مجله زیست فناوری گیاهان دارویی
سال سوم، شماره اول، بهار و تابستان ۱۳۹۶

القاء کالوس و باززایی از ریزنمونه های *Cerasus mahaleb* L.

غلامرضا گودرزی[1*] و فاطمه احمدلو[2]

چکیده

گونه محلب (*Cerasus mahaleb* L.) از خانواده Rosaceae در صنایع مختلف دارویی، بسته‌بندی، رنگرزی، شیمیایی، بهداشتی، غذایی و ساخت عطر و اسانس، مورد توجه قرار گرفته است. جهت تولید کالوس آن، قطعات برگ‌ها در اندازه‌های ۰/۵ تا ۱ سانتی‌متر مربع از گیاهچه‌های کشت بافتی تهیه و پس از ضد عفونی سطحی در محیط کشت MS حاوی هورمون‌های 2, 4-D در غلظت‌های ۰، ۰/۲۵، ۰/۵، ۱، ۲ و ۳ میلی‌گرم در لیتر و BAP در غلظت‌های ۰، ۰/۵ و ۱ میلی‌گرم در لیتر تحت شرایط تاریکی در اتاقک رشد قرار گرفتند. در مرحله بعد کالوس‌ها به محیط کشت حاوی تنظیم‌کننده‌های رشد BAP، TDZ و KIN و NAA در غلظت‌های مختلف جهت باززایی از کالوس انتقال یافتند و مشخصه‌های درصد کالوس‌زایی، قطر کالوس، نوع کالوس و رنگ کالوس آنها اندازه‌گیری شد. ۱۰۰ درصد کالوس‌زایی با بیشترین قطر کالوس از نوع ترد و جنین‌زا به رنگ کرم-سبز روشن در محیط MS در غلظت ۲ میلی‌گرم در لیتر 2, 4-D در ترکیب با ۱ میلی‌گرم در لیتر BAP مشاهده شد. به‌دلیل قهوه‌ای، نرم و شل بودن کالوس‌ها، باززایی در هیچ یک از تیمارها انجام نگرفت.

واژه‌های کلیدی: تنظیم کننده‌های رشد، کشت درون شیشه‌ای، محلب، محیط کشت MS، نوع کالوس

۱*- نویسنده مسئول، استادیار پژوهش، بخش تحقیقات منابع طبیعی، مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی استان مرکزی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، اراک، ایران، goodarzi44@yahoo.com
۲- استادیار پژوهش، بخش تحقیقات صنوبر، موسسه تحقیقات جنگلها و مراتع کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران، ایران

مقدمه

یکی از گونه‌های جنس *Cerasus*، گونه محلب (*C. mahaleb*) از خانواده Rosaceae است که به‌دلیل داشتن خاصیت ضد میکروبی در صنایع مختلف دارویی، بسته‌بندی، رنگرزی، شیمیایی، ساخت عطر و اسانس، بهداشتی و غذایی مورد توجه قرار گرفته است. گل‌ها، برگ‌ها، پوست ساقه و چوب *C. mahaleb* دارای ترکیبات فرار از مشتقات هیدروکربن‌های آلیفاتیک، الکل‌ها، کربونیل‌ها، اسیدهای چرب، ترپن‌ها، C13-norisoprenoids و فنیل پروپان می‌باشد (Mastelic et al., 2006). استفاده از کشت سلول و بافت و تشکیل کالوس از اندام‌های مختلف *C. mahaleb* در شرایط آزمایشگاهی یکی از روش‌های جایگزین، برای تولید ماده دارویی و ازدیاد متابولیت های ثانویه می‌باشد، کشت بافت با وجود هزینه و سرمایه زیاد و همچنین نیاز به نیروی متخصص توانسته است راهی عملی در جهت تولید محصولات متابولیتی منحصر به فرد ایجاد نماید که ساختن مصنوعی آنها به‌دلیل مشکلات تکنیکی، مقدور نیست (Bajaj et al., 1988). ساختار پیچیده بسیاری از متابولیت‌های ثانویه باعث شده که نتوان آنها را به‌صورت مصنوعی سنتز نمود و لذا تنها منبع تولید آنها سلول گیاه و سپس تشکیل کالوس از طریق کشت ریزنمونه می‌باشد (Scragg, 1986). بافت ریز نمونه، يك بافت تمایز یافته است که به‌عنوان ماده آغازین برای تولید کالوس مورد استفاده قرار می‌گیرد. مطالعات متعددی در زمینه تولید کالوس در خانواده Rosaceae انجام شده است. در تحقیق ویشلقی و همکاران (۱۳۸۹) محیط‌های شامل ۲ و ۳ میلی‌گرم در لیتر 2, 4-D و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA در محیط MS و محیط شامل ۵ میلی‌گرم در لیتر 2, 4-D و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر 2, 4-D در ترکیب با ۲/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر KIN در محیط B5 بهترین محیط‌ها برای تولید کالوس *Rosa hybrida* cv 'Tanbakeda' بودند.

