زیست فناوری گیاهان دارویی
سال اول، شماره اول، بهار ۱۳۹٤

بررسی کالوس‌زایی از پوسته دانه گیاه "به" (*Cydonia oblonga* Mill.) با روش لایه نازک سلولی

سیده نرگس موسوی[۱]، مریم جعفرخانی کرمانی*[۲]، بهرام ملکی زنجانی[۳]، طاهره حسنلو[۴] و حمید عبداللهی[۵]

تاریخ دریافت: ۹۳/۹/۲۵ تاریخ پذیرش: ۹۴/۲/۲۰

چکیده

گیاه "به" (*Cydonia oblonga* Mill.) به عنوان یک گیاه دارویی شناخته می‌شود. علاوه بر خواص زیاد میوه و برگ‌های این درخت، دانه "به" دارای ارزش بالایی می‌باشد. دانه به غنی از پکتین است که در اثر خیساندن یا جوشاندن با آب به صورت موسیلاژ که مصارف دارویی و صنعتی دارد از سلول‌های اپیدرم پوشش دانه به بیرون ترشح می‌شود. تولید صنعتی موسیلاژ از پوسته دانه "به" و کاربرد آن به صورت وسیع در دنیا بررسی نشده است. در پژوهش حاضر برای اولین بار القای کالوس از پنج ژنوتیپ مختلف "به" و با استفاده از ریزنمونه‌های پوسته دانه که به روش لایه نازک سلولی(TCL) تهیه شدند، در تیمار با غلظت‌های مختلف از تنظیم کننده‌های رشد گیاهی (صفر، ۵، ۱۰ و ۲۰ میلی گرم در لیتر) 2,4-D در ترکیب با غلظت ۱/۸ میلی‌گرم در لیتر NAA در قالب طرح کاملا تصادفی روی محیط کشت پایه MS بررسی شد. نتایج نشان داد که سلول های اپیدرمی پوسته دانه "به" زنده بوده و توانایی تولید کالوس را دارند. بیشترین میزان کالوس‌زایی(۶۶/۶۷درصد) و بزرگترین اندازه کالوس‌ها(۲۶/۵میلی متر مربع) در ژنوتیپ KVD3 و در محیط کشت حاوی ۵میلی‌گرم 2,4-D در ترکیب با غلظت ۱/۸ میلی‌گرم در لیتر NAA مشاهده شد.

واژگان کلیدی: به دانه،کشت بافت، لایه نازک سلولی، گیاهان دارویی

[۱] دانش‌آموخته کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشگاه زنجان، زنجان
[۲] دانشیار بخش کشت بافت و انتقال ژن، پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی ایران، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج
m.j.kermani@abrii.ac.ir
[۳] دانشیار گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی دانشگاه زنجان، زنجان
[۴] استادیار بخش فیزیولوژی مولکولی، پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی ایران، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج
[۵] دانشیار بخش باغبانی، موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر، کرج

