زیست فناوری گیاهان دارویی
سال اول، شماره دوم، تابستان ۱۳۹٤

بهینه‌سازی کالوس‌زایی و باززایی گیاه دارویی سنبل‌الطیب (*Valeriana officinalis* L.)

مصطفی حسین‌آبادی[۱]، علی‌اشرف مهرابی[۲]، علیرضا اطمینان[۳] و بهمن فاضلی نسب[*۴]

تاریخ دریافت: ۹۳/۸/۲۵ تاریخ پذیرش: ۹۴/۳/۶

چکیده

در این آزمایش اثرات دو هورمون اکسین و سیتوکینین بر روند کالوس‌زایی و باززایی گیاه دارویی سنبل‌الطیب بررسی شد. بذرهای دو ژنوتیپ سنبل‌الطیب در آزمایشی به‌صورت فاکتوریل با سه فاکتور ژنوتیپ، ریزنمونه و محیط کشت در قالب طرح کاملاً تصادفی ارزیابی شدند. در آزمایش کالوس‌زایی، بیشترین حجم کالوس در سطح 2-4-D، به میزان ۲ میلی‌گرم در لیتر برای ژنوتیپ اصفهان و مدت زمان مورد نیاز کمتر جهت کالوس‌دهی برای ریزنمونه‌های ریشه‌ای و مریستمی و ژنوتیپ همدان به دست آمد. با بررسی میانگین سلول‌های شمارش شده در هر میلی‌لیتر از محیط، در کشت سوسپانسیون سلولی، ریزنمونه مریستمی و ژنوتیپ اصفهان میانگین بالاتری نشان داده و هورمون‌های NAA و 2-4-D سهم اساسی را در این بین داشته که اثر هورمون 2-4-D بیشتر بود. با توجه به تعداد کالوس‌های باز زا شده در هر پتری‌دیش، مشخص شد که کالوس حاصل از ریزنمونه مریستمی و ژنوتیپ اصفهان باززایی بیشتری نشان دادند. نتایج پژوهش نشان داد که در کشت بافت سنبل‌الطیب، بهترین کالوس‌دهی در ریزنمونه‌ی ریشه‌ای با حضور 2-4-D، به میزان ۲ میلی گرم در لیتر ، بیشترین باززایی جهت ساقه‌دهی از ترکیب هورمونیNAA به مقدار نیم‌میلی گرم در لیتر، BAP به مقدار ۲ میلی گرم در لیتر و نیز ریشه‌دهی مناسب در واکشت‌های متوالی در محیط پایه‌ی MS فاقد تنظیم کننده‌ی رشدی و همچنین میانگین بالای تعداد سلول‌های شمارش‌شده مربوط به سلول‌های ریزنمونه‌های مریستمی، با حضور هورمون2-4-D به مقدار ۲ میلی گرم در لیتر بوده است.

واژگان کلیدی: باززایی، سنبل‌الطیب، کالوس‌زایی

[۱] کارشناس ارشد اصلاح نباتات دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرمانشاه
[۲] دانشیار گروه زراعت و اصلاح نباتات دانشگاه ایلام
[۳] کارشناس ارشد اصلاح نباتات دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرمانشاه
[*٤] عضو هیئت‌علمی پژوهشکده زیست فناوری کشاورزی و پژوهشکده کشاورزی دانشگاه زابل Bfazeli@uoz.ac.ir

مقدمه

سنبل‌الطیب از جنس *Valeriana*، خانواده Valerianaceae، راسته Dipsacales، رده گل‌داران و شاخه دانه‌داران با نام *Valeriana officinalis* بوده که اسم Valerius از اسم شخصی که برای اولین بار این گیاه را در اهداف پزشکی به کار برد مشتق شده است (Safaralie et al. 2008). این گیاه دست‌کم ۲۰۰۰ سال است که در طب سنتی مورد استفاده قرارگرفته و در مورد چندین گونه از آن اثرات آرام‌بخشی گزارش شده است (Pickering, 1879). اولین بار در اواخر قرن ۱۶ میلادی از این گیاه به عنوان داروی بیماری صرع استفاده و متعاقباً از اثرگذاری آن برای درمان انواع اختلالات عصبی گزارش شده است (Benigni et al., 1971; Hobbs, 1989). گیاه‌شناسان متعددی خواصی از قبیل؛ ضد تشنج، دافع کرم روده‌ای، مدر، معرق و تنظیم‌کننده دوران قاعدگی را به سنبل‌الطیب نسبت داده‌اند و همچنین گفته شده که این گیاه برای هیستری نیز مفید است (Upton et al. 1999; Woodvile, 1810).

قسمت‌های مورد استفاده سنبل‌الطیب، ریزوم و ریشه‌های افشان به دلیل دارا بودن آمیدون، تانن، گلوکز، املاح مختلف، عطرمایه، اسید والرنیک (اسید والرینک نرمال)، فرمیک، اسید استیک، اسید پروپیونیک، والرنول، والرنال، استوکسی والرانون، والرنیل استات، بورنیل استات، E-کاریوفیلن، الو-ارومادنرن، اسپاتولنول، کسان، اپی-α-کادینول و منگنز است که به‌صورت متصل به ریزوم، در بازار عرضه می‌شوند (Baranauskiene, 2007; Boyadzhiev et al., 2004).

از کشت بافت گیاهی به منظور تکثیر سریع، نگهداری گیاهان دارویی کمیاب در معرض خطر نابودی و انقراض استفاده شده و حتی به یک ابزار بسیار قدرتمندی جهت تکثیر بسیاری از گونه‌های گیاهی دیگر تبدیل‌شده است. تکثیر گیاهان دارویی از طریق کشت بافت به سه روش؛ کشت جوانه‌های انتهایی و جانبی، القاء و تشکیل مریستم نابجا روی ریزنمونه‌های مختلف مثل برگ، قطعات ساقه، ریشه و غیره و القای رویان‌زایی رویشی صورت می‌گیرد (Raghavan, 1980; Rani et al., 2003). ضمناً دانشمندان توجه بسیار زیادی به این گونه‌های گیاهی و مکانیسم‌های موجود برای سنتز دارو از آن‌ها دارند (Hanumanaika and Venkatarangaiah, 2008).

