تأثیر غلظت‌های مختلف هورمون‌های ۲،۴-D وBAP بر نرخ کالزایی گیاه کلپوره *Teucrium polium*

ملیحه هاشمیان[۱]، علی گنجعلی[*۲]، منیره چنیانی[۳]

[۱] دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران Ma.hashemyan@stu-mail.um.ac.ir

[۲] دانشیار، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران Ganjeali@um.ac.ir

[۳] استادیار، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران cheniany@um.ac.ir

چکیده:

کلپوره (*Teucrium polium* L.) گیاهی دارویی متعلق به خانواده نعناعیان (Lamiceae) است که خواص آنتی‌اکسیدانی و ضدسرطانی بالایی دارد. خواب بالا و تعداد کم بذر، قوه نامیه پایین و نیز این گیاه می‌باشد. همین مسئله موجب شده است که روش کشت بافت جهت تولید ترکیبات ثانوی مفید آن، کارآمد گردد. در پژوهش پیش‌رو، کالوس‌زایی ریزنمونه برگ این گیاه، به‌صورت آزمایش فاکتوریل و در قالب طرح آماری کاملاً تصادفی و در سه تکرار انجام و اثر سطوح مختلف هورمون ۲و۴-D (۱/۵ mg/L، ۱، ۰/۵، ۰) به صورت جداگانه و در برهم‌کنش با غلظت‌های مختلف هورمون BAP (۲ mg/L، ۱/۵، ۱، ۰/۵، ۰) بر نرخ کال‌زایی ریزنمونه حاصل از کشت درون‌شیشه‌ای مورد بررسی قرار گرفت. نتایج حاصل از مقایسه میانگین نشان داد که بهترین تیمار کالزایی، در محیط کشت MS فاقد هورمون ۲و۴-D در برهم‌کنش با غلظت‌های ۲ یا BAP ۱/۵ mg/L و کمترین درصد، مربوط به ترکیبات تیماری حاوی بالاترین غلظت‌های هورمونی به کار رفته در این پژوهش (۲و۴-D =۱/۵ mg/L و BAP =۲ mg/L) شناخته شد.

واژه‌های کلیدی: کلپوره، هورمون گیاهی، ۲،۴-D، BAP، کالوس، کالزایی.

مقدمه

گیاهان دارویی نقش به‌سزایی در سلامت جوامع بشری دارند. اهمیت دارویی این گیاهان، تولید مواد شیمیایی می‌باشد که منجر به فرایندهای فیزیولوژیکی خاص در بدن انسان می‌شود (Padulosi and Hadj-Hassan, 1998). این ترکیبات که متابولیت‌های ثانوی نیز نامیده می‌شوند، برخلاف متابولیت‌های اولیه، مستقیماً در رشد و نمو و تولیدمثل موجودات زنده نقشی ندارند و فقدان آن‌ها منجر به مرگ فوری گیاه نمی‌شود اما در دراز مدت می‌توان‌د اختلال‌اتی در بقاء، باروری و یا ظاهر گیاه ایجاد کند (Wyk BEV, Wink M.,2004). فرآورده‌های حاصل از متابولیسم ثانوی گیاه‌ان، از گران‌بهاترین ترکیبات شیمیایی‌سازی می‌باشند. شناسایی و بررسی این ترکیبات شیمیایی، نه‌تنها به درمان آسان‌تر و ارزان‌تر بیماری‌ها کمک می‌کن‌د، بلکه از خروج بخشی از سرمایه کشورها که بایستی صرف وارد ساختن این‌گونه کالاها یا فرآورده‌های آن‌ها شود، جلوگیری می‌نمایند (Oksman-Caldentey KM.,2004). متابولیت‌های ثانوی دارویی از جمله آلکالوئید، گلیکوزید، فلاونویید، روغن‌های ولاتیل، تانن‌ها، رزین‌ها و ... امروزه از گیاهان وحشی و یا زراعی استخراج می‌شوند (Rao, Ravishankar, 2002). آثارگسترده‌ای ، به‌عنواندر نقشفوایددرزمینه‌ی با ارزشاین با استفاده از روش‌های شیمیایی،علت‌ای که دارند. به همین دلیلمقرون به صرفه، به‌کارگیری روش‌های زیست‌فناوری کشت سلول و بافت گیاهی در تولید این ترکیبات، می‌تواند به‌عنوان یک روش جایگزین مدنظر قرار گیرد (Rao SR, Ravishankar GA., 2002).