مقدمه

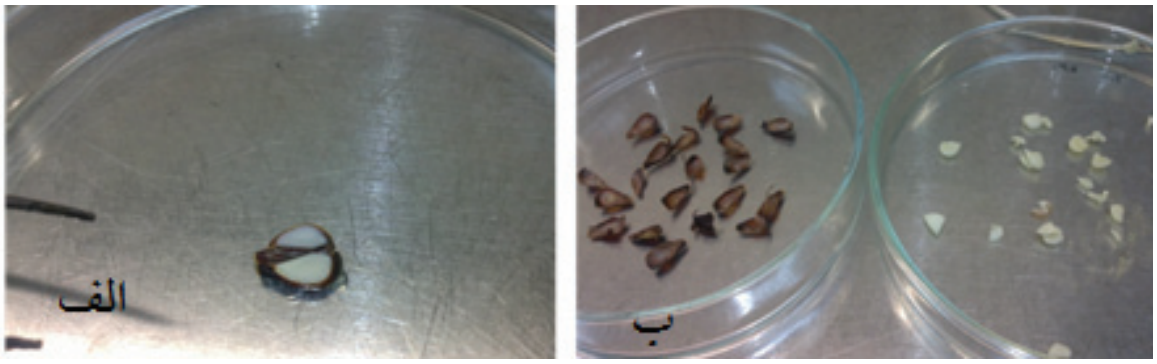
درخت "به" *Cydonia oblonga* Mill. ، تنها گونه گیاهی جنس *Cydonia*، گیاهی متعلق به خانواده Rosaceae، می‌باشد (Postman, 2009). این گیاه با آب و هوای گرم و مدیترانه‌ای سازگاری دارد(Lim, 2012). گیاه "به" سومین عضو مهم و اقتصادی درختان میوه دانه دار که نسبت به دیگر درختان معتدله، درختی کم توقع است(Sabeti, 1996). این درخت در ایران به صورت وحشی درجنگل‌های شمال کشور ازآستارا تا کتول گرگان پراکنش داشته و به صورت باغی بطور عمده در استان‌هایی نظیر اصفهان، خراسان، قزوین، تهران و اردبیل کاشته‌می‌شود (خرم دل آزاد و همکاران، ۱۳۸۹). موسیلاژی که از سلول‌های اپیدرمی پوشش دانه این گیاه به بیرون ترشح می‌شود کاربردهای زیادی در صنایع مختلف از جمله صنایع غذایی و صنایع بهداشتی دارد و از دوران باستان از آن برای بهبود گلو درد و بیماری‌های تنفسی استفاده می‌شود (آزادبخت، ۱۳۸۷ Nikoofar et al., 2013; Lim, 2012;). کشت بافت و سلول‌های گیاهی در محیط‌کشت حاوی مواد مغذی، به عنوان منبع تامین‌کننده مواد ارزشمند و باززایی از آن‌ها، از کاربردهای بیوتکنولوژی می‌باشد و به عنوان روشی برای کاهش هزینه‌های تولید این مواد با ارزش گزارش شده‌است به عنوان مثال استخراج تاکسول از گیاه سرخدار توسط وانسری و همکاران(۲۰۰۴) گزارش شده‌است. در گزارش‌های موجود در گیاهان زیادی به منظور تولید متابولیت‌های ثانویه در آزمایشگاه از روش‌های مختلف کشت بافت استفاده شده‌است (Bestoso et al., 2006; Gaosheng and Jingming, 2012). در گیاه "به" عمدتا به منظور کالوس‌زایی و باززایی از ریزنمونه‌های برگ استفاده شده‌است (Morini et al., 2000; Bellocchi et al., 2001; Fisichella et al., 2000). در اکثر مطالعات برای القای کالوس‌زایی در گیاهان مختلف از هورمون 2,4-D در غلظت‌های مختلف استفاده شده است (خیاط‌زاده وهمکاران ،۱۳۹۰؛ صالحیان آقبلاغ، ۱۳۹۰؛ Mohammadi-nasab et al, 2011; Arulselvi and Krishnaveni, 2009; Morini et al, 2000). در اکثر گیاهان پاسخ ژنوتیپ‌های مختلف به باززایی و یا کالوس‌زایی متفاوت است(Gitonga et al., 2010) و از میان عوامل موثر بر موفقیت کشت بافت، ژنوتیپ مهم‌ترین فاکتور است که کارایی کشت بافت در شرایط آزمایشگاهی را تحت تاثیر قرار می‌دهد (Gandonou et al., 2005). لایه نازک سلولی[1] (TCL) به عنوان یک روش به منظور دستیابی به نوع خاصی از سلول یا یک بافت تحت شرایط کنترل شده(نور، دما، تنظیم کننده های رشد، pH، افزودنی‌های محیط‌کشت و غیره) است و استفاده از این ریزنمونه به منظور ریزازدیادی و یا تکثیر نوع خاصی از سلول مورد استفاده قرار می‌گیرد(Teixeira da Silva and Doranzski, 2014). هدف از مطالعه حاضر تعیین بهترین ژنوتیپ "به" و ترکیب هورمونی مناسب به منظور کالوس‌زایی از ریزنمونه‌های پوسته‌ی دانه به منظور دستیابی به کالوس‌های تولیدکننده‌ی موسیلاژ بود.