یکی از زمینه‌های بیوتکنولوژی گیاهی که بسیار مورد توجه قرارگرفته است، توانایی کشت سلولی گیاهان در بیوترانسفرماسیون یک ماده پیش‌ساز فراوان و ارزان قیمت به یک فرآورده نهایی بسیار ارزشمند است. بیوترانسفرماسیون والنسن (Valencane) به نوتکاتون (Nootkatone) در سوسپانسیون سلولی مرکبات در یک فرآیند دو مرحله‌ای، با استفاده از کشت سلولی ۶۶ درصد ماده‌ی اولیه به فرآورده نهایی تبدیل شده است (Chawla, 2003).

گیاه سنبل‌الطیب از طریق دانه یا ریشه‌های جوانه-دار، در اراضی نسبتاً مرطوب و قابل نفوذ رشد می‌کند اما تکثیر این گیاه به‌صورت کشت بذر، طولانی و زمان‌بر هست لذا استفاده از فن‌های کشت بافت این امید را می‌دهد که بتوان تکثیر و تولید این گیاه را در زمان کوتاهی تحقق بخشید لذا هدف از این تحقیق، بهینه‌سازی کالوس‌زایی و باززایی گیاه دارویی سنبل‌الطیب است.

مواد و روش‌ها

دو توده بذری گیاه سنبل‌الطیب، یکی از شرکت پاکان بذر اصفهان و دیگری از مرکز تحقیقات همدان تهیه و جهت ضد عفونی سطحی، ابتدا بذور را آبکشی و سپس به مدت ۲ دقیقه در ظرف محتوی الکل ۷۰ درجه قرار گرفتند. پس از شستشو با آب مقطر به مدت ۱۶ دقیقه تحت تیمار هیپوکلریت سدیم ۲/۵ درصد قرار گرفتند و سپس جهت از بین بردن اثر هیپوکلریت

سدیم، تحت شرایط استریل و در زیر دستگاه لامینار فلو با آب مقطر استریل سه بار آبکشی و سپس با اطمینان از حذف هیپو کلریت سدیم، بذور جهت جوانه‌زنی، به محیط کشت MS با غلظت ۲۰ گرم در لیتر ساکارز و ۰/۸ درصد آگار (با pH ۵/۶ تا ۵/۸) در ظروف شیشه‌ایی درب‌دار به مقدار ۲۵ میلی‌لیتر منتقل و سپس محیط کشت‌های مذکور در اتاقک رشد با درجه حرارت ۲۵ ±۱ ^{o}C و دوره‌های نوری ۸ ساعت تاریکی و ۱۶ ساعت روشنایی نگهداری شدند. بعد از ۵ تا ۷ روز بذور جوانه زدند. از گیاه‌چه‌های ۳۵ روزه جهت تهیه ریزنمونه (مریستم، ریشه، ساقه و برگ) به ابعاد ۱-۰/۵ سانتی‌متر استفاده شد.

ریزنمونه‌ها جهت کال‌زایی به محیط کشت MS با ترکیبات اضافی از 2-4-D و کینتین در ظروف پتری‌دیش و در هر ظرف ۴ عدد ریزنمونه کشت و آزمایش به صورت فاکتوریل با ۳ فاکتور در قالب طرح پایه کاملاً تصادفی انجام و فاکتورها شامل ژنوتیپ (اصفهان و همدان)، ریزنمونه (برگ، مریستم، ساقه و ریشه) و محیط کشت (محیط کشت اول: MS بعلاوه ۰/۱KIN و 2-4-D ۲$^{mg}/_{l}$ و دوم: MS بعلاوه ۰/۱KIN و 2-4-D ۵ $^{mg}/_{l}$) بودند.

کالوس‌های حاصل از آزمایش انجام شده را به کمک پنس استریل از داخل پتری‌دیش‌ها بیرون آورده و پس از انتقال به روی کاغذ صافی واتمن و با استفاده از تیغه جراحی اطراف قطعات کالوس را تراشیده و از قسمت ترد و فعال در حال رشد کالوس به‌منظور تأمین نمونه زنده سلولی، نمونه‌ای از کالوس به وزن ۳۵۰-۶۰۰ میلی‌گرم در داخل ۳۰ سی‌سی از محیط کشت مایع قرار داده شدند. در این آزمایش از دو محیط کشت ۱/۵$^{mg}/_{l}$NAA، ۰/۵BAP و 2-4-D ۲$^{mg}/_{l}$، ۰/۵BAP و دو ژنوتیپ (اصفهان و همدان) و کالوس‌هایی با منشأ (برگ، مریستم، ساقه و ریشه) استفاده شد. سپس نمونه‌ها به داخل شیکر انکوباتور منتقل و در دور ۱۰۰ دور در دقیقه تنظیم گردید. ۱۰-۷ روز پس از شروع کشت نخستین، واکشت تهیه و سپس جهت تعیین سرعت رشد، وزن‌تر و خشک سلول‌ها و تعداد سلول‌ها شمارش شد.

کالوس‌های به‌دست‌آمده از مرحله بالا به محیط باززایی منتقل و آزمایش به‌صورت فاکتوریل در ۳ سطح و در قالب طرح کاملاً تصادفی انجام شد. فاکتورها شامل دو توده گیاهی (اصفهانی و همدانی) و ریزنمونه‌ی کالوسی (برگی، مریستمی، ساقه و ریشه) و چهار نوع محیط کشت باززایی (محیط اول BAP ۱$^{mg}/_{l}$ و ۰/۱NAA، محیط دوم BAP ۲$^{mg}/_{l}$ و ۰/۱NAA، محیط سوم BAP ۱$^{mg}/_{l}$ و ۰/۵NAA و محیط چهارم BAP ۲$^{mg}/_{l}$ و ۰/۱NAA) هست.

جهت شاخه‌زایی، کالوس‌ها به ظروف پتری‌دیش دارای محیط شاخه‌زایی منتقل و به مدت ۲ تا ۳ هفته نگهداری شدند تا ساقه‌ها تشکیل شوند. سپس ساقه‌ها به محیط کشت MS فاقد تنظیم‌کننده رشد انتقال و پس از تشکیل ۳ تا ۵ برگ جهت تشکیل ریشه به محیط حاوی IBA ۲$^{mg}/_{l}$ انتقال داده شد تا میزان ریشه‌دهی نیز بررسی شود.

جهت تعیین اثر تیمارها، داده‌های به‌دست‌آمده تجزیه آماری شدند. کلیه آزمایش‌ها به صورت فاکتوریل و در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۳ تکرار برای هر نمونه صورت گرفت. چون داده‌ها به‌صورت درصد بوده و توزیع نرمال نداشتند، قبل از آنالیز آماری تبدیل داده‌ها انجام گرفت تا توزیع داده‌ها نرمال شوند. پس از تجزیه واریانس، مقایسه میانگین‌ها به روش آزمون چند دامنه‌ای دانکن و با استفاده از نرم‌افزارهای MSTATC و SAS صورت گرفت و برای تهیه هیستوگرام از برنامه EXCEL استفاده شد.