در کشت درون‌شیشه،ای برای برای‌افزایش تولید متابولیت‌های ثانوی از روش‌های م‌تعددی استفاده می‌شود که شامل استفاده از الیسیتورها، بهینه‌سازی محیط کشت با استفاده از تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی، کشت ریشه‌های موئین و مهندسی متابولیت می‌باشد (Rao SR, Ravishankar GA.,2002).

کلپوره (هلپه) *Teucrium polium* L گیاه‌ی گل‌دار علفی وحشی، چندساله (پایا) متعلق به خانواده نعناعیان (Lamiaceae) است که تیرماهشهریورماه،مواد آلی (کوچکی و همکاران، ۱۳۸۷). از از در طب سنتی ایران،*Teucrium policum* به‌عنوان داروی ضد تشنج با فعالیت‌های ضد انقباضی استفاده می‌شودو همچنین خواص ادرارآور، تعریق آور، ضدفشارخون، ضددرد و کاهنده‌چربی این گیاه به اثبات رسیده است (ندیمی و همکاران، ۱۳۹۱) (Moghtader M., 2009).

کوچکی و همکاران، ۱۳۸۷با توجه‌بر روی کشت درون شیشه‌ای گیاه کلپوره پژوهش‌های اندکی صورت گرفته است و از طرفی با توجه به اهمیت دارویی و غذایی این گیاه و استفاده بی رویه افراد محلی از این گیاه و احتمال انقراض آن، تحقیق پیش رو با تکیه بر تکنیک کشت درون‌آزمایشگاهی و به‌منظور بهینه‌سازی محیط کشت این گیاه، در جهت افزایش تولید متابولیت‌های ثانوی این گیاه صورت گرفته است.

مواد و روش‌ها

آماده‌سازی مواد گیاهی: گیاهان رشدیافته در،استان خراسان رضوی مورد استفاده قرار گرفت. با توجه به اینکه بذر این گیاه دارای خواب بوده و جوانه‌زنی آن اندک می‌باشد، از تیمار خراش و سپس هورمون جیبرلیک اسید () در سانتی‌گرادبه مدت ۶ روز، برای از بین بردن خواب بذر استفاده گردید.سپس بذرها، دارای شماره ۱ه وبرای جوانه‌زنی تاریکی و ۲۵ ± ۲°C . پس از،،جهت تولید، لوکس

۲۵°C . پس از سبز شدن اندام هوایی و افزایش طول ریشه‌چه، دانه‌رست‌ها به محتوی محلول هوگلند (Arnon and Hoagland, 1940) در با۲۵ ± ۲°Cو منتقل شدند.

عملیات کشت: از آن‌جایی‌که بر مبنای تحقیقات قبلی این گروه پژوهشی، برگ به‌عنوان بهترین نمونه کالوس‌دهنده تشخیص داده شد، لذا در این پژوهش از نمونه برگ به‌عنوان جداکشت استفاده گردید (جاویدی‌مقدم و همکاران، ۱۳۹۵).این ریزنمونه، با غلظت‌های به‌تنهایی یا در ترکیب با هورمونبا های mgبه‌صورت آزمایش فاکتوریل و در قالب طرح آماری کاملاً تصادفی و در سه تکرار . ، حاصل از کشت هیدروپونیک،(مدل JTLVC2، Jaltajhiz، ایران) و شستشوی۵ای،. ۲۵ ± ۲°C و ی روز ، درصد و سایر ویژگی‌های کالوس‌ها مورد بررسی قرار گرفت.

تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها:

اطلاعات گردآوری‌شده در این پژوهش، با استفاده از آزمون آنوای دوراهه به همراه آزمون تعقیبی دانکن و با به‌کارگیری نرم‌افزار SPSS 16 و EXCEL ۲۰۱۰ مورد تجزیه‌وتحلیل قرار گرفت.