در بررسی تولید کالوس *Rosa gallica* L. با تنظیم‌کننده‌های رشد 2, 4-D، BAP و GA_3 از جدا کشت برگ، رضا نژاد و طراحی (۱۳۹۲) نشان دادند که غلظت ۳- ۲ میلی‌گرم در لیتر 2, 4-D و ۱ میلی‌گرم در لیتر BAP برای تحریک تولید کالوس بهینه بودند. مقیمی و صفر نژاد (۱۳۹۳) ۸۰ درصد کالوس‌زایی *Crataegus* sp. را در محیط کشت N6 شامل ۷ میلی‌گرم در لیتر BA در ترکیب با ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA و سازمند و صفر نژاد (۱۳۹۵) بیشترین درصد کالوس‌زایی *Berberis vulgaris* را در محیط کشت MS حاوی ۲ میلی‌گرم در لیتر NAA و ۱ میلی‌گرم در لیتر KIN نتیجه گرفتند. Korban(1996) and Declerckدر بررسی کالوس‌زایی *Prunus persica* L. در محیط کشت نیم غلظت MS و ۶ تنظیم‌کننده رشد با غلظت‌های ۵، ۱۰ و ۱۵ میکرو مولار، TDZ کالوس‌های سفت سبز رنگ، BA و Zeatin کالوس‌های کوچک و 2, 4-D کالوس‌های ترد سفید متمایل به زرد رنگ را تولید کردند در حالی که در KIN کالوسی تولید نشد و در محیط کشت MS، بیشترین درصد کالوس در غلظت‌هایی از ۸ تا ۱۳ میکرو مولار TDZ تولید شد. Isikalan et al. (2010) توانستند ۹۰ درصد کالوس‌های سفت و سبز تیره جنین‌زا در *Amygdalus communis* L. را در محیط کشت MS با غلظت ۱ میلی‌گرم در لیتر BAP و ۱ میلی‌گرم در لیتر NAA و Shekhar Kumar et al. (2016) بیشترین درصد کالوس‌زایی *Pyrus malus* L. (۸۶/۶۷ درصد) را در ۱ میلی‌گرم در لیتر BA در ترکیب با ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA نتیجه گرفتند.

باززایی غیر مستقیم که به وسیله تولید کالوس صورت می‌گیرد دارای فواید زیادی از جمله مطالعه مورفولوژیکی و فیزیولوژیکی گیاهان، تولید متابولیت‌های ثانویه، تنوع سوموکلونال و انتقال پایدار ژن می‌باشد (پیریک، ۱۹۷۶). یکی از موانع موجود در کشت درون شیشه‌ای، تولید کالوس و باززایی غیر مستقیم خانواده رزاسه، تراوش فنول‌ها و قهوه‌ای شدن کالوس و نهایتاً مرگ تدریجی آن می‌باشد که از طریق فعالیت پلی فنل اکسیداز و پراکسیداز بوسیله

تحریک واکنش دفاعی ناشی از زخم شدن رخ می‌دهد (Cördük and Aki, 2011). از طرف دیگر، یکی از مشکلات پیش روی محققان در تولید گیاهچه محلب از طریق کشت درون شیشه‌ای، ایجاد پدیده شیشه‌ای شدن است که سبب از بین رفتن تدریجی ریزنمونه و عدم موفقیت در شاخساره‌زایی گیاه می‌شود (گودرزی و همکاران، ۱۳۹۵) ولیکن تاکنون مطالعه‌ای روی تولید کالوس و باززایی محلب انجام نگرفته است.

تحقیق حاضر به‌دنبال یافتن دستورالعمل مناسب برای باززایی و تکثیر گونه *C. mahaleb* از طریق القای کالوس با قطعات جدا کشت برگ و غلظت‌های مختلف تنظیم‌کننده‌های مختلف رشد در محیط کشت می‌باشد تا نتایج آن برای مطالعات بعدی در خصوص ریزازدیادی، مهندسی ژنتیک و انتقال ژن مورد استفاده قرار گیرد.