نتایج و بحث

کالوس‌زایی

از بررسی مقایسه میانگین صفت حجم کالوس مشخص شد که بین ژنوتیپ‌های اصفهان و همدان اختلاف معنی‌داری وجود داشت بطوریکه ریزنمونه‌های برگرفته از بذور جوانه‌زده‌ی ژنوتیپ اصفهان، حجم

کالوس بیشتر و اختلاف معنی‌داری را نسبت به میانگین حجم کالوس برآورد شده برای ژنوتیپ همدان نشان دادند (جدول ۱).

بین ریزنمونه‌های برگرفته از برگ، مریستم، ساقه و ریشه برای صفت میانگین روز تا کالوس‌دهی اختلاف معنی‌داری مشاهده‌شده بطوریکه ریزنمونه‌های ریشه‌ای و مریستمی مدت زمان کمتر و سرعت بالای جهت کالوس‌دهی نسبت به ریزنمونه‌های ساقه و برگی نیاز داشتند (جدول ۱). ضمناً کالوس‌دهی در مدت زمان کالوس‌دهی و نوع ریزنمونه در تولید کالوس در گیاهان مختلف متفاوت می‌باشد به همین منظور است که برای هر گیاه باید تیمار هورمونی و نوع ریزنمونه را جهت بهترین القاء کالوس و باززایی مناسب به دست آورد بطوریکه سلطانی پول و همکاران (۱۳۹۰) برای القای کالوس در گیاه دارویی بادرنجبویه بهترین تیمار هورمونی مربوط به استفاده از ۱ میلی‌گرم در لیتر 2, 4-D به همراه ۱ میلی‌گرم در لیتر هورمونBAP برای ریزنمونه میان گره و دم برگ در شرایط روشنایی گزارش دادند همچنین پس از این تیمار، استفاده از ریزنمونه برگی با تیمار هورمونی ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر هورمون 2, 4-D، به همراه ۱ میلی‌گرم در لیتر هورمون BAP، در شرایط تاریکی و سپس نور، تیمار پر بازده‌ای گزارش شد. موافقی و همکاران (۱۳۸۷) بهترین کالوس را در گیاه کور از هیپوکوتیل و کرمی و همکاران (۱۳۹۱) نیز بهترین کالوس در گیاه لوبیا از هیپوکوتیل، خیاط زاده و همکاران (۱۳۹۰) بهترین کالوس را در گیاه اسفناج از ریزنمونه برگ، احمدی و همکاران (۱۳۹۱) بهترین کالوس را در گیاه پروانش از ریزنمونه برگی، آرخی و همکاران (۱۳۹۱) بالاترین درصد کالوس‌زایی (۹۸) درصد در قطعات جدا کشت ریشه در غلظت‌های ۱ و ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر هورمون‌های 2, 4-D و کینتین و امینی و همکاران (۱۳۹۲) بهترین کالوس را در گیاه *Salsola arbuscula* pall. از ریزنمونه‌های ریشه به دست آوردند.

از مقایسه‌ی میانگین ریزنمونه‌ها بر اساس حجم کالوس مشخص شد ریزنمونه‌های برگی و ریشه‌ای دارای بیشترین میزان حجم کالوس نسبت به سایر ریزنمونه‌ها بودند (جدول ۱).

مقایسه میانگین ریزنمونه‌ها با توجه به غلظت تنظیم کننده‌های رشدی به کار رفته، واکنش‌های متفاوتی از خود نشان دادند (شکل ۱ و جدول ۱). در ضمن بین محیط‌های کشت اول (0.1KIN, 2mg/l2-4-D) و دوم (0.1KIN, 5 mg/l 2-4-D) نسبت به صفت روز تا کالوس‌دهی اختلاف معنی‌داری مشاهده شد (جدول ۱).

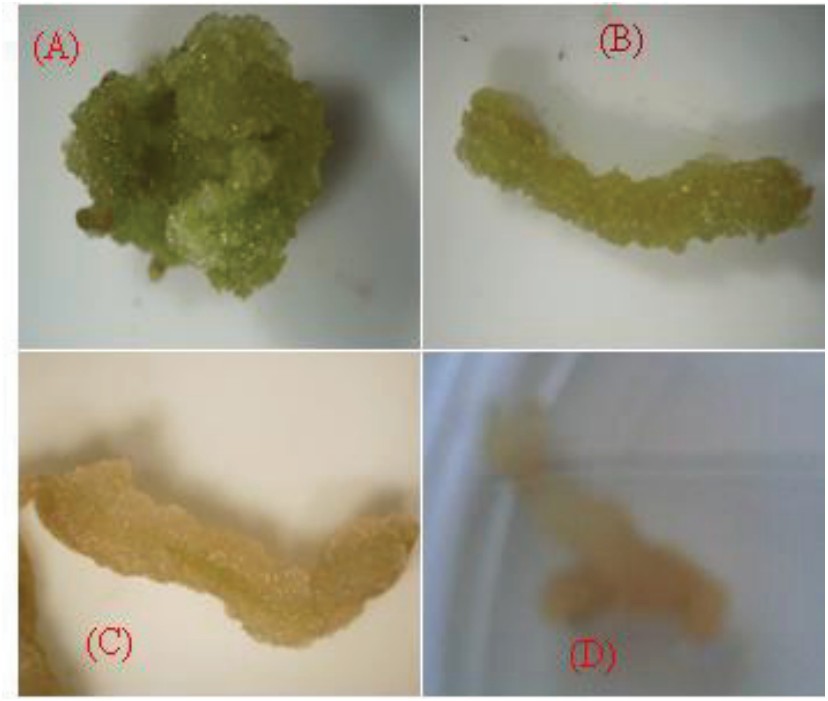
برای صفت میانگین روز تا کالوس‌دهی مشخص شد که محیط دوم (0.1KIN, 5 mg/l2-4-D) میانگین روز تا کالوس‌دهی کمتری نسبت به محیط اول (0.1KIN, 2 mg/l2-4-D) دارد، بنابراین در محیط دوم مدت زمان کمتر نسبت به محیط اول برای به کالوس رفتن ریزنمونه‌ها زمان نیاز است (جدول ۱). ازنظر میزان حجم کالوس که بر اساس مقیاس حجمی هوکر و نی-برز ارزیابی شده بودند نیز اختلاف معنی‌داری بین محیط کشت‌ها وجود داشت. محیط اول اختلاف معنی‌داری با محیط دوم داشت به‌طوری‌که محیط دوم دارای بهترین میانگین برای حجم کالوس بود و چون میزان هورمون KIN در هر دو محیط یکسان بوده پس اختلاف فقط در سطح هورمون 2-4-D بوده و بیشترین حجم کالوس نیز در سطح 2mg/l به دست آمد (جدول ۱). با علم به اینکه هورمون 2-4-D فقط تا میزان خاصی هورمون رشد بوده و از آن میزان بالاتر اثر معکوس دارد بنابراین نتایج این تحقیق مؤید این مطلب خواهد بود (Fazelienasab et al., 2004). ضمناً صفت میانگین روز تا کالوس‌دهی هر دو ژنوتیپ اصفهان و همدان اختلاف معنی‌داری از خود نشان دادند بطوریکه ریزنمونه‌های برگرفته‌شده از بذور جوانه‌زده‌ی ژنوتیپ همدان مدت زمان کمتری را برای به کالوس‌دهی نسبت به ریزنمونه‌های ژنوتیپ اصفهان نیاز داشتند (جدول ۱).