مواد و روش‌ها

تحقیق حاضر در بخش کشت بافت و انتقال ژن پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی ایران(ABRII) صورت پذیرفت. برای انجام کار میوه‌های پنج ژنوتیپ "به" شامل KVD1 ، KVD3، KVD4، NB2وPH2 از کلکسیون جامع ژرم‌پلاسم "به" متعلق به موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر کرج جمع آوری شد. دانه‌های سالم از داخل میوه جدا شد و از طریق

[1] Thin Cell Layer

قرار دادن در الکل ۵۰ درصد به مدت یک دقیقه و هیپوکلریت سدیم ۲/۵ درصد به مدت ۸ دقیقه و سپس سه بار شستشو با آب مقطر استریل، ضد عفونی شدند. برای تهیه ریزنمونه، دانه‌های استریل شده از وسط نصف شد و لپه‌ها و جنین از پوسته‌ی دانه جدا شدند و پوسته دانه به عوان ریزنمونه مورد استفاده قرار گرفت (شکل۱). به منظور بررسی کالوس‌زایی از محیط کشت MS(Murashige and Skoog, 1962) دارای ۳۰ گرم در لیتر ساکارز و۷ گرم در لیتر آگار و غلظت های مختلف هورمون 2,4-D (صفر، ۵، ۱۰ و ۲۰ میلی گرم در لیتر) در ترکیب با غلظت ۱/۸ میلی گرم در لیتر NAA که pH ۵/۸ تنظیم شده بود، استفاده‌شد. ریزنمونه‌ها پس از قرارگیری در محیط کشت ذکر شده برای القای کالوس‌زایی چهار هفته در تاریکی قرار گرفتند و سپس به انکوباتور با ۱۶ ساعت نور و ۸ ساعت تاریکی با دمای ۲۴ درجه سانتی‌گراد منتقل شدند و برای نگه‌داری از کالوس‌ها واکشت ریزنمونه‌ها هر ۳۰ الی ۴۰ روز انجام گرفت. یادداشت‌برداری از نمونه‌ها برای درصد کالوس‌زایی و اندازه کالوس‌ها در هفته هشتم بعد از کشت انجام گرفت. آزمایش به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملا تصادفی با ۳ تکرار انجام شد و تجزیه و تحلیل داده‌ها با نرم افزار آماری SAS انجام شد.



شکل ۱: تهیه ریزنمونه. برش دانه(الف) و جدا کردن پوسته دانه به عنوان ریزنمونه(ب)

نتایج و بحث

نتایج حاصل از تجزیه واریانس نشان داد که اختلاف معنی‌داری در ژنوتیپ‌های مختلف و غلظت‌های مختلف هورمون 2,4-D در ترکیب با غلظت ۱/۸ میلی‌گرم در لیتر NAA بر درصد کالوس‌زایی و اندازه کالوس‌ها در سطح احتمال یک درصد وجود داشت و همچنین اثر متقابل نیز برای هر دو صفت در سطح احتمال ۵ درصد معنی‌دار بود (جدول۱). نتایج مقایسه میانگین‌ها با آزمون دانکن نشان داد که کالوس‌زایی در تیمارهای هورمونی کاملا تحت تاثیر ژنوتیپ است و ژنوتیپ KVD3 در تیمار هورمونی ۵ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D در ترکیب با غلظت ۱/۸ میلی‌گرم در لیتر NAA بیشترین میزان کالوس‌زایی(۶۶/۶۷ درصد) و بزرگترین اندازه کالوس‌ها(۲۶/۵ میلیمتر مربع) را تولید نمود (شکل۳).