مواد و روش‌ها

مشخصات منطقه مورد مطالعه

تحقیق حاضر در پژوهشکده تحقیقات گل و گیاهان زینتی محلات با طول جغرافیایی ۵۰ درجه و ۳۰ دقیقه شرقی و عرض جغرافیایی ۳۳ درجه و ۵۳ دقیقه شمالی، در جنوب شرقی مرکز استان مرکزی قرار دارد. اقلیم آن براساس روش آمبرژه نیمه خشک و بر اساس روش دومارتن خشک بیابانی سرد با ارتفاع ۱۷۵۰ متر از سطح دریا، میانگین بارندگی سالیانه ۲۲۰ میلی‌متر و میانگین دمای سالیانه ۲۵ درجه سانتی‌گراد در طی دوره اجرای طرح بوده است. بافت خاک شنی رسی نسبتاً سبک (بافت سنگین) و شنی لومی (شنی رسی سبک) می‌باشد.

روش تحقیق

در سال ۱۳۹۰ بذرهای *Cerasus mahaleb* L. از منطقه شول‌آباد استان لرستان برداشت و در گلخانه پژوهشکده تحقیقات گل و گیاهان زینتی محلات در کیسه‌های پلی اتیلنی کاشته شدند. از گیاهچه‌های رشد یافته پس از یک دوره فصل رویش، ریزنمونه تک گره حاوی جوانه جانبی تهیه و ازدیاد گردید. جهت تولید کالوس، قطعات برگ‌ها در اندازه‌های ۰/۵ تا ۱ سانتی‌متر مربع از گیاهچه‌های کشت بافتی تهیه و پس از ضد عفونی سطحی به‌مدت ۳۰ دقیقه، ضدعفونی با محلول اتانول ۷۰ درصد به‌مدت ۳۰ ثانیه و استفاده از محلول سفید کننده تجاری هیپو کلریت سدیم ۱ درصد به‌مدت ۱۰ دقیقه انجام گرفت. ریزنمونه‌ها در محیط کشت MS حاوی هورمون‌های 2, 4-D در غلظت‌های ۰، ۰/۲۵، ۰/۵، ۱، ۲ و ۳ میلی‌گرم در لیتر و BAP در غلظت‌های ۰، ۰/۵ و ۱ میلی‌گرم در لیتر تحت شرایط تاریکی برای مدت زمان دو ماه در اتاقک رشد با حرارت ۲۵ درجه و رطوبت ۵۰ درصد قرار گرفتند به نحوی‌که سطح پشتی برگ (سطح پر روزنه) به سمت بالا و حاوی رگبرگ میانی بوده است. عمل واکشت نمونه‌ها هر چهار هفته یکبار صورت گرفت. ریزنمونه‌ها پس از ۶ هفته تولید کالوس نمودند. تعداد ۱۵ریزنمونه در هر تیمار (۳ پتری‌دیش و در هر یک ۵ ریزنمونه) و تعداد کل ۱۸ تیمار و ۲۷۰ ریزنمونه در مرحله کالوس‌زایی استفاده شد. در مرحله بعد کالوس‌ها به محیط کشت MS حاوی تنظیم‌کننده‌های رشد BAP (۰/۵، ۱، ۲، ۳، ۴ و ۵ میلی‌گرم در لیتر)، TDZ (۰/۲، ۳، ۰/۴، ۰/۵ و ۱ میلی‌گرم در لیتر) و KIN (۰، ۱ و ۲ میلی‌گرم در لیتر) و اکسین NAA در غلظت‌های ۰/۰۵ و ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر جهت باززایی از کالوس انتقال یافتند. به‌دلیل قهوه‌ای، نرم و شل بودن کالوس‌ها، باززایی در هیچ یک از تیمارها انجام نگرفت بنابراین در نتایج آورده نشدند. جهت جلوگیری از قهوه‌ای شدن کالوس‌ها از جاذب‌های ترکیبات فنولی همچون پلی وینیل پیرولیدون[9] در غلظت ۰/۵ درصد، اسید اسکوربیک در غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر، اسید سیتریک در غلظت ۵۰ میلی‌گرم در لیتر، زغال فعال در غلظت ۳ میلی‌گرم در لیتر، پلی اتیلن گلایکول[10] با غلظت ۲-، ۴- و ۶- بار و پرولین با غلظت‌های ۲۵، ۵۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر

[9] PVP

[10] PEG

استفاده شد ولی تأثیری در جلوگیری از قهوه‌ای شدن کالوس‌ها نداشتند بنابراین باززایی در هیچ یک از تیمارها موفق‌آمیز نبود. پس از گذشت مدت زمان ۳ ماه مشخصه‌های درصد کالوس‌زایی، قطر کالوس (Hooker and Nabors, 1977)، نوع کالوس و رنگ کالوس اندازه‌گیری شد.