نتایج این تحقیق با مطالعات ارائه شده توسط رانی و همکاران (Rani et al., 2003) کـه القـای کـالوس در گیاه *Withania somnifera* L. را بررسی و کـالوس-زایی را از ۳ ریزنمونه هیپوکوتیل، ریشه و کوتیلدون در محیط کشت MS همراه با غلظت‌های متفـاوت 2-4-D و Kin تهیه و ۱۰۰٪ کالوس‌زایی در ریزنمونه‌های ریشه و بـرگ در غلظـت 2-4-D ۲mg/l +Kin ۰/۲mg/l + MS بـه دسـت آمـد مشـابهت داشـت و همچنـین در تحقیـــق دیگـــر (Radhakrishnan and Ranjithakumari, 2007) اثـر تنظـیم‌کننـده‌هـای رشدی Kin, BAP, IBA, 2-4-D و NAA بر کـالوس-زایی گیاه سویا بررسی و بهترین کالوس‌زایی از ترکیـب دو تنظیم کننده رشـدی 2-4-D و BAP مشـاهده و از طرفی یانـگ و همکـاران (Yeung et al., 1981) کـه 2,4-D را در غلظت‌های ۲ mg/l -۰/۵ به‌عنوان یکـی از اکسین‌های مهم تحریک‌کننـده کـالوس‌زایـی در گیـاه *Leonurus heterophylus* معرفـی نمـوده بودنـد مشابهت داشت.

جدول ۱- مقایسه میانگین‌ها (به روش دانکن در سطح احتمال ۵ درصد) برای صفات، میانگین روز تا کالوس‌دهی، درصد کالوس‌دهی و حجم کالوس

منابع تغییرات (S. O. V)	میانگین روز تا کالوس‌دهی	درصد کالوس‌دهی	حجم کالوس
0.1KIN, 2 mg/l 2-4-D	۲۱/۹۳۷a	۸۳/۲a	۱۹/۱۱۸a
0.1KIN, 5 mg/l 2-4-D	۱۸/۲۲۲b	۷۷/۱۷۶b	۱۶/۳۷۷b
ژنوتیپ اصفهان	۲۱/۹۳۷a	۸۳/۲a	۱۹/۱۱۸a
ژنوتیپ همدان	۱۸/۲۲b	۷۷/۱۷b	۱۶/۳۷۷b
ریزنمونه برگی	۲۰/۸۸۸a	۸۵/۰۹۲a	۱۸/۲۸a
ریزنمونه ساقه	۲۰/۲۹۴a	۷۶/۲۷۵c	۱۵/۱۵۱b
ریزنمونه مریستم	۱۹/۳۵۲b	۸۱/۹۱۱b	۱۷/۲۹۹a
ریزنمونه ریشه	۱۹/۲۵b	۷۶/۲۵c	۲۰/۰۴۱a
0.1KIN, 2 mg/l 2-4-D × ژنوتیپ اصفهان	۲۱/۹۳۷۵±۱/۵۰۱۳a	۸۳/۲۰۳۱±۱۵/۲۰۷a	۱۹/۱۱۸۷±۵/۸۱۸a
0.1KIN, 5 mg/l 2-4-D × ژنوتیپ همدان	۱۸/۲۲۲±۱/۷۷۴۶b	۷۷/۵۵۱۷±۱۴/۵۵۱b	۱۶/۳۷۷±۱/۴۱۷۹b
0.1KIN, 2 mg/l 2-4-D × برگ	۲۲/۳۷۵±۱/۰۶۰۶b	۹۰/۴۱۶±۱۴/۸۴۷bc	۲۰/۵۹۸±۰/۸۷۶b
0.1KIN, 2 mg/l 2-4-D × ساقه	۲۲/۶۲۵±۱/۵۰۵b	۷۴/۵۸۳±۱۳/۷۹۳cd	۱۵/۳۹±۱/۹۹۱e
0.1KIN, 2 mg/l 2-4-D × مریستم	۳۷/۲۲±۱/۳۰۲a	۸۰/۳۱۲±۱۵/۴۹۴b	۱۸/۳۷±۱/۱۹۴c
0.1KIN, 2 mg/l 2-4-D × ریشه	۲۰/۳۷۵±۱/۰۶۰۶c	۸۷/۵±۱۴/۰۸۵c	۲۲/۱۱۶±۱۰/۶۹۸a
0.1KIN, 5 mg/l 2-4-D × برگ	۱۹/۷±۲/۲۶۳cd	۸۰/۸۳۳±۹/۴۶۰f	۱۶/۴۲۹±۰/۶۶۹d
0.1KIN, 5 mg/l 2-4-D × ساقه	۱۸/۲۲±۰/۶۶۶d	۷۷/۷۷۷±۱۷/۴۳۰a	۱۴/۹۳۸±۰/۵۳۶e
0.1KIN, 5 mg/l 2,4-D × مریستم	۱۶/۶۶±۱/۰۰e	۸۳/۳۳۲±۱۱/۹۰۲e	۱۶/۳۴۷±۱/۴۲۴d
0.1KIN, 5 mg/l 2-4-D × ریشه	۱۸/۱۲۵±۱/۱۲۵۹d	۶۵±۱۴/۰۲۸c	۱۷/۹۶۵±۱/۱۳۲cd
اثر ژنوتیپ اصفهان × ریزنمونه برگی	۲۲/۳۷۵±۱/۰۶۰a	۹۰/۴۱۶±۱۴/۸۴۷b	۲۰/۵۹۸±۰/۸۷۶b
اثر ژنوتیپ اصفهان × ریزنمونه ساقه‌ای	۲۲/۶۲۵±۱/۵۰۵a	۷۴/۵۸±۱۳/۷۹۳c	۱۵/۳۹±۱/۹۹۱e
اثر ژنوتیپ اصفهان × ریزنمونه مریستم	۲۲/۳۷۵±۱/۳۰۲a	۸۰/۳۱±۱۵/۴۹۴b	۱۸/۳۷±۱/۱۹۴c
اثر ژنوتیپ اصفهان × ریزنمونه ریشه‌ای	۲۰/۳۷۵±۱/۰۶۰b	۸۷/۵±۱۴/۰۸۵bc	۲۲/۱۱۶±۱۰/۶۹۸a
اثر ژنوتیپ همدان × ریزنمونه برگی	۱۹/۷±۲/۲۶۳b	۸۰/۸۳۳±۹/۴۶۰e	۱۶/۴۲۹±۰/۶۶۹d
اثر ژنوتیپ همدان × ریزنمونه ساقه‌ای	۱۸/۲۲±۰/۶۶c	۷۷/۷۷±۱۷/۴۳۰a	۱۴/۹۳۸±۰/۵۳۶e
اثر ژنوتیپ همدان × ریزنمونه مریستم	۱۶/۶۶±۱/۰۰d	۸۳/۳۳۲±۱۱/۹۰۲d	۱۶/۳۴۷±۱/۴۲۴d
اثر ژنوتیپ همدان × ریزنمونه ریشه	۱۸/۱۲۵±۱/۱۲۵c	۶۵±۱۴/۰۲۸bc	۱۷/۹۶۵±۱/۱۳۲c
0.1KIN, 2 mg/l 2-4-D × ژنوتیپ اصفهان × برگ	۲۲/۳۷۵±۱/۰۶۰a	۹۰/۴۱۶±۱۴/۸۴۷bc	۲۰/۵۹۸±۰/۸۷۶b
0.1KIN,2 mg/l 2-4-D × ژنوتیپ اصفهان × ساقه	۲۲/۶۲۵±۱/۵۰۵a	۷۴/۵۸۳±۱۳/۷۹۳d	۱۵/۳۹±۱/۹۹۱e

