plant tissue culture media. *In Vitro*, 12(7): 473-478.
22. Gaspar, T.H., C. Kevers, O. Faivre-Rampant, M. Crèvecoeur, C.L. Penel, H. Greppin and J. Dommes. 2003. Changing concepts in plant hormone action. *In Vitro* Cellular and Developmental Biology-Plant, 39(2): 85.
23. Gentile, A., M.J. Gutiérrez, J. Martinez, A. Frattarelli, P. Nota and E. Caboni. 2014. Effect of meta-topolin on micropropagation and adventitious shoot regeneration in *Prunus* rootstocks. Plant Cell. Tissue and Organ Culture (PCTOC), 118(3): 373-381.
24. George, E.F., M.A. Hall and G.J.D. Klerk. 2008. Plant Growth Regulators I: Introduction; Auxins, their Analogues and Inhibitors. In: George, E. F., M. A. Hall and G. J. D. Klerk. (eds) Plant Propagation by Tissue Culture. Springer, Dordrecht.
25. González-Andrés, F., P.A. Redondo, R. Pescador and B. Urbano. 2004. Management of *Galega officinalis* L. and preliminary results on its potential for milk production improvement in sheep. New Zealand Journal of Agricultural Research, 47(2): 233-245.

26. Idowu, P.E., D.O. Ibitoye and O.T. Ademoyegun. 2009. Tissue culture as a plant production technique for horticultural crops. African Journal of Biotechnology, 8(16): 3782-3788.
27. Jangjou, Kh., A. Hassani, B. Hosseini and M. Jafari. 2014. Effect of explant type and different compounds PGRs on direct regeneration of Lemongrass (*Melissa officinalis* L.). Iranian Journal of Horticultural Science, 45(4): 391-399 (In Persian).
28. Jesmin, R. and M.A.K. Mian. 2016. Callus induction and efficient plant regeneration in Cucumber (*Cucumis sativus* L.). Journal of Bioscience and Agriculture Research, 9: 796-803.
29. Jeyakumar, J.J. and M. Kamaraj. 2015. Direct organogenesis of hypocotyl explants from *In vitro* seedlings of *Cucumis Anguria* L. Global Journal of Biology Agriculture and Health Science, 4: 24-27.
30. Karakaş, F.P., G. CinGoz and A. Turker. 2016. Enhancement of direct shoot regeneration and determination of bioactive secondary metabolites in leaves of *Galega officinalis* L. Turkish Journal of Biology, 40(6): 1311-1319.
31. Karakas, F.P., A. Turker, A. Karakas and V. Mshvildadze. 2016. Cytotoxic, anti-inflammatory and antioxidant activities of four different extracts of *Galega officinalis* L. (Goat's rue). Tropical Journal of Pharmaceutical Research, 15(4): 751-757.
32. Karakaş, F.P., A. Yildirim and A. Turker. 2012. Biological screening of various medicinal plant extracts for antibacterial and antitumor activities. Turkish Journal of Biology, 36: 641-652.
33. Khawar, K.M., E.O. Sarhin, C.S. Sevimay, S. Cocu, I. Parmaksiz, S. Uranbey, A. Ipeck, S. Ozcan and M.D. Kaya. 2005. Adventitious shoot regeneration and micropropagation of *Plantago lanceolata* L. Biologia plantarum, 48(3): 449-451.
34. Klugh, K. 1998. Goatsure, *Galega officinalis*, in Pennsylvania. Regulatory Horticulture, 24(2): 25-28.
35. Lasseigne, A. 2003. Invasive Plants of the Eastern United States: *Galega* sp. Noxious Weeds of the Federal Noxious Weed Act, (26).