نتایج

مقایسه میانگین درصد کالوس‌زایی و قطر کالوس در ریز نمونه‌های برگ *C. mahaleb* در محیط کشت MS تحت تأثیر 2, 4-D در ترکیب با BAP در غلظت‌های مختلف توسط آزمون تجزیه واریانس اختلاف معنی‌دار آماری را نشان می‌دهد. ۱۰۰ درصد کالوس‌زایی و بیشترین قطر کالوس در تیمار ۲ میلی‌گرم در لیتر 2, 4-D در ترکیب با ۱ میلی‌گرم در لیتر BAP از نوع ترد و کروی و جنین‌زا به رنگ کرم-سبز روشن وجود دارد. تیمار بدون استفاده از تنظیم کننده های رشد و تیمار با غلظت ۰/۲۵ میلی‌گرم در لیتر و بدون استفاده از BAP کالوسی را تولید نکردند (جدول ۱). 2, 4-D در غلظت‌های ۰/۲۵ و ۰/۵ کالوس‌های نرم و آبکی را تولید کرد.

جدول ۱- نتایج تجزیه واریانس و مقایسه میانگین مشخصه‌های درصد کالوس‌زایی، قطر کالوس، نوع کالوس و رنگ کالوس در ریزنمونه‌های برگ *C. mahaleb* تحت تأثیر 2, 4-D در ترکیب با BAP در محیط کشت MS

تیمارها	2, 4-D (میلی‌گرم در لیتر)	BAP (میلی‌گرم در لیتر)	درصد کالوس زایی	قطر کالوس (سانتی‌متر)	نوع کالوس	رنگ کالوس
F			۶/۱۳**	۱۸/۹۳**	-	-
۱	۰	۰	۰/۰۰(۰/۰۰)h	۰/۰۰(۰/۰۰)j	-	-
۲	۰	۰/۵	۱۰/۹۳(۰/۶۲)gh	۸(۰/۷۵)i	نرم و آبکی	قهوه‌ای
۳	۰	۱	۲۶/۳۷(۰/۷۲)fgh	۱۱/۳۳(۰/۶۷)fghi	نرم و آبکی	قهوه‌ای
۴	۰/۲۵	۰	۰/۰۰(۰/۰۰)h	۰/۰۰(۰/۰۰)j	-	-
۵	۰/۲۵	۰/۵	۴۶/۶۷(۲/۶۷)defg	۱۱/۳۳(۰/۶۷)fghi	ترد	قهوه‌ای-کرم
۶	۰/۲۵	۱	۶۱/۶۷(۳/۲۶)abcdef	۱۸(۱/۱۵)abc	نرم و آبکی	قهوه‌ای
۷	۰/۵	۰	۱۱/۳(۰/۶۸)gh	۷/۳۳(۰/۶۷)i	نرم و آبکی	قهوه‌ای
۸	۰/۵	۰/۵	۸۳/۳۳(۶/۶۷)abcd	۱۰/۶۷(۰/۶۷)fghi	نرم و آبکی	قهوه‌ای
۹	۰/۵	۱	۸۳/۳۳(۶/۸۲)abcd	۱۸(۱/۱۵)abc	ترد	قهوه‌ای-کرم
۱۰	۱	۰	۳۳/۳۳(۱/۸۲)fgh	۱۳/۳۳(۰/۶۷)defg	ترد	کرم - قهوه ای
۱۱	۱	۰/۵	۹۳/۳۳(۴/۶۷)ab	۲۰(۱/۱۵)ab	ترد و جنین زا	کرم-سبز روشن
۱۲	۱	۱	۸۶/۶۷(۳/۳۳)abc	۱۷/۳۳(۱/۳۳)abcd	ترد و جنین زا	کرم-سبز روشن
۱۳	۲	۰	۳۶/۸۲(۱/۱۸)fgh	۱۲/۶۷(۰/۶۷)efgh	ترد	کرم-قهوه ای
۱۴	۲	۰/۵	۸۱/۶۷(۳/۲۸)abcde	۱۷/۳۳(۰/۶۷)abcd	نرم-ترد و برخی جنین زا	قهوه ای-کرم-سبز روشن
۱۵	۲	۱	۱۰۰(۰/۰۰)a	۲۰/۶۷(۰/۶۷)a	ترد و جنین زا	کرم-سبز روشن
۱۶	۳	۰	۳۱/۸(۲/۳۱)fgh	۱۲/۶۷(۰/۶۷)efgh	نرم و آبکی	قهوه ای
۱۷	۳	۰/۵	۳۶(۰/۷۶)fgh	۱۴/۶۷(۱/۳۳)cdef	ترد	کرم-قهوه ای
۱۸	۳	۱	۵۳/۳۳(۲/۴۱)cdef	۱۲/۶۷(۰/۶۷)efgh	ترد	قهوه ای- کرم