نتایج:

نتایج حاصل از تجزیه واریانس درصد کال‌زایی ریزنمونه برگ گیاه کلپوره در سطوح مختلف هورمونی در شرایط درون‌شیشه نشان داد که درصدکالزایی این ریزنمونه‌ها، رابطه معنی‌داری (p<۰/۰۱) با غلظت‌های مختلف D-۴و۲ به‌کار رفته در این پژوهش دارند (جدول۱ و نمودار ۱). همچنین در این پژوهش، اثر غلظت‌های مختلف BAP بر درصدکال‌زایی این گیاه معنی‌دار (p<۰/۰۱) بود (جدول۱و نمودار۲). ارزیابی نرخ کال‌زایی در برهم‌کنش غلظت‌های مختلف D-۴و۲ و BAP نشان داد که این اثر نیز با سطح معناداریِ کمتر از ۰/۰۱ معنادار بود. (نمودار۳، نمودار۴ و جدول۱).

(جدول ۱)- تجزیه واریانس درصد کال‌زایی، در تیمارهای مختلف هورمون D-۴و۲ و BAP به تنهایی و در تعامل با یکدیگر حاصل از کشت درون شیشه ریز نمونه برگ گیاه کلپوره

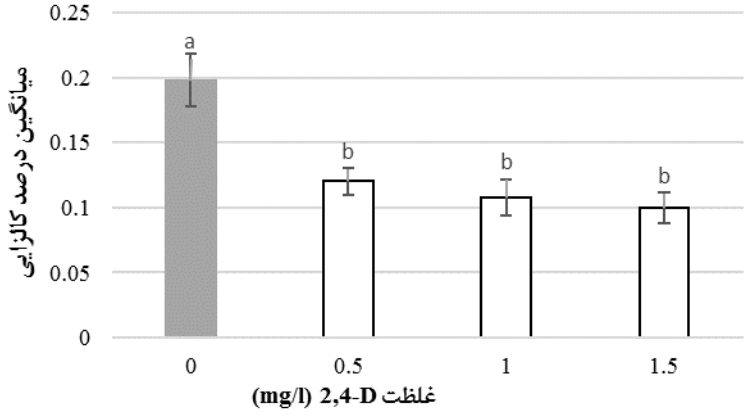
منبع تغییرات (S.O.V)	SS	درجه آزادی (Df)	میانگین مربعات (MS)	F
D-۴و۲	۰/۳۴۷	۳	۰/۱۱۶	**۱۸/۶۶۵
BAP	۰/۱۷۴	۴	۰/۰۴۴	**۷/۰۲۶

BAP × ۲و۴-D	۰/۹۴۱	۱۲	۰/۰۷۸	**۱۲/۶۳۹
خطا	۱/۱۷۹	۱۹۰	۰/۰۰۶	-
کل	۶/۱۱۳	۲۱۰		-

** p<۰/۰۱

با توجه به معنی‌دار بودن نتایج حاصل از تجزیه واریانس، برای اینکه مشخص شود درصدکال‌زایی گیاه کلپوره بر حسب کدام یک از غلظت‌های ۲و۴-D، بر حسب کدام یک از غلظت‌های BAP و تعامل کدام یک از غلظت‌های ۲و۴-D و BAP تفاوت معنی‌دار است، از آزمون تعقیبی دانکن استفاده شد؛ نمودارهای ۱ تا ۴ به بررسی این تفاوت‌ها پرداخته‌اند. بر اساس نتایج حاصله مشخص شد که درصد کال‌زایی گیاه کلپوره بین تیمار فاقد هورمون ۲و۴-D با هر یک از غلظت‌های ۰/۵ mg/L، ۱ و ۱/۵ هورمون ۲و۴-D تفاوت معنی‌دار بود ولی بین غلظت‌های ۰/۵ mg/L، ۱ و ۱/۵ این هورمون تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد (نمودار ۱).