36. Le Bail, J.C., Y. Champavier., A.J. Chulia and G. Habrioux. 2000. Effects of phytoestrogens on aromatase, 3β and 17β-hydroxysteroid dehydrogenase activities and human breast cancer cells. Life Sciences, 66(14): 1281-1291.
37. Luka, C. and B. Omoniva. 2012. Effect of some phytochemicals extracted from goat's rue (*Galega officinalis*) on some biochemical parameters in normal and alloxan-induced diabetic rats. Journal of Natural Product and Plant Resources, 2(5): 628-632.
38. Madzikane-Mlungwana, O., M. Moyo, A.O. Aremu, L. Plíhalová, K. Doležal, J. Van Staden and J.F. Finnie. 2017. Differential responses to isoprenoid, N 6-substituted aromatic cytokinins and indole-3-butyric acid in direct plant regeneration of *Eriocephalus africanus*. Plant Growth Regulation, 82(1): 103-110.
39. Maqbool, Q., A. Sidorowicz, M. Nazar, N. Jabeen, S. Anwaar and I. Ahmad. 2019. Organometallic cerium oxide nanostructures acted as nanofertilizer during callogenesis and organogenesis of recalcitrant plant *Berberis lycium* Royle. Materials Today Communications, 20: 100544.
40. Masoumiasl A., A. Aryiaeineghad and M. Dehdeari. 2015. Assessment of direct regeneration in germany (*Matricaria chamomilla* L.) and shirazi ghamomiles (*Matricaria recutita* L.). Journal of Horticulture Science, 29(4): 601-609.
41. Murray, D.R. 1984. Seed Physiology: Germination and Reserve Mobilization. Academic Press.
42. Nasri, F., H. Zakizadeh, Y. Vafaee and A.A. Mozafar. 2018. Callus induction and plant regeneration of *Chrysanthemum morifolium* and *C. coccineum* via direct and indirect organogenesis and genetic fidelity analysis using IRAP, ISSR and SCoT molecular markers. Journal of Ornamental Plants, 8(4): 265-284.
43. Našinec, V. and B. Němcová. 1990. Goat's Rue (*Galega officinalis* L.). In: Bajaj, Y.P.S. (ed) Legumes and Oilseed Crops I. Biotechnology in Agriculture and Forestry, Springer, Berlin, Heidelberg, 10.
44. Oldham, M. and C.V. Ransom. 2009. Goats rue (*Galega officinalis*) seed biology. Weed Science, 57(2): 149-154.
45. Olyaei, Z., R. Asghari Zakaria, N. Zare and D. Berenji. 2020. Effect of different plant growth regulators on callus induction and regeneration of *Papaver fugax* poir. Journal of Crop Breeding, 12(33): 192-201 (In Persisn).
46. Palei, S., G.R. Rout, A.K. Das and D.K. Dash. 2017. Callus induction and indirect regeneration of strawberry (*Fragaria Ananassa*) Duch. CV. Chandler. International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences, 6(11): 1311-1318.
47. Patterson, D.T. 1992. Effect of temperature and photoperiod on growth and reproductive development of goats, rue. Journal of Range Management, 45(5): 449-453.
48. Peiretti, P.G. and F. Gai. 2006. Chemical composition, nutritive value, fatty acid and amino acid contents of *Galega officinalis* L. during its growth stage and in regrowth. Animal Feed Science and Technology, 130(3-4): 257-267.