** معنی‌دار در سطح اعتماد ۹۹ درصد، اعداد داخل پرانتز اشتباه معیار هستند. حروف لاتین کوچک مشابه معرف عدم وجود تفاوت معنی‌دار در هر ستون می‌باشد.

بحث

کالوس یک بافت غده‌ای کم و بیش تمایز نیافته است که به‌طور معمول در محل زخم‌های ایجاد شده در بافت‌ها و اندام‌های تمایز یافته ایجاد می‌شود. در تحقیق حاضر، کال‌زایی عموماً از سطوح برش یافته آغاز شد و جداکشت‌های برگ محیط کشت MS از هفته دوم شروع به کال‌زایی نمودند. نتایج این تحقیق نشان می‌دهد که نوع تنظیم کننده‌های رشد می‌تواند بر میزان کالوس‌زایی اثر درخور توجهی داشته باشد.

نسبت بهینه از دو تنظیم‌کننده رشد اکسین و سیتوکینین عموماً BAP برای تشکیل کالوس مورد نیاز است (Dixon and Gonzales, 1996). اکسین‌ها به خصوص 2, 4-D تشکیل جنین‌های سوماتیکی را القا کرده و تقسیم سلولی را باعث می‌شوند، این تنظیم‌کننده‌های رشد در تشکیل کالوس نیز نقش داشته و از رشد جوانه‌های جانبی و ریشه جلوگیری می‌کنند. سیتوکینین‌ها نیز هم تقسیم سلولی را و هم تمایز جوانه‌های جانبی وهم افزایش فعالیت آنزیم‌ها را بر عهده دارند. به‌طور کلی استفاده از غلظت‌های پایین تنظیم‌کننده‌های رشد تأثیر بیشتری بر درصد کالوس‌زایی دارد. میزان کاربرد تنظیم‌کننده‌های خارجی به ژنوتیپ و میزان هورمون داخلی گیاه بستگی دارد. مطالعات Tarrahi Rezanejad and (2013) روی *Rosa gallica* و *R. hybrida* نشان داد که ۲ میلی‌گرم در لیتر 2, 4-D و ۱ میلی‌گرم در لیتر BAP بهترین غلظت برای تشکیل کالوس می‌باشند. Ram et al. (2011) در *R. hybrida* میزان کال‌زایی (۹۱/۱۱ درصد) را در ۴ میلی‌گرم در لیتر 2, 4-D در ترکیب با ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP و Peer et al. (2012) در *P. avium* میزان کال‌زایی ۶۶/۱۹ درصد را در ۲ میلی‌گرم در لیتر 2, 4-D در ترکیب با ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP نتیجه گرفتند. Salehi Shanjani (2003) روی *J. excelsa* با نصف غلظت نیترات آمونیاک و نیترات پتاسیم و اضافه کردن ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر گلوتامین به محیط کشت پایه MS و استفاده از ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر BAP و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر 2, 4-D بیش از ۸۰ درصد کالوس‌زایی را مشاهده کردند. مطالعات Sakurai et al. (1997) روی گونه *Rosa spp.* نشان داد که بیشترین درصد کالوس در محیط کشت MS در ترکیب با ۵ میلی‌گرم در لیتر NAA و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BA حاصل شد. در تحقیقی روی *Citrus jambhiri* در محیط کشت MS و ریزنمونه‌های برگ، تیمارهای ۴ میلی‌گرم در لیتر 2, 4-D، ۴ میلی‌گرم در لیتر NAA، ۴ میلی‌گرم در لیتر 2, 4-D + ۰/۷۵ میلی‌گرم در لیتر BA و ۴ میلی‌گرم در لیتر 2, 4-D + ۰/۷۵ میلی‌گرم در لیتر BA + ۰/۲۵ میلی‌گرم در لیتر NAA به ترتیب میزان کال‌زایی ۹۸/۶۶ درصد، ۶۰/۲۸ درصد، ۵۷/۶۶ درصد و ۶۳/۳۳ درصد نتیجه گرفته شد (Vijay et al., 2010). گزارش شده است که غلظت‌های خیلی زیاد هورمون 2, 4-D ممکن است برای بیان ژن‌های درگیر در تقسیم سلولی و تمایززدایی بافت، مهار کننده باشد که با نتایج تحقیق حاضر همخوانی دارد.