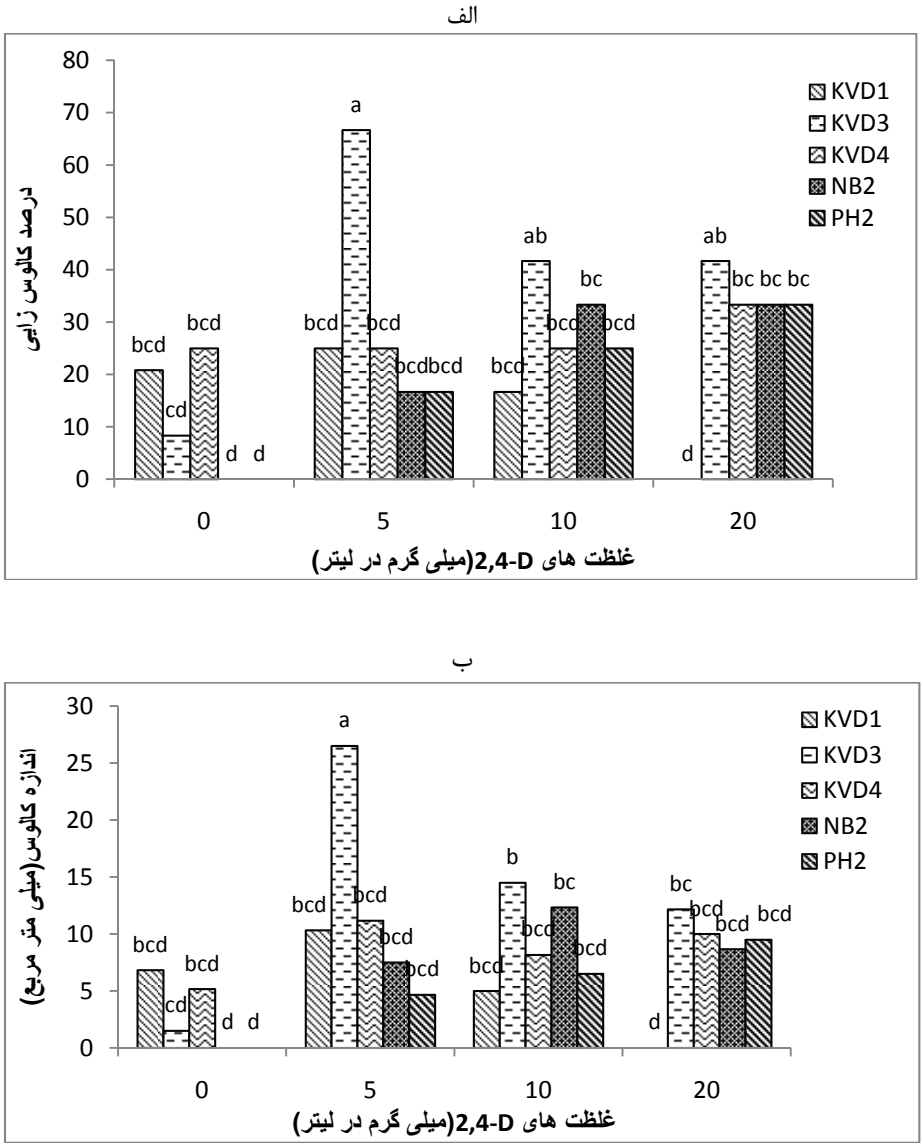
جدول ۱ : نتایج تجزیه واریانس اثر ژنوتیپ و غلظت های مختلف 2,4-D بر میزان کالوس‌زایی و اندازه کالوس‌ها

منابع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات	
		درصد کالوس‌زایی	اندازه کالوس
ژنوتیپ (A)	۴	۲۱۵۶/۲۵ **	۲۴۸/۰۱ **
غلظت 2,4-D (B)	۳	۲۴۶۳/۵۴**	۴۶۰/۴۹ **
A×B	۱۲	۱۱۳۵/۴۲ *	۱۴۴/۷۴ *
خطای آزمایش	۴۰	۵۲۱/۸۷	۷۳/۴۶
ضریب تغییرات		۸۸/۸۵	۹۷/۱

