

## کالوسزایی و باززایی درونشیشهای گیاه همیشه بهار (*Calendula officinalis* L.)

لیلا کوهی<sup>۱</sup>، پریسا دریانی<sup>۲</sup>، ناصر زارع<sup>۳</sup>

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد اصلاح نباتات، دانشگاه محقق اردبیلی، [koohileila@gmail.com](mailto:koohileila@gmail.com)

۲- دانشجوی کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی، دانشگاه محقق اردبیلی

۳- عضو هیات علمی دانشگاه محقق اردبیلی

### چکیده:

موفقیت در بسیاری از تکنیکهای گزینش در شرایط درونشیشهای و اعمال فنون دستورزی ژنتیکی در گیاهان عالی، به وجود یک سیستم باززایی موفق گیاهان در کشت بافت بستگی دارد. در این مطالعه تاثیر تنظیمکننده رشد گیاهی NAA در ترکیب با کیتین و BAP بر القاء کالوس و باززایی ریزنمونهای برگ همیشه بهار به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی مورد مطالعه قرار گرفت. ریزنمونهای برگ در تمامی ترکیبات هورمونی به غیر از محیط کشت MS فاقد هورمون کالوسزایی نشان دادند. بالاترین وزن تر کالوس (۴/۱۲۳gr) در محیط کشت MS حاوی ۱/۵ میلیگرم بر لیتر NAA و یک میلیگرم بر لیتر BAP و کمترین وزن تر کالوس (۰/۲۶۱gr) در محیط کشت MS حاوی ۰/۵ میلیگرم بر لیتر NAA و دو میلیگرم بر لیتر کیتین به دست آمد. کالوسهای حاصل از محیط MS حاوی ۰/۵ میلیگرم بر لیتر NAA و ۰/۵ میلیگرم بر لیتر BAP پس از زیرکشت به محیط MS فاقد هورمون باززا شده و گیاهان باززا شده در شرایط درونشیشهای به مرحله گلدهی رفتند.

**کلمات کلیدی:** کالوسزایی و باززایی درونشیشهای، کشت بافت، همیشه بهار، *Calendula officinalis* L.

### مقدمه:

بیوتکنولوژی نقش زیادی در تولید، اصلاح و افزایش بهره‌وری محصولات گیاهان دارویی دارد. یکی از بخشهای مهم بیوتکنولوژی، کشت بافت است که کاربردهای مختلف آن در زمینه گیاهان دارویی از جنبههای مختلف قابل بررسی است. دلایل استفاده محققان از این روشها به دست آوردن گیاهان همگن، ایجاد تغییرات سوماکلونال، حذف عوامل بیماریزا، تولید متابولیتهای ثانویه، نگهداری ذخایر توارثی، انتقال ژن و دو رنگگیری بینگونه‌ای میباشد (۲).

گیاه همیشه بهار با نام علمی *Calendula officinalis* L. متعلق به تیره Asteraceae (کاسنی) میباشد. گیاه علفی زیبا، یک ساله و بهندرت دو ساله با ساقه منشعب و سفت میباشد. همیشه بهار رشد و نمو سریعی دارد، به طوری که ۴۰-۵۰ روز بعد از سبز شدن به گل مینشیند (۱). گل این گیاه علاوه بر مصارف خوراکی (طعمدهنده و رنگدهنده غذاهای مختلف) دارای مواد مؤثره و ترکیباتی است که در صنعت (تهیه رنگهای نقاشی و نایلون صنعتی) و داروسازی (تهیه انواع کرمها و لوسیونها) کاربرد دارد (۴). اخیراً در اروپا توجه زیادی به این گیاه به عنوان یک گیاه روغنی شده است. دانه آن حدود ۱۵ تا ۲۰ درصد روغن دارد که این نوع روغن دارای حدود ۴۵ تا ۶۰ درصد اسید کالندیک میباشد (۳). نتایج برخی از پژوهشها نشان داده است که عصاره آلی گلهای همیشه بهار دارای فعالیت ضد ویروس ایدز میباشد (۴). این تحقیق به منظور بررسی