بافت کالوس بسته به گونه گیاهی می‌تواند سفت و سخت (به علت وجود لیگنین) و یا ترد و شکننده باشد. با وجود اینکه کشت ریزنمونه‌های اولیه به‌کارگیری شده در تحقیق به‌صورت همزمان انجام گرفت، ویژگی‌های کیفی ازجمله بافت و رنگ کالوس‌های ایجاد شده در محیط کشت‌ها متفاوت بود. در مطالعه Avilés et al. (2009) کشت ریزنمونه برگ *Juglans regia* در ۴ میلی‌گرم در لیتر NAA و ۲ میلی‌گرم در لیتر BAP کمترین نرخ قهوه‌ای شدن را نشان داد. عوامل متعددی بر نوع رنگ کالوس مؤثرند. میزان اکسین و سیتوکینین به کار برده شده در محیط کشت و شرایط اتاق کشت نیز بر رنگ و سفتی بافت کالوس مؤثرند. قهوه‌ای شدن کالوس در اثر فنوله شدن محیط کشت و یا فعالیت‌های آنزیمی باعث می‌شود که رنگ کالوس از سبز یا زرد به قهوه‌ای تیره تبدیل شده و نهایتاً موجب زوال کالوس می‌شود.

در طی آغازش درون شیشه‌ای کالوس، تمایز و تخصص یافتگی سلول‌ها در گیاه والد، برگشت یافته و یاخته‌های

ریزنمونه به حالت تمایز نیافته در می‌آیند. فرایند برگشت از تمایز[1] در نتیجه تغییر در فعالیت متابولیکی، ناپدید شدن مواد ذخیره‌ای و افزایش سرعت تقسیم سلولی مشخص شده که منجر به تولید سلول‌های پارانشیمی تمایز نیافته می‌شود. قابل ذکر است که کالوس تولید شده دارای خصوصیات ظاهری و فیزیکی متفاوتی بوده و قابلیت تمایز به ریشه، اندام‌های هوایی و یا جنین‌های سوماتیکی را دارا می‌باشد. در این بررسی ضمن تشکیل کالوس‌هایی با رنگ‌ها و اشکال مختلف، در نمونه‌های مورد بررسی، شروع کالوس‌دهی و رشد آن از سرعت نسبتاً پائینی برخوردار بوده است. در جدا کشت‌های برگ، کالوس تولید شده در محیط MS و غلظت-های مختلف 2, 4- D و BAP قهوه‌ای-کرم- سبز کم‌رنگ بودند که نشانی از تمایز در آنها مشاهده نمی‌شد. از آنجائیکه وجود هورمون‌های تحریک کننده رشد به‌ویژه اکسین برای تولید کالوس در ریزنمونه‌های مورد بررسی ضروری می‌باشد لذا عدم واکنش ریزنمونه‌ها در شاهد (غلظت صفر) امری طبیعی است. با وجود اینکه در شرایط عدم استفاده از اکسین هم کالوس تولید شد، اما کالوس‌های ایجاد شده از نظر مقدار، رنگ و ساختمان با کالوس تولید شده در محیط‌های کشت دارای اکسین، متفاوت بودند و این کالوس‌ها بسیار نرم و آبکی بودند. ازآنجا که کیفیت کالوس به نوع و میزان عناصر موجود در محیط کشت (ماکرو، میکرو، ویتامین‌ها و غیره) وابسته است، تنظیم‌کننده‌های مختلف رشد می‌توانند روی این متغیر اثرگذار باشند.

در این پژوهش با وجود استفاده از نسبت‌های هورمونی متنوع برای کشت کالوس، با مشاهده و بررسی نمونه‌های کشت‌شده هیچ‌گونه اندام‌زایی در بافت مشاهده نشد که در بخش نتایج آورده نشده است که علت آن ممکن است در ارتباط با استفاده از 2, 4-D باشد زیرا چندین گزارش وجود دارد مبنی بر اینکه عموماً استفاده از این هورمون سبب توقف اندام‌زایی و تمایزیابی بافت‌ها شده و کال‌زایی را تسریع می‌کند (Snjezana et al., 2002). اکسیداسیون به‌دلیل حضور رادیکال‌های آزاد بافت نیز در کالوس‌های قهوه‌ای اتفاق می‌افتد که تأثیر منفی روی تمایز بافت دارند.