** اختلاف معنی دار در سطح ۱٪، * اختلاف معنی دار در سطح ۵٪، ns عدم وجود اختلاف معنی‌دار

شکل ۲: کالوس‌های تولید شده در تیمارهای مختلف هورمونی

گونه‌های مختلف، ارقام درون گونه‌ای و اندام‌های مختلف یک گیاه، به یک روش کشت بافت واکنش یکسان نشان نمی‌دهند (خیاط‌زاده و همکاران،۱۳۹۰). در گیاه "به" نیز برای ریزنمونه مشابه از نظر سن و ترکیب تنظیم‌کننده‌های رشد کاملا مشابه، ظرفیت تولید کالوس و باززایی از گیاه کاملا به ژنوتیپ بستگی دارد (Bellocchi et al., 2001). کاربرد تنظیم‌کننده‌های رشد خارجی با فعال‌سازی بیان ژن، سبب افزایش تقسیم سلولی می‌شود و غلظت و ترکیب تنظیم‌کننده‌های رشد تعیین کننده پاسخ ریزنمونه‌های کشت شده با نشان دادن واکنش‌های موفولوژیک است. همچنین استفاده از چند اکسین در محیط کشت سبب بهبود پاسخگویی ریزنمونه به تیمارجهت تولید کالوس می‌شود (گوران و همکاران, ۱۳۹۳). در تحقیق حاضر نیز در اکثر ژنوتیپ‌ها کالوس‌زایی در همه تیمارهای هورمونی اتفاق افتاده‌است. محمدی نصب و همکاران (۲۰۱۱) نیز برای کالوس‌زایی از ریزنمونه‌های هیپوکوتیل گیاه یونجه با استفاده از روش TCL، از هورمون 2,4-D و کینتین در غلظت‌های (صفر، ۰/۵، ۱، ۱/۵، ۲ میلی‌گرم در لیتر) استفاده کردند و کالوس‌زایی در تمام تیمارهای هورمونی مشاهده کردند. مورینی و همکاران (۲۰۰۰) کالوس‌زایی از نمونه‌های برگ "به" با استفاده از غلظت‌های ۲/۵ و ۵ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D در محیط کشت MS را بررسی کردند و گزارش نمودند که با افزایش غلظت اکسین، کالوس‌زایی افزایش می‌یابد.



شکل ۳: مقایسه میانگین‌های درصد کالوس زایی(الف) و اندازه کالوس‌ها(ب) ژنوتیپهای مختلف در غلظت‌های مختلف2,4-D

نتایج حاصل از این تحقیق نشان میدهد که امکان کالوس‌زایی از پوسته دانه "به" به منظور دستیابی به کالوس‌های حاصل از سلول‌های تولید کننده موسیلاژ وجود دارد. می‌توان با ارزیابی این کالوس‌ها امکان استحصال موسیلاژ از کالوس را مورد مطالعه قرار داد.

منابع

آزادبخت، م . (۱۳۷۸). رده‌بندی گیاهان دارویی. موسسه فرهنگی انتشاراتی تیمورزاده. ۱۲۵-۱۲۹.

خرم دل آزاد، م.، عبداللهی، ح.، قاسمی، ا. و حاج منصور، ش. (۱۳۸۹). انتقال پذیری نشانگرهای SSR سیب، به ژنوتیپ های به (*Cydonia oblonga* Mill.). مجله به‌نژادی نهال و بذر. ۲۶(۴):۴۶۷-۴۵۱.

خیاط زاده، م. ، نباتی احمدی، د. ، رجبی معماری، ح. و عبداللهی، م. (۱۳۹۰). بهینه سازی کالوسزایی و باززایی در دو رقم اسفناج با استفاده از سه ریزنمونه ی مختلف. مجله فن آوری زیستی در کشاورزی. ۲ : ۱۶-۹.

صالحیان آقبلاغ، ح. ،بابائیان جلودار، ن.ع. ، رنجبر، غ.ع. و باقری، ن.ع. (۱۳۹۱). بررسی اثر تنظیم کننده های رشد روی کالوسزایی و باززایی چند رقم برنج. پژوهشنامه اصلاح گیاهان زارعی. ۱۰(۴):۹۳-۸۰.