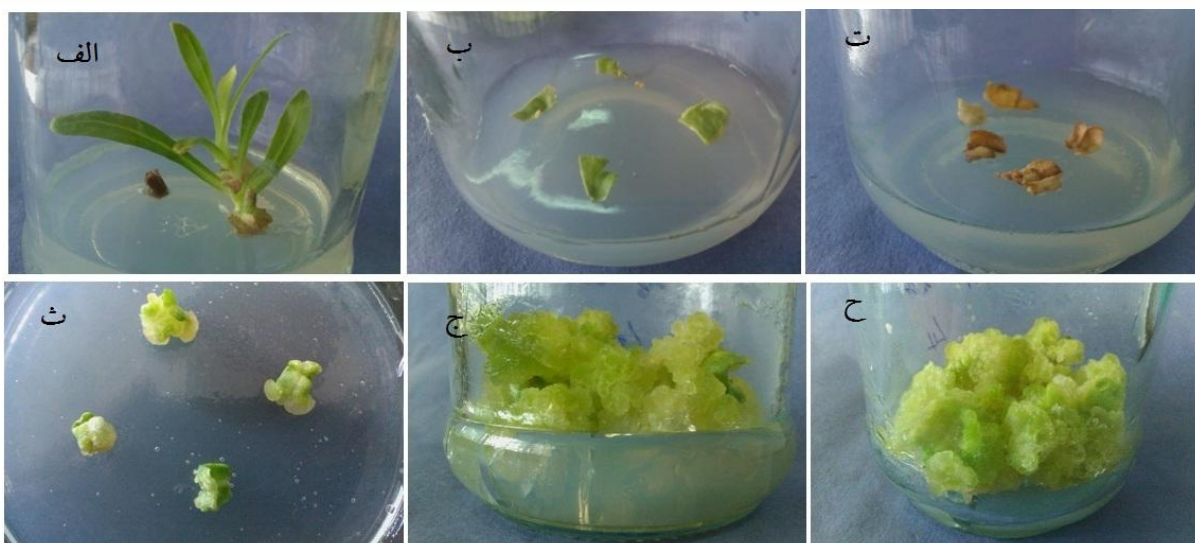
قابلیت کشت گیاه همیشه بهار در شرایط درونشیشه‌ای و همچنین تعیین تنظیم‌کننده‌های رشدی مناسب جهت کالوسدهی و باززایی انجام گرفت.

#### مواد و روشها:

این پژوهش در آزمایشگاه کشت بافت گروه اصلاح نباتات دانشگاه محقق اردبیلی انجام شد. بذور همیشه بهار پس از ضدعفونی سطحی توسط الکل ۷۰٪ به مدت یک دقیقه و هیپوکلریت سدیم یک درصد به مدت ۱۵ دقیقه، روی محیط کشت پایه MS (۵) کشت شده و در اتاقک رشد با شرایط دمایی  $25 \pm 2$  درجه سانتیگراد و دوره نوری ۱۶ ساعت نور و ۸ ساعت تاریکی نگهداری شدند. بعد از جوانه‌زنی بذور و رشد مناسب گیاهچه‌ها، ریزنمونه‌های برگ تهیه شده و در محیط کشت MS حاوی تنظیم‌کننده رشد NAA (۰/۱، ۰/۵ و ۱/۵ میلی‌گرم بر لیتر) در ترکیب با BAP (۰/۵ و یک میلی‌گرم بر لیتر) یا کیتین (یک و دو میلی‌گرم بر لیتر) کشت شدند. زیرکشت کالوسهای حاصل، هر چهار هفته یکبار انجام گرفت. آزمایش به صورت فاکتوریل در قالب طرح پایه کاملاً تصادفی با چهار تکرار انجام گرفت. تجزیه و تحلیل آماری با استفاده از نرم‌افزارهای SPSS16.0 و MSTATC صورت گرفت.