غلظت ۲ میلی‌گرم در لیتر 2, 4-D در ترکیب با ۱ میلی‌گرم در لیتر BAP را به‌دلیل تولید ۱۰۰ درصد کالوس با بیشترین قطر و از نوع ترد و جنین و به رنگ کرم-سبز روشن در محیط کشت MS را می‌توان به‌عنوان پروتکل کالوس‌زایی *Cerasus mahaleb* معرفی نمود اگرچه نیاز به تحقیق بیشتری در این زمینه برای دستیابی به نتایج بهتری می‌باشد. برای باززایی از کالوس نیز بایستی بررسی‌هایی بیشتری روی تیمارهای مختلف با محیط‌های کشت و تنظیم‌کننده‌های رشد مختلف انجام گردد.

[1] Dedifferentiation

منابع

پیریک، آر. ال. ام. (۱۹۷۶). مبانی کشت بافتهای گیاهی، (مترجمین: باقری، ع.ر.، صفاری، م.، ۱۳۷۶)، انتشارات دانشگاه فردوسی مشهد. شماره ۲۱۱، مشهد، ۴۰۶ صفحه.

رضا نژاد، ف. و طراحی، ر. (۱۳۹۲). اثر نور و تنظیم کننده های رشد گیاهی بر کالوس زایی و تجمع آنتوسیانین در کالوس های حاصل از جدا کشت های مختلف در رز گالیکا (*Rosa gallica* L.)، مجله پژوهش های گیاهی (مجله زیست شناسی ایران)، ۲۶ (۲): ۱۸۴-۱۹۵.

گودرزی، غ.ر.، پیام نور، و.، جعفری، م. و علی عرب، ع.ر. (۱۳۹۵). اثرات تنظیم کننده‌های رشد گیاهی و محیط کشت بر شاخساره‌زایی و کاهش میزان شیشه‌ای شدن محلب (*Prunus mahaleb* L.) در کشت درون شیشه‌ای، دو فصلنامه علمی-پژوهشی تحقیقات ژنتیک و اصلاح گیاهان مرتعی و جنگلی ایران، ۲۴ (۱): ۱-۱۲.

سازمند، م. و صفر نژاد، ع. (۱۳۹۵). القای کالوس، باززایی و پرآوری زرشک بی دانه (*Berberis vulgaris*) در شرایط درون شیشه ای، دو فصلنامه علمی-پژوهشی تحقیقات ژنتیک و اصلاح گیاهان مرتعی و جنگلی ایران، ۲۴ (۱): ۹۲-۱۰۱.

مقیمی، ز. و صفرنژاد، ع. (۱۳۹۳). بررسی ریزازدیادی و میزان فلاونوئید زالزالک (*Crataegus* sp.) از طریق کشت بافت، دو فصلنامه علمی-پژوهشی تحقیقات ژنتیک و اصلاح گیاهان مرتعی و جنگلی ایران، ۲۲ (۲): ۱۸۱-۱۹۱.

ویشلقی، ن.، جلالی جواران، م. و معینی، ا. (۱۳۸۹). باززایی رز مینیاتوری هفت رنگ (*Rosa hybrida* cv 'Tanbakeda') از جنین های سوماتیکی، مجله علوم باغبانی ایران (علوم کشاورزی ایران)، ۴۱ (۴): ۳۴۷-۳۵۷.

Avilés, F., Ríos, D., González, R. and Sánchez-Olate, M. (2009). Effect of culture medium in callogenesis from adult walnut leaves (*Juglans regia* L.), Chilean Journal of Agricultural Research, 69 (3): 460-467.

Bajaj, Y.P.S., Furmanowa, M. and Olszowska, O. (1988). Biotechnology of micropropagation of medicinal and aromatic plants. In: Bajaj Y P S (Ed.). Springer-Verlag, New York, 68 p.

Cördük, N. and Aki, C. (2011). Inhibition of browning problem during micropropagation of Sideritis trojana, an endemic medicinal herb of Turkey. Romanian Biotechnological Letters, 16: 6760–6765.

Declerck, V. and Korban, S.S. (1996). Influence of growth regulators and carbon sources on callus induction, growth and morphogenesis from leaf tissues of peach (*Prunus persica* L. Batsch), Journal of Horticultural Science, 71 (1): 49-55.

Dixon, R.N. and Gonzales, R.A. (1996). Plant cell culture: A practical Approach, Oxford University Press, 362 p.

Hooker, M.P. and Nabors, M.W. (1977). Callus initiation, growth and organogenesis in sugarbeet (*Beta vulgaris* L.), Z. Pflanzenphysiol, 84: 237-246.