0.1KIN, 2 mg/l2-4-D × ژنوتیپ اصفهان × مریستم	۲۲/۳۷۵±۱/۳۰۲a	۸۰/۳۱۲±۱۵/۴۹۴b	۱۸/۳۷±۱/۱۹۴c
0.1KIN, 2 mg/l2-4-D × ژنوتیپ اصفهان × ریشه	۲۰/۳۷۵±۱/۰۶۰b	۸۷/۵±۱۴/۰۸۵c	۲۲/۱۱۶±۱۰/۶۹۸a
0.1KIN, 5 mg/l2-4-D × ژنوتیپ همدان × برگ	۱۹/۷±۲/۲۶۳b	۸۰/۸۳۳±۹/۴۶۰f	۱۶/۴۲۹±۰/۶۶۹d
0.1KIN, 5 mg/l2,4-D × ژنوتیپ همدان × ساقه	۱۸/۲۲۲±۰/۶۶۶c	۷۷/۷۷±۱۷/۴۳a	۱۴/۹۳۸±۰/۵۳۶e
0.1KIN, 5 mg/l2-4-D × ژنوتیپ همدان × مریستم	۱۶/۶۶±۱/۰۰d	۸۳/۳۳۲±۱۱/۹۰۲e	۱۶/۳۴۷±۱/۴۲۴d
0.1KIN, 5 mg/l2-4-D × ژنوتیپ همدان × ریشه	۱۸/۱۲۵±۱/۱۲۵c	۶۵±۱۴/۰۲۸c	۱۷/۹۶۵±۱۱/۳۲c



شکل ۱- کالوس‌زایی در محیط MS بعلاوه (۰/۱ mg/l Kin+ ۲ mg/l 2,4-D) از ریزنمونه‌های برگ (A)، مریستم (B)، ساقه (C) و ریشه (D)

باززایی

از مقایسه میانگین، صفت میانگین تعداد کالوس جوانه‌زده در هر پتری مشخص‌شده که بین محیط کشت، ژنوتیپ، ریزنمونه و اثر متقابل محیط کشت در ژنوتیپ اختلاف معنی‌داری وجود دارد. در ضمن در صفت میانگین درصد باززایی بین محیط‌های کشت، ژنوتیپ‌ها، ریزنمونه‌های کشت شده و اثر متقابل محیط کشت و ژنوتیپ نیز اختلاف معنی‌داری بود (جدول ۲ و شکل ۲). این نتایج با گزارش خیاط زاده و همکاران (۱۳۹۰) که کالوس‌زایی و باززایی را در دو رقم اسفناج موردبررسی قرار داده بودند و ارقام نیز اختلاف معنی‌داری ازلحاظ کالوس‌زایی داشتند مشابهت داشت.

اختلاف صفات میانگین روز تا اولین جوانه‌زنی بین فاکتورهای محیط کشت، ژنوتیپ، ریزنمونه، اثر متقابل محیط کشت در ژنوتیپ، اثر متقابل محیط کشت در ریزنمونه و اثر متقابل سه جانبه‌ی محیط کشت در ژنوتیپ در ریزنمونه معنی‌دار و اختلاف صفات میانگین تعداد شاخه‌ی فرعی بین فاکتورهای محیط‌های کشت و ژنوتیپ‌های مورداستفاده و همچنین اختلاف صفات میانگین مجموع طول ساقه‌ها بین فاکتورهای محیط‌های کشت و ژنوتیپ مورد استفاده نیز معنی‌داری بود. اختلاف صفات میانگین مجموع برگ‌ها بین فاکتورهای محیط کشت‌ها، ژنوتیپ‌ها و اثر متقابل محیط کشت و ژنوتیپ و همچنین اختلاف صفات میانگین مجموع طول ریشه‌ها در بین فاکتور محیط‌های کشت معنی‌داری بودند. اختلاف صفات میانگین وزن‌تر کل گیاه‌چه بین فاکتورهای محیط‌های

کشت، ژنوتیپ‌ها، ریزنمونه‌ها و اثرات متقابل دوجانبه‌ی محیط کشت در ژنوتیپ، محیط کشت در ریزنمونه، ژنوتیپ در ریزنمونه و اثر سه جانبه‌ی محیط کشت در ژنوتیپ در ریزنمونه معنی‌داری بود (جدول ۲).