#### نتایج و بحث:

ریزنمونه‌های برگ کشت شده در همه محیط‌های کشت به غیر از محیط کشت MS فاقد هورمون پس از گذشت ۱-۲ هفته متورم شده و تولید کالوس نمودند (شکل ۱). براساس نتایج حاصل از تجزیه واریانس اثر NAA، اثر سایتوکینین و اثر متقابل NAA × سایتوکینین برای صفت وزن تر کالوس معنی‌دار به دست آمدند (جدول ۱). وزن تر کالوسها به طور گسترده به عنوان معیاری از رشد کالوسها مورد اندازه‌گیری قرار می‌گیرد. براساس مقایسه میانگین داده‌ها، بیشترین وزن تر تک کالوس (۴/۱۲۳gr) مربوط به محیط کشت MS حاوی ۱/۵ میلی‌گرم بر لیتر NAA و یک میلی‌گرم بر لیتر BAP و کمترین وزن تر کالوس (۰/۲۶۱gr) مربوط به محیط کشت MS حاوی ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر NAA و دو میلی‌گرم بر لیتر کیتین به دست آمد. به‌طور کلی محیط‌های حاوی ۰/۵ یا ۱/۵ میلی‌گرم بر لیتر NAA در ترکیب با BAP شرایط مناسبتری را برای رشد و تکثیر کالوسها فراهم نمود. کالوسهای حاصل از این محیطها کالوسهای حجیم و ترد بودند. محیط‌های حاوی غلظت ۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر NAA در ترکیب با BAP و کیتین و همچنین محیط‌های حاوی غلظت ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر NAA در ترکیب با کیتین کالوسهای با وزن کمتر داشتند (شکل ۲).

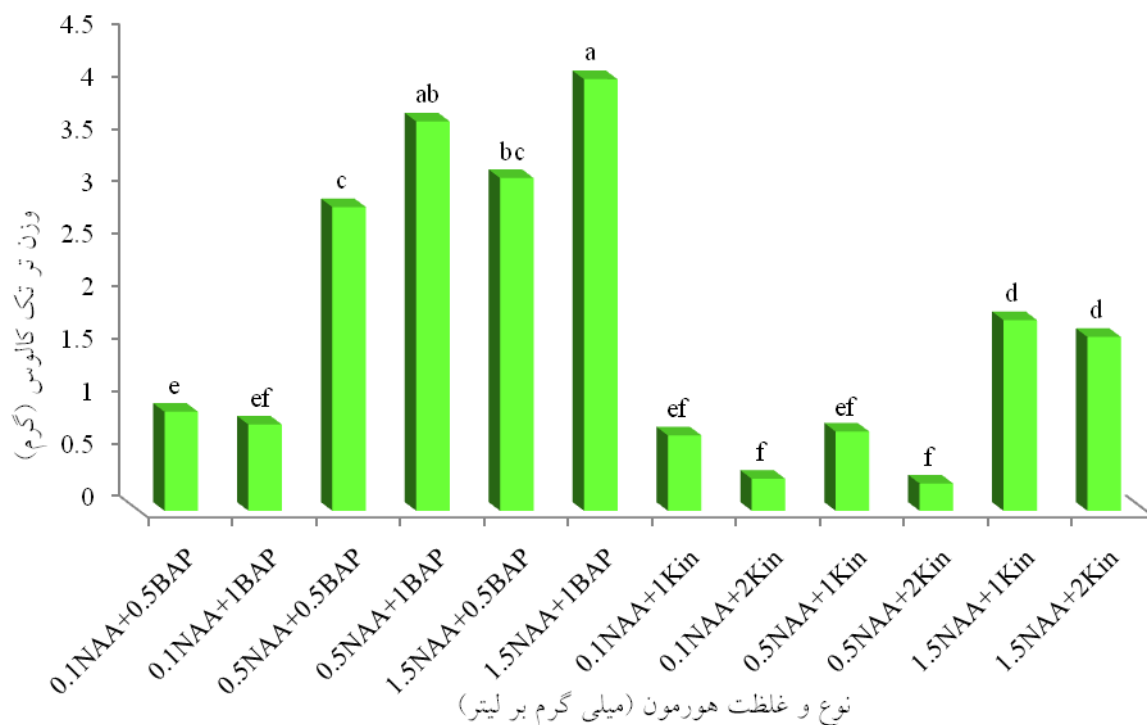


شکل ۱- کشت درونشیشه‌های گیاه همیشه بهار: الف) گیاهچه همیشه بهار حاصل از بذر کشت شده در محیط کشت پایه MS؛ ب) ریزنمونه برگ تازه تهیه شده؛ ت) ریزنمونه‌های قهوه‌ای شده در محیط کشت MS فاقد هورمون؛ ث، ج و ح) کالوسزایی ریزنمونه برگ