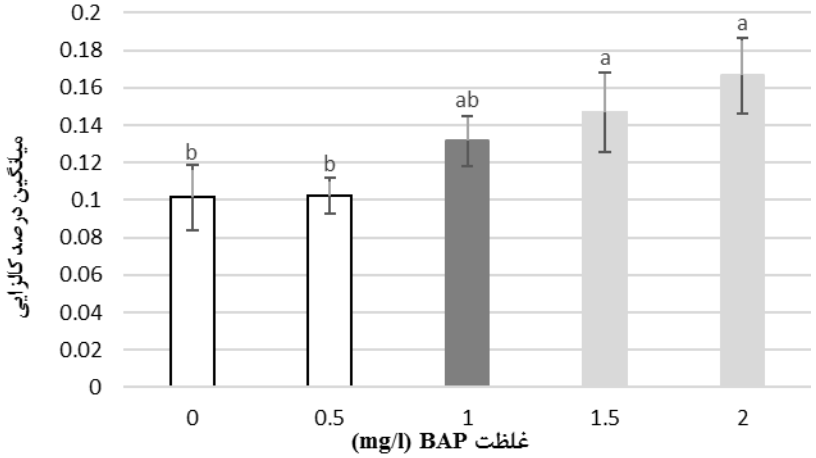
(نمودار۱) - تأثیر غلظت‌های مختلف هورمون‌های ۲و۴-D در محیط کشت MS بر درصد کازایی گیاه کلپوره.



میانگین‌های دارای حروف مشابه با یکدیگر، اختلاف معنی‌داری ندارند.

همچنین نتایج نشان داد که تفاوت معنی‌داری بین درصد کال‌زایی گیاه کلپوره با تیمار فاقد هورمونBAP و تیمار حاوی غلظت mg/L ۰/۵ با هر یک از غلظت‌هایmg/L ۱/۵و۲ این هورمون وجود دارد ولی بین غلظت‌های mg/L ۰/۵ و ۰ و نیز غلظت‌های mg/L۱/۵و۲ BAP تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد(نمودار ۲).

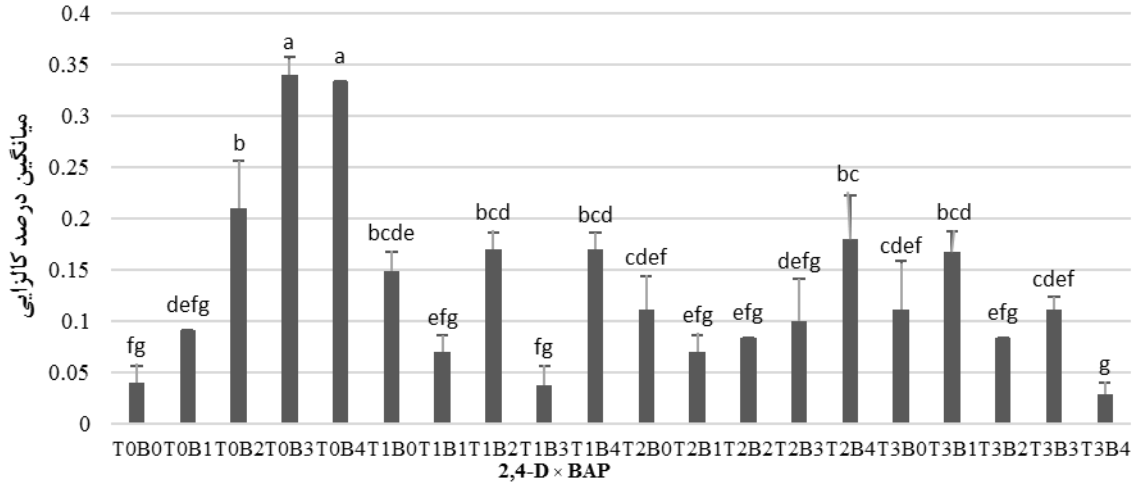
(نمودار۲)- تأثیر غلظت‌های مختلف هورمون‌های BAP در محیط کشت MS بر درصد کازایی گیاه کلپوره.



میانگین‌های دارای حروف مشابه با یکدیگر، اختلاف معنی‌داری ندارند.

همچنین در تعامل بین دو هورمون، تفاوت معنی‌داری بین ترکیبات تیماری فاقد هورمون D-۴و۲ و غلظت‌های mg/L ۲و ۱،۱/۵ BAP (T0B2وT0B3و T0B4) با سایر تیمارهای هورمونی مشاهده شد که نشان‌دهنده بالاترین نرخ کال‌زایی(٪۱۰۰و۹۹/۹) در این پژوهش بود (نمودار۳ و ۴). همچنین ترکیب تیماری حاوی غلظت ۱/۵ mg/l هورمون D-۴و۲ + ۲mg/l هورمونBAP تفاوت معنی‌داری با سایر ترکیبات تیماری داشت که نشان دهنده کمترین نرخ کالزایی بود(نمودار۳).