گوران، ع.، جیرانی، م.، حیات الغیبی، س.م. و مظفری، ع.ا. (۱۳۹۳). القای کالوس از ریشه انگور (*Vitis vinifera* L.) در شرایط درون شیشه ای. ۱۴۰۷-۱۴۰۹. مقالات هفتمین همایش ملی یافته های پژوهشی کشاورزی. ۲۴و ۲۵ اردیبهشت ماه ۱۳۹۳. دانشگاه کردستان، سنندج.

Arulselvi, I. P. and Krishnaveni, S. (2009). Effect of hormones, explants and genotypes in in vitro culturing of sorghum. Journal of Biochemical Technology. 1(4):96-103.

Bellocchi, G. D'Onofrio, C. Morini, S. (2001). Effect of long-term in vitro shoot culture of somatic embryogenesis of quince leaves treated with different light qualities. In Vitro Cellular and Developmental Biology – Plant Journal. 37:767-772.

Bestoso, F. Ottaggio, L. Armirotti, A. Balbi, A. Damonte, G. Degan, P. Mazzei, M. Cavalli, F. Ledda, B. Miele, M. (2006). In vitro cell cultures obtained from different explants of *Corylus avellana* produce Taxol and taxanes. BioMed Central Biotechnology Journal. 6(45).

Fisichella, M., Silvi, E., Morini, S., (2000). Regeneration of somatic embryos and roots from quince leaves cultured on media with different macro element composition. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 63:101-107.

Gandonou, Ch., Errabii, T., Abrini, J., Idaomar, M., Chibi, F., Skali Senhaji, N. (2005). Effect of genotype on callus induction and plant regeneration from leaf explants of sugarcane (*Saccharum* sp.). African Journal of Biotechnology. 4(11): 1250-1255

Gaosheng, H., and Jingming, J. (2012). Production of useful secondary metabolites through regulation of biosynthetic pathway in cell and tissue suspension culture of medicinal plants. pp:197-210. In: Recent Advances in Plant in vitro Culture.

Gitonga, L. N., Gichuki, S. T., Ngamau, K., Muigai, A. W. T., Kahangi, E. M., Wasilwa, L. A., Wepukhulu, S., Njogu, N. (2010). Effect of explants type, source and genotype on in vitro shoot regeneration in Macadamia (*Macadamia* spp.). Journal of Agricultural Biotechnology and Sustainable Development. 2(7):129-135.

Lim, T. K., (2012). *Cydonia oblonga*. pp 371-379. In: Edible medicinal and non-medicinal plants. Vol 4, Fruits. Springer Science.

Mohammadi-Nasab, A., Motallebi-Azar, A., Movafeghi, A., Dadpour, M. (2011). Callus induction and embryogenesis of Alfalfa (*Medicago sativa* L.) using hypocotyl Thin Cell Layer culture. Russian Agricultural Sciences. 37(4): 303-306.

Morini, S., D'Onofrio, C., Bellocchi, G., Fisichella, M, (2000). Effect of 2,4-D and light quality on callus production and differentiation from in vitro cultured

quince leaves. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 63:47-55.

Nikoofar, E., Hojjatoleslami, M., Shariaty, M. A. (2013). Surveying the effect of quince seed mucilage as a fat replacer on texture and physicochemical properties of semi fat set yoghurt. International Journal of Farming and Allied Sciences. 2(20):861-865.

Postman, J. (2009). *Cydonia oblonga:* The unappreciated quince. 28th International Horticulture Conference in Lisboa, Portugal. (available at: http:// www.ars.usda.gov/pwa/corvallis/ncgr).

Sabeti, H. (1996). Iranian Forests, Trees and Shrubs. Publications of Agricultural and Natural Resources Organization, Tehran, Iran. 810 pp. (in Persian).

Teixeira da Silva, J. A., and Dobra´nszki, J. (2014). Dissecting the concept of the Thin Cell Layer: theoretical basis. Journal of Plant Growth Regulators. 33:881-895.

Vanisree, M. Lee, C. Lo, S. Nalawade, S. Lin, C. Tsay, H. (2004). Studies on the production of some important secondary metabolites from medicinal plants by plant tissue cultures. Botanical Bulletin of *Academia Sinica.* 45:1-22.