جدول ۱- تجزیه واریانس صفت وزن تر کالوس ریزنمونه برگ گیاه همیشه بهار در محیط کشت پایه MS

میانگین مربعات	درجه آزادی	منابع تغییر
وزن تر کالوس		
۱۶/۲۰ **	۲	اکسین NAA
۸۰/۲۱ **	۳	سایتوکینین
۲/۲۶ **	۶	اکسین × سایتوکینین
۰/۱۵	۳۶	خطا
۲۲/۱۸		درصد ضریب تغییرات

\*\* معنی‌دار در سطح احتمال یک درصد



شکل ۲- وزن تر کالوس ریزنمونهای برگ گیاه همیشه بهار در محیط کشت پایه MS

کالوسهای حاصل از محیط MS حاوی ۰/۵ میلیگرم بر لیتر NAA و ۰/۵ میلیگرم بر لیتر BAP پس از زیرکشت به محیط MS فاقد هورمون باززا شد، همچنین گیاه باززا شده در شرایط درونشیشهای تولید گل کردند (شکل ۳).



شکل ۳- باززایی و گلدهی درونشیشهای گیاه همیشه بهار: الف، ب و پ) مراحل باززایی، رشد و گلدهی درونشیشهای گیاه همیشه بهار در محیط کشت پایه MS

منابع:

- ۱- امیدبیگی، ر. ۱۳۷۹. رهیافتهای تولید و فراوری گیاهان دارویی. طراحان نشر. آستان قدس رضوی.
- ۲- فارسی، م، باقری، ع. ا. ۱۳۸۷. اصول اصلاح نباتات. چاپ هفتم. انتشارات جهاد دانشگاهی مشهد. ۳۷۶ ص.
- 3- ADAS consulting Ltd. 2002. Calendula as Agronomic Raw Material for Industrial Application (CARMINA). (Final project report). ADAS Terrington, Terrington St Clement, King's Lynn, Norfolk.
- 4- Kalvatchev, Z., R. Walder and D. Garzaro. 1997. Anti- HIV activity of extracts from calendula. Biomedicine & Pharmacotherapy, 51: 176-180.
- 5- Murashige, T., Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol Plant, 15:473-476.

## In vitro callus induction and regeneration of Marigold (*Calendula officinalis* L.)

Leila Koochi<sup>1</sup>, Parisa Daryani<sup>2</sup>, Nasser Zare<sup>3</sup>

1- M.Sc. Student of plant breeding in University of Mohaghegh Ardabili.

3- M.Sc. Student of Biotechnology, University of Mohaghegh Ardabili.

3- Department of Agronomy and Plant Breeding, University of Mohaghegh Ardabili.

**Abstract:** The success of many in vitro selection and genetic manipulation techniques in higher plants depends on a successful in vitro regeneration system. In this study, the effect of NAA in combination with BAP and Kin on callus induction and shoot regeneration from leaf explants of Marigold was investigated. Leaf explants in all of treatments apart from MS medium without hormones showed callus induction. The highest callus weight (4.123gr) was obtained in MS medium supplemented with 1.5 mg/l NAA and 1 mg/l BAP and the lowest callus weight (0.261gr) was obtained in MS medium containing 0.5 mg/l NAA and 2 mg/l Kin. The calli from MS medium containing 0.5 mg/l NAA and 0.5 mg/l BAP showed shoot regeneration after subculture to hormone-free MS medium. Flowering of regenerated plants occurred in in vitro.

**Key words:** *Calendula officinalis* L., Callus induction and in vitro regeneration, Marigold, Tissue culture