(نمودار۳)- اثر تعامل غلظت‌های مختلف هورمون‌های BAP و D-۴و۲ بر درصد کازایی گیاه کلپوره.

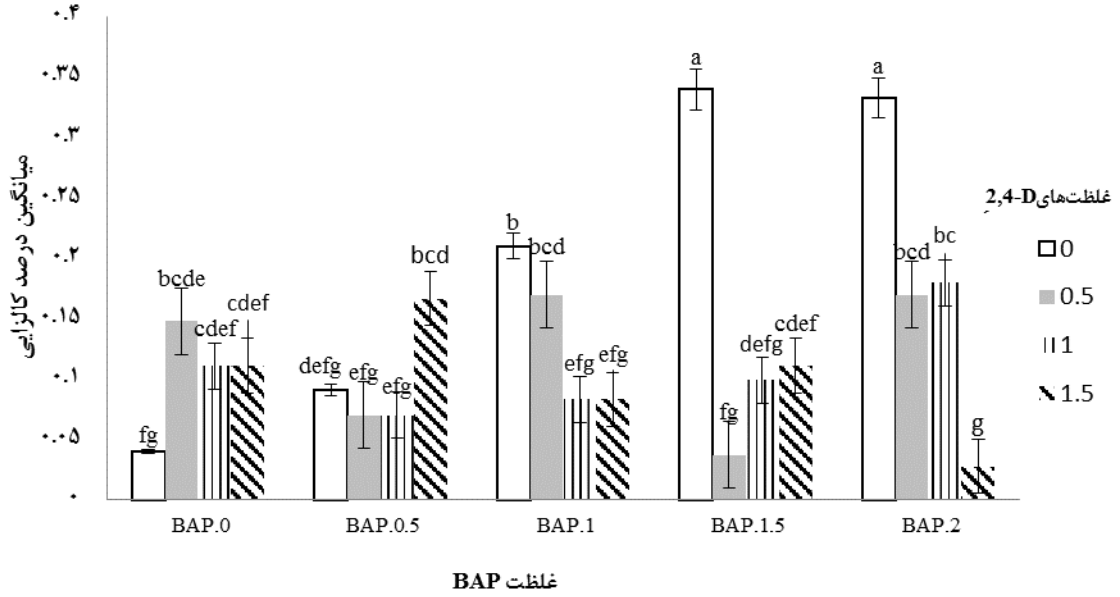


T: غلظت‌های هورمون D-۴و۲ (T0=0 , T1=0/5 , T2=1 , T3=1/5 mg/L) و

B: غلظت‌های هورمون BAP (B0=0 , B1=0/5 , B2=1 , B3=1/5 , B4=2 mg/L)

میانگین‌های دارای حروف مشابه با یکدیگر، اختلاف معنی‌داری ندارند.

(نمودار۴) - اثر تعاملی غلظت‌های مختلف هورمون BAP به تفکیک غلظت‌های مختلف هورمون D-۴و۲ بر درصد کالزایی گیاه کلپوره.



میانگین‌های دارای حروف مشابه با یکدیگر، اختلاف معنی‌داری ندارند.

بحث:

اکسین‌ها و سیتوکینین‌ها تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی هستند که برای بیشتر گونه‌ها در محیط‌های کشت مورد استفاده قرار می‌گیرند ولی غلظت بهینه آن‌ها و نسبت مقدار به‌کار برده شده برای قطعات جداکشت یک گونه و نیز از یک گونه به گونه دیگر متفاوت است. گزارش‌ها نشان داده‌اند که هورمون ۲،۴_D به عنوان یکی از اکسین‌های مهم تنظیم‌کننده رشد، برای شروع تمایز مجدد یا عدم تمایز در گیاهان مطرح می باشد (Seraj *et al*, 1997). برخی گزارش‌ها حاکی از آن است که هورمون ۲،۴_D تأثیر معنی داری در تشکیل کالوس دارد (Machii *et al*, 1998) درصورتی‌که گزارش‌هایی هم در رابطه با اثر بازدارندگی از رشد در غلظت بالای۲،۴_D موجود می‌باشد (Basu *et al*, 1997 و Anderson, Al-Khayri, 1996). در پژوهش حاضر، در ترکیب تیماری فاقد هورمون ۲،۴_D، با افزایش غلظت هورمون BAP، درصد کال‌زایی نیز افزایش یافت به‌طوری‌که غلظت‌های بالا و نسبتاً بالای بنزیل آمینوپورین(۱/۵ mg/Lو۲) به تنهایی، توانسته مؤثرترین نتایج را در کال‌زایی به همراه داشته و بیشترین درصد ریزنمونه‌های برگی تبدیل شده به کالوس، در ترکیبات تیماری حاوی این غلظت‌های هورمونی (T0B3و T0B4) مشاهده شد (نمودارهای۳و۴). همچنین ملاحظه گردید که در محیط‌های حاوی غلظت ۱/۵ mg/L و ۱، ۰/۵ هورمون۲،۴_D، رابطه معنی‌داری بین درصد کال‌زایی و افزایش غلظت BAP مشاهده نشد (نمودار۳). مطابق نتایج به‌دست‌آمده در این پژوهش، کاربرد همزمان غلظت‌های بالای این دو هورمون(BAP=۲ mg/l و ۱/۵ mg/l D-۲،۴)، در محیط کشت MS، منجر به کاهش درصد کال‌زایی گردید که با نتایج به دست آمده از پژوهش Mirshekar و همکاران (2014) مطابقت داشته و می‌تواند به دلیل این باشد که افزایش غلظت هورمونی بیشتر از میزان بهینه در محیط کشت، اثر ممانعت کننده‌ای بر هورمون‌های داخلی ریزنمونه داشته و کاهش میزان تولید کالوس را به دنبال دارد (Afshari poor, 1993 و Dixon *et al*, 1996).

نتیجه‌گیری:

کلپوره گیاهی ارزشمند از نظر دارویی و خوراکی می‌باشد که بهره‌برداری‌های بی‌رویه انسان از طرفی و دوره رشد کوتاه‌مدت آن، از طرف دیگر، خطر انقراض و درنتیجه کاهش دسترسی به ترکیبات دارویی ارزشمند آن را محتمل ساخته است. بدیهی است برای حفظ و تکثیر این گیاه دارویی و افزایش تولید متابولیت‌های ثانوی آن با استفاده از روش‌های غیر سنتی، ارائه تمهیدات و راه‌کارهای مناسب ضروری به نظر می‌رسد. با توجه به نتایج این پژوهش، کاربرد همزمان اکسین و سیتوکینین در غلظت‌های بالا(BAP=۲ mg/l و ۲،۴-D ۱/۵ mg/l)، کمترین تأثیر را در القای کالوس به دنبال داشت و بهترین تیمار کال‌زایی در محیط کشت MS فاقد هورمون D-۴و۲ و غلظت‌های بالای BAP (۲ mg/L و ۱/۵) مشاهده گردید. با توجه به این نتایج، برای افزایش تعداد کالوس‌های حاصل از ریزنمونه برگ در جهت تولید ترکیبات ثانوی این گیاه، استفاده از تیمارهای هورمونی ذکرشده پیشنهاد می‌گردد.

منابع:

۱- جاویدی‌مقدم، مرجان، چنیانی، منیره، گنجعلی، علی، لاهوتی، مهرداد، (۱۳۹۵)؛ «بررسی کالوس‌زایی و توان آنتی‌اکسیدانی عصاره متانولی حاصل از ریزنمونه‌های مختلف گیاه *Teucrium Polium*»، زیست‌شناسی گیاهی ایران، سال هشتم، ۲۹، ۳۷-۵۲.

۲- سلطانی پول، م.م، محمدی، ع، رهنما، ح و عباس زاده، ب، (۱۳۹۰)؛ «بررسی کالزایی در گیاه دارویی بادرنجبویه *Melissa officinalis* L»، زراعت و اصلاح نباتات ۷، (۱)، ۴۵-۵۴.