Isikalan, C., Akbas, F., Namli, S. and Basaran, D. (2010). Adventitious shoot development from leaf and stem explants of *Amygdalus communis* L. cv. Yaltinski, Plant Omics Journal, 3 (3):92-96.

Mastelić, J., Jerković, I. and Mesić, M. (2006). Volatile constituents from flowers, leaves, bark and wood of *Prunus mahaleb* L., Flavour and Fragrance Journal, 21 (2): 306-313.

Peer, F.A., Rather, Z.A., Mir, M.A., Bhat, K.M., Dar, K.R. and Hussain, G. (2012). Callus induction and adventitious shoot regeneration in two genotypes of sweet cherry (*Prunus avium*), The Indian Journal of Agriculture Sciences, 82 (9): 737-741.

Ram, M., Prasad, K.V., Kumar, S., Singh, S.K., Arora, A. and Kumar, S. (2011). Induction of anthocyanin pigments in callus cultures of *Rosa hybrida* L. in response to sucrose and ammonical nitrogen levels. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 104: 171–179.

Sakurai, M., Ozeki, Y. and Mori, T. (1997). Induction of anthocyanin accumulation in rose suspension-cultured cells by conditioned medium of strawberry suspension cultures, Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 50 (3): 211-214.

Salehi Shanjani, P. (2003). Nitrogen Effect on Callus Induction and Plant Regeneration of *Juniperus excels*, International Journal of Agriculture & Biology. 5 (4): 419-422.

Taxus baccata L. Food Technology and Biotechnology, 40 (4): 299-303.

Tarrahi, R. and Rezanejad, F. (2013). Callogenesis and production of anthocyanin and chlorophyll in callus cultures of vegetative and floral explants in *Rosa gallica* and *Rosa hybrida* (Rosaceae), Turkish Journal of Botany, 37: 1-10.

Vijay, S., Virk, G.S. and Nagpal, A. (2010). Effect of explant type and different plant growth regulators on callus induction and plantlet regeneration in *Citrus jambhiri* Lush, Environment & We an Intternational Journal of Science & Technology, 5: 97-106.

Scragg, A.H. (1986). The economics of mass cell culture. In: Morris P, Scragg AH, Stafford A, Fowler MW. (Eds) Secondary metabolism in plant cell cultures. Cambridge University Press, Cambridge, 202p.

Shekhar Kumar, R., Joshi, C. and Kumar Nailwal, T. (2016). Callus induction and plant regeneration from leaf explants of apple (*Pyrus malus* L.) cv. golden delicious, nternational Journal of Current Microbiology and Applied Sciences, 5 (2): 502 – 510.

Snjezana, M., Bjedov, I., Kovac, M., Levanic, D.L. and Jejaska, S. 2002. Effect of explant source and growth regulators on in vitro callus growth of

Journal of Medicinal Plants Biotechnology

Vol 3, No 1, Spring & Summer 2017

Callus induction and regeneration of *C. mahaleb* from leaf segment

Gholam Reza Goodarzi[1*], Fatemeh Ahmadloo[2]

1*- Assistant Professor, Research Division of Natural Resources, Markazi Agricultural and Natural Resources Research and Education Center, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Arak, I.R. Iran. goodarzi44@yahoo.com

2- Assistant Professor, Forest Research Division, Research Institute of Forests and Rangelands, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO),Tehran, I.R. Iran.

Abstract

Cerasus mahaleb L. is a member of the Rosaceae family that have been used in different industries as pharmaceutical, packaging, dyeing, chemical, sanitary, food, and perfume. For callus induction, Leaf pieces (0.5–1.0 cm^2) produced by plantlets after surface sterilization in MS medium containing 2, 4-D at concentration of 0, 0.25, 0.5, 1, 2, and 3 mg l^{-1} and BAP at concentration of 0, 0.5, and 1 mg l^{-1}, placed in a growth chamber under dark conditions. In the next step, the calli were transferred to culture medium supplemented with growth regulators of BAP, TDZ, and KIN and NAA in different concentrations for regeneration and then characteristics of callus induction (%), callus diameter (mm), callus type, and callus color was recorded. 100% callusing with the greatest diameter and friable and globular in texture with cream to light green in color were observed on MS medium at concentration of 2 mg l^{-1} 2, 4-D in combination with 1 mg l^{-1} BAP. Calli showed no regeneration due to brown in color and highly soft and watery in texture.

Keywords: Growth regulators, In vitro culture, *Cerasus mahaleb* L., MS culture medium, Callus type