اختلاف صفات میانگین تعداد کالوس بازا شده بین فاکتور محیط‌های کشت معنی‌دار بطوریکه محیط کشت (2BAP, 0.5$^{mg}/_{l}$NAA) میانگین تعداد کالوس بازا شده بیشتری نسبت به سایر محیط‌ها از خود نشان داد (شکل ۲) که با نتایج ارائه‌شده توسط کرمی و همکاران(۱۳۹۱) بیشترین بازایی را در ۲ میلی‌گرم در لیتر BAP و ۰/۴ میلی‌گرم در لیتر 2, 4-D در لوبیا گزارش دادند مشابهت داشت.

میانگین تعداد کالوس جوانه‌زده برای اثر ساده‌ی ژنوتیپ‌ها معنی‌دار بطوریکه ژنوتیپ اصفهان نسبت به ژنوتیپ همدان دارای میانگین تعداد کالوس جوانه‌زده‌ی بیشتری بود (شکل ۳). همچنین اختلاف صفات میانگین‌های تعداد کالوس جوانه‌زده بین ریزنمونه‌های کالوسی کشت شده در محیط بازایی معنی‌دار بطوریکه کالوس‌هایی که از ریزنمونه‌های برگی، مریستمی و ساقه‌ای گرفته شده بودند میانگین تعداد کالوس جوانه‌زده‌ی بیشتری نسبت به کالوس‌هایی با منشأ ریشه‌ای داشتند (شکل ۴).

فاکتور اثر متقابل محیط کشت در ژنوتیپ برای صفت میانگین تعداد کالوس جوانه‌زده، معنی‌دار بطوریکه در محیط(2BAP, 0.5$^{mg}/_{l}$NAA) بیشترین میانگین تعداد کالوس جوانه‌زده به دست آمد که با نتایج شرفی و همکاران (۱۳۸۷) مشابهت داشت در ضمن در همین محیط ژنوتیپ اصفهان نسبت به ژنوتیپ همدان دارای بیشترین میانگین تعداد کالوس جوانه‌زده بود (شکل ۵).

اختلاف صفات میانگین درصد بازایی بین محیط‌های کشت معنی‌دار بطوریکه محیط کشت (2BAP: 0.5$^{mg}/_{l}$NAA) دارای بیشترین درصد بازایی نسبت به سایر محیط‌ها بود (شکل ۶) که با نتایج چن و همکاران (Chen et al., 2000) مشابهت داشت همچنین اختلاف درصد بازایی نیز در بین ژنوتیپ‌های مورداستفاده معنی‌دار، بطوریکه ژنوتیپ اصفهان دارای درصد بازایی بالایی نسبت به ژنوتیپ همدان (شکل ۷) و همچنین اختلاف درصد بازایی بین ریزنمونه‌های مورد استفاده معنی‌دار و ریزنمونه‌ی مریستمی دارای بیشترین درصد بازایی و ریزنمونه ریشه‌ای کمترین درصد بازایی نسبت به سایر ریزنمونه‌ها از خود نشان دادند (شکل ۸).

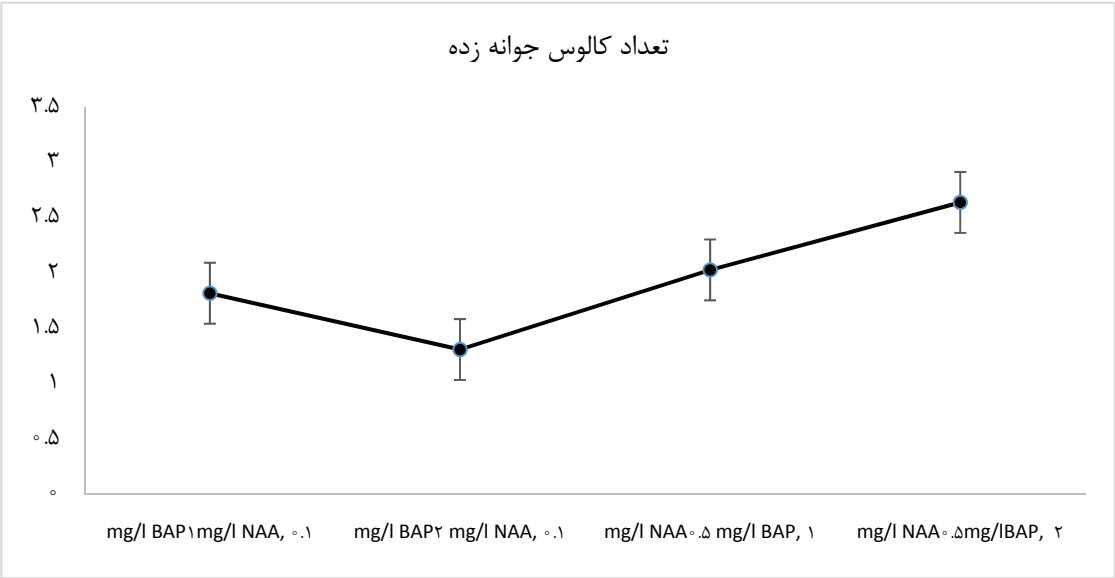
از بررسی نتایج تحقیقات انجام‌شده درزمینه‌ی بازایی مشخص شد که در تحقیقی BAP همراه با یک تنظیم‌کننده رشدی اکسینی، همانند NAA در غلظت کم می‌تواند سرعت رشد سلولی را افزایش داده و بالاترین میزان بازایی و تشکیل گیاه‌چه را نشان می‌دهد و همچنین در گزارشی (Uozumi et al., 1996) با افزودن NAA -۰/۱mg/l به همراه BAP- ۱۰ mg/l به محیط بازایی و محیط کشت بهینه جهت بازایی گیاه آجوگا ارائه و همچنین بیشترین بازایی و ساقه‌دهی در گیاه لوبیا (Ahmed et al., 2002) و کلزا (Zhang et al., 2006) را در محیط کشت mg/l ۱+MS NAA mg/l BAP ۰/۱ گزارش شده است که این تحقیقات با نتایج به‌دست‌آمده در این تحقیق مشابهت داشت.