۳- کوچکی، علیرضا و همکاران، (۱۳۸۷)؛ «بررسی نیازهای اکولوژیک گیاه کلپوره *Teucrium polium*، مجله پژوهش‌های زراعی ایران، جلد۶، شماره۲.

۴- ندیمی، مریم، ضیاء، محمدعلی، مدنی، محبوبه، (۱۳۹۱)؛ «تأثیر عصاره آبی و اتانولی کلپوره بر کاندیدا آلبکنس و دو گونه مالاسزیا»، مجله تحقیقات علوم پزشکی زاهدان.

5- Afshari poor, S, (1993); «Basics of plant tissue culture», Research Department of Medical Science University of Esfahan, 351 pp.

6- Anderson, E, J, and J, M, Al-Khayri, (1996); «Effect of genotype and media components on callus induction and regeneration of rice», Reserch Series Arkansas Agriculture Expriment Station, 4(53), 222-227.

7- Arnon, D, Hogland, D, (1940); «Crop prpduction in artificial culture solutions and in soils with spesical reference to factors influencing yields and absorption of inorganic nutrients», Journal of Soli Science, 50, 463-485.

8- Basu, S, G, Gangopadhayay, B, Baran and S, Gupta, (1997); «Plant regeneration of salt adapted callus of indica rice (var. Basmati 370) in saline conditions», Plant Cell Tiss, Org, Cult, 1(50), 153-159.

9- Box, G.E.P, (1945); «The exploration and exploitation of response surfaces: some general considerations and examples», Biometrics, 10, 16-60.

10- Dixon, R,N, and R,A, Gonzales, (1996); «Plant cell culture: A Practical Approach», Oxford University Press, 362 pp.

11- Golluce M, Sahin F, Sokmen M, Ozer H, Daferera D, Sokmen A, Polissiou M, Adiguzel A, Ozken H, (2007); «Antimicrobial and antioxidant properties of the essential oils and methanol extract from *Mentha longifolia* L ssp, longifolia», Food Chem, 103, 1449-1456.

12- Kumar, O,A, Tata, S,S, and Rupavati, T, (2002); «In vitro induction of callusogenesis in chili peppers (*Capsicum annuum* L.)», International Journal of Current Reseaech, 3, 42-44.

13- Machii, H, H, Mizuno, T, Hrabayashi, H, Li and T, Hagio, (1998); «Screening wheatgenotypes for high callus induction and regeneration capability from anther and immature embryo culture», Plant Cell, Tiss, Org, Cult, 5(3), 67-74.
14- Mirshekar, A, Honarvar, M, Mohammadi, F and Alizadeh, A, (2014); «Optimization of tissue culture of *Thymus daenensis* Celak», American-Eurasian Journal Agricultural and Environmental Science, 14(9), 949-953.
15- Moghtader, M, (2009); «Chemical Composition of the Essential Oil of *Teucrium polium* L.From Iran, American-Eurasian», Sci, 5(6), 843-846.
16- Oksman-Caldentey KM, Inzé D, (2004); «Plant cell factories in the post-genomic era: new ways to produce designer secondary metabolites», Trends Plant Sci, 9(9), 433-440.
17- Padulosi,S., and Hadj-Hassan,A, (1998); «Towards a comprehensive documentation of distribution and use of Pistacia», genetic diversity in Central and West Asia, North Africa and Mediterranean Europe., Report of the IPGRI Workshop.
18- Raghavendra H, Vijayananda B, Madhumathi G, Hiremath A,(2010); «In vitro antioxidant activity of *Vitex negundo* L. Leaf extracts», Chiang Mai J Sci, 37(3), 489-497.
19- Rao RS, Ravishankar GA (2002); «Plant tissue cultures; chemical factories of secondary metabolites», Biotechnology Advances 20,101-153.
20- Seraj, Z I, A, Islam, M,O, Faruque, T, Devi and S, Ahmad, (1997); «Identification of the regeneration potential of embryo derived calli from various indica rice varieties», Plant Cell, Tiss, Org, Cult, 4(8), 9-13.
21- Toivonen, L, (1993); «Utilization of hairy root culture for production of secondary metabolites», Biotechnology Progress, 9, 12-29.
22- Wyk BEV, Wink M, (2004); Medicinal plants of the world. Pretoria, Briza.