49. Rani, A., M. Kumar and S. Kumar. 2014. Effect of growth regulators on micropropagation of *Rauvolfia serpentina* L. Benth. Journal of Applied and Natural Science, 6(2): 507-511.
50. Rout, G.R., A. Mohapatra and S.M. Jain. 2006. Tissue culture of ornamental pot plant: A critical review on present scenario and future prospects. Biotechnology Advances, 24(6): 531-560.
51. Sharma, R.K., A.K. Wakhlu and M. Boleria. 2004. Micropropagation of *Anethum graveolens* L. through axillary shoot proliferation. Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology, 13(2): 157-159.
52. Sheikhi, M., L. Fahmideh, F. Benakashani and M. Solouki. 2020. Investigation of the direct regeneration of *Capparis spinosa* L. in MS medium containing different hormones. Journal of Crop Breeding, 12(34): 54-61.
53. Susila, T., G.S. Reddy and D. Jyothsna. 2013. Standardization of protocol for *in vitro* propagation of an endangered medicinal plant *Rauwolfia serpentina* Benth. Journal of Medicinal Plants Research, 7(29): 2150-2153.
54. Thorpe, T.A. 2007. History of plant tissue culture. Molecular Biotechnology, 37(2): 169-180.
55. Turrea, K.C. 1989. Tissue Culture Media, Composition and Preparation in Tissue Culture Techniques for Horticulture Crops. van Nostard. Remhold, New York.
56. Venkatachalam, P., U. Jinu, M. Gomathi, D. Mahendran, N. Ahmad, N. Geeta and S.V. Sahi. 2017. Role of silver nitrate in plant regeneration from cotyledonary nodal segment explants of *Prosopis cineraria* L. Druce: A recalcitrant medicinal leguminous tree. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology, 12: 286-291.
57. Whitson, T., L. Burrill, S. Dewey, D. Cudney and B. Nelson. 2000. Weeds of the West. University of Wyoming College of Agriculture.
58. Yang, Y. 2011. Metformin for cancer prevention. Frontiers of Medicine, 5(2): 115-117.
59. Zia, M., Z.F. Rizvi, R. Rehman and M.F. Chaudhary. 2010. Micropropagation of two Pakistani soybean (*Glycine max* L.) cultivars from cotyledon nodes. Spanish Journal of Agricultural Research, 8(2): 448-453.
60. Zinhari, Z., S.H. Pourseyedi and J. Zolala. 2016. Callus induction and direct shoot regeneration in *Lepidium draba* L. explants. Journal of Agricultural Biotechnology, 8(2): 31-51 (In Persisn).

The Effect of Different Combinations of Plant Growth Regulators in MS medium on Callus Induction and Direct Regeneration of *Galega officinalis*

Rasool Asghari Zakaria[1], Maryam Khezri[2], Nasser Zare[3] and Samira Minaei Minabad[4]

1- Professor, Faculty of Agriculture and Natural Resources, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, Iran, (Corresponding author: r-asghari@uma.ac.ir)
2- PhD Student of Agricultural Biotechnology, University of Mohaghegh Ardabili
3- Associate Professor, Faculty of Agriculture and Natural Resources, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, Iran
4- Graduated M.Sc. Student of Agricultural Biotechnology, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, Iran
Received: October 2, 2020 Accepted: March 10, 2021

Abstract

This study aimed to evaluate the effect of different types and concentrations of plant growth regulators in MS medium on callus formation and regeneration of different explants of medicinal plant *Galega officinali*s. To callus induction, leaf, root, hypocotyl, and stem nodes explants were cultured on MS medium containing different concentrations of 2,4-D (0.5, 1, 3, and 5 mg/l) in combination with BAP (0, 0.5, 1 and 3 mg/l) or Kin (0, 0.5, 1, and 3 mg/l). It was observed that 2,4-D in combination with Kin was very effective and in most of the used concentrations, it resulted in 100% callus induction. Among them the 5:0.5 mg/l concentration of 2,4-D:Kin in the nodal stem explant showed the highest callus growth with an average of 1450 mg fresh callus weight. In order to direct regeneration, leaf, cotyledon, and stem nodes were cultured in MS medium containing different concentrations of BAP and Kin in combination with NAA, while regeneration was observed only in the stem nodes. The highest regeneration rate was related to 0.25:0.1 mg/l in both BAP: NAA and Kin:NAA with an average of 93.33%. The highest amount of induced shoots (with an average of 2.86 shoots in each explant) and the highest shoot length (5.6 cm) were observed at 2:0.5 and 2:0.1 mg/l of BAP:NAA, respectively. The shoots obtained from the regeneration experiment were transferred to MS medium containing different levels of NAA and IAA for rooting. The results of mean comparisons showed that 0.25 or 0.5 mg/l of NAA or IAA resulted in the highest percentage of rooting with an average of about 90%. The highest number of roots was related to explants cultured in 0.25 mg/l of both NAA and IAA growth regulators (with an average of 4 roots per explant) and also, the highest root length was observed in explants cultured in 0.25 mg/l of IAA (with an average of 6.5 cm). At all, in this study, the most appropriate combination of plant growth regulators and explant for callus induction and direct regeneration of *G. officinalis* was introduced, which can be useful in future biotechnological studies of this medicinal plant.

Keywords: Callus, *Galega officinalis*, *In vitro* culture, PGRs, Regeneration