جدول ۲- تجزیه واریانس، صفات ارزیابی شده بر روی کالوس‌های کشت شده در محیط باززایی

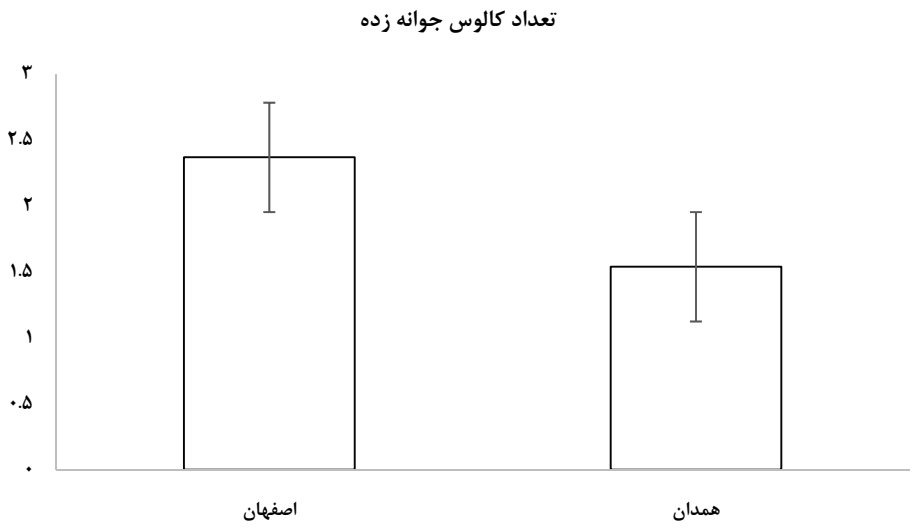
منابع تغییر (S. O. V)	درجه آزادی	میانگین تعداد کالوس جوانه‌زده	میانگین درصد باززایی	میانگین روز تا اولین جوانه‌زنی	میانگین تعداد شاخه فرعی
محیط کشت	۳	۷/۳۷۵**	۳۰۴۷/۶۴۳**	۶/۲۲۲**	۱/۳۴۶۹**
ژنوتیپ	۱	۱۶/۶۶۶**	۱۵۸۴/۴۵۶*	۶۳۳/۸۱۳**	۱/۰۲۰۹**
ریزنمونه	۳	۲/۴۰۲**	۱۳۴۸/۶۰۶**	۳۰/۳۲۲**	۰/۱۵۵۵ns
محیط کشت × ژنوتیپ	۳	۲/۰۵۵**	۹۹۲/۴۴۵**	۷/۹۵۳**	۰/۰۶۵ns
محیط کشت × ریزنمونه	۹	۰/۵۱۳ns	۳۶۰/۷۹ns	۱/۹۹۱*	۰/۲۳۱*
ژنوتیپ × ریزنمونه	۳	۰/۱۹۴ns	۷۳/۵۵۵ns	۲/۰۷۸*	۰/۱۱۵ns
محیط کشت× ژنوتیپ× ریزنمونه	۹	۰/۰۶۴ns	۵۱/۱۳ns	۲/۴۴۴**	۰/۰۹۳ns
اشتباه آزمایشی	۶۴	۰/۳۱۲۵	۲۲۶/۴۷۶	۰/۸۶۶	۰/۱۳
ضریب تغییرات (CV)		۲۷/۶۶۲	۲۸/۱۰۷	۲/۴۳۶	۱۷/۹۸۷

منابع تغییر (S. O. V)	درجه آزادی	میانگین مجموع طول ساقه‌ها	میانگین مجموع برگ‌ها	میانگین طول ریشه	میانگین وزن‌تر کل گیاه‌چه
محیط کشت	۳	۱۲/۲۷**	۵/۸۱۸**	۲/۹۲۹**	۰/۰۵۳**
ژنوتیپ	۱	۲/۲۰۸**	۱۱/۲۷۵**	۰/۰۰۰۸ns	۰/۰۳۴**
ریزنمونه	۳	۰/۷۱۸ns	۰/۵۲۱ns	۰/۲۱۸*	۰/۰۵۳**
محیط کشت × ژنوتیپ	۳	۰/۵۳۳ns	۱/۱۳۹*	۰/۰۳۹ns	۰/۰۲۲**
محیط کشت × ریزنمونه	۹	۰/۴۳ns	۰/۲۴۲ns	۰/۱۱۵ns	۰/۰۱۱**
ژنوتیپ × ریزنمونه	۳	۰/۳۵۳ns	۰/۵۴۴ns	۰/۲۵۵*	۰/۰۲۱**
محیط کشت × ژنوتیپ × ریزنمونه	۹	۰/۲۹ns	۰/۱۶۷ns	۰/۳۷۹ns	۰/۰۱۳**
اشتباه آزمایشی	۶۴	۰//۳۸۵	۰/۵۱۳۱	۰/۰۹۶۲	۰/۰۰۴۱
ضریب تغییرات (CV)		۱۸/۹۵۳	۲۰/۰۹۲	۲۳/۴۵۱	۲۳/۳۰۴

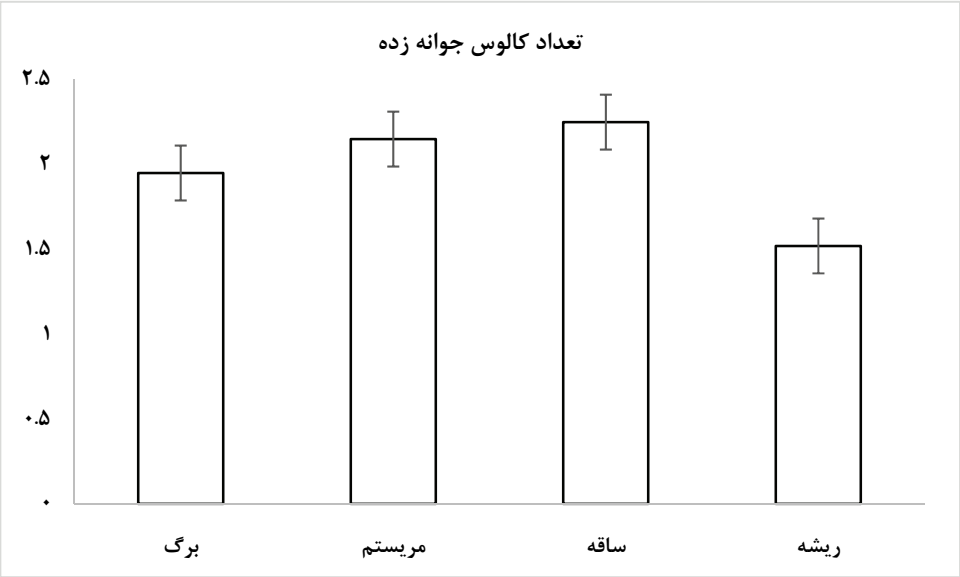
**، * و ns به ترتیب معنی‌دار در سطح ۱ و ۵ درصد و غیر معنی‌دار



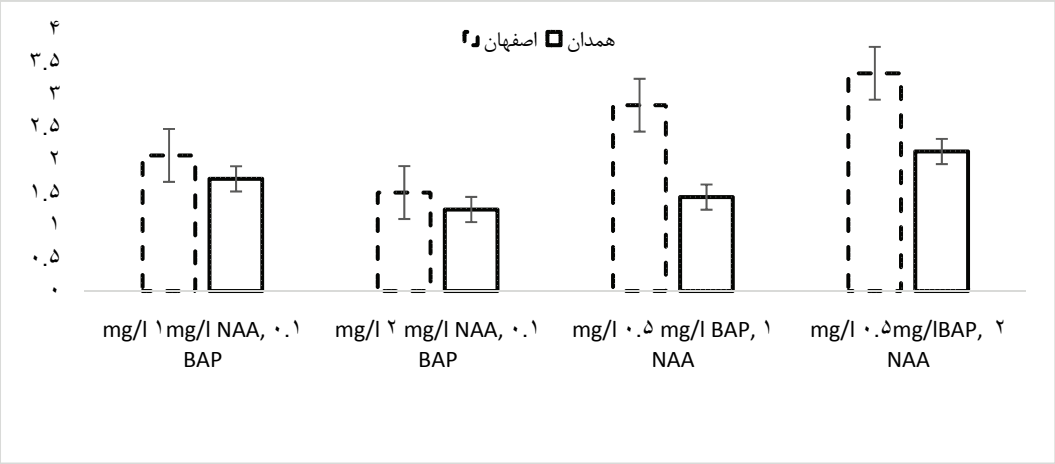
شکل ۲- مقایسه میانگین بین محیط‌های کشت برای صفت میانگین تعداد کالوس جوانه‌زده



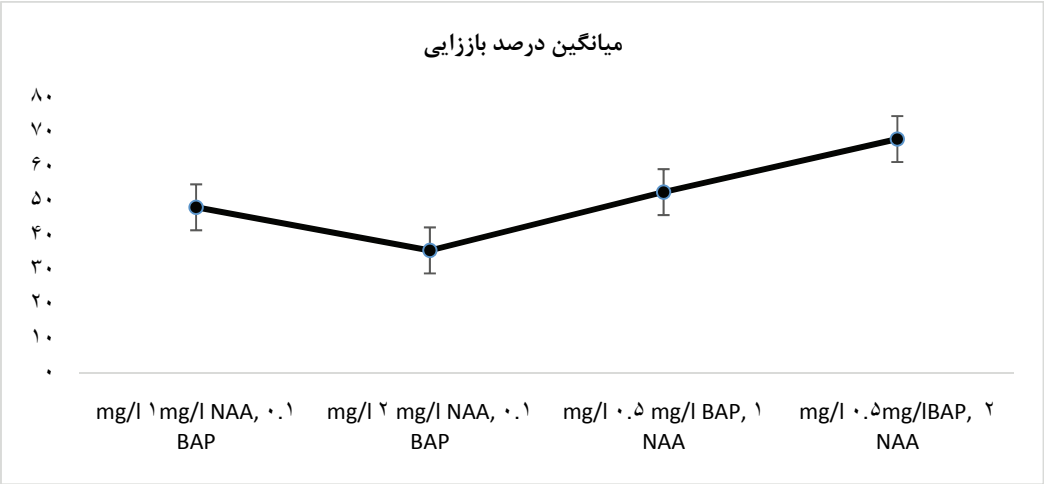
شکل ۳- مقایسه میانگین تعداد کالوس جوانه‌زده بین اثرات ساده‌ی ژنوتیپی



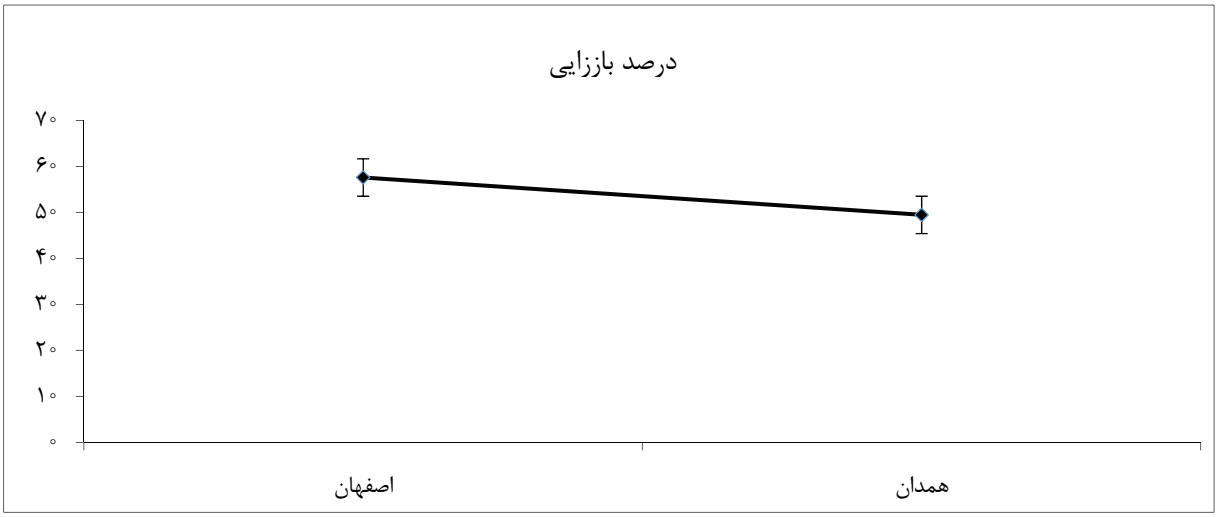
شکل ۴- مقایسه میانگین بین ریزنمونه‌ها برای صفت میانگین تعداد کالوس جوانه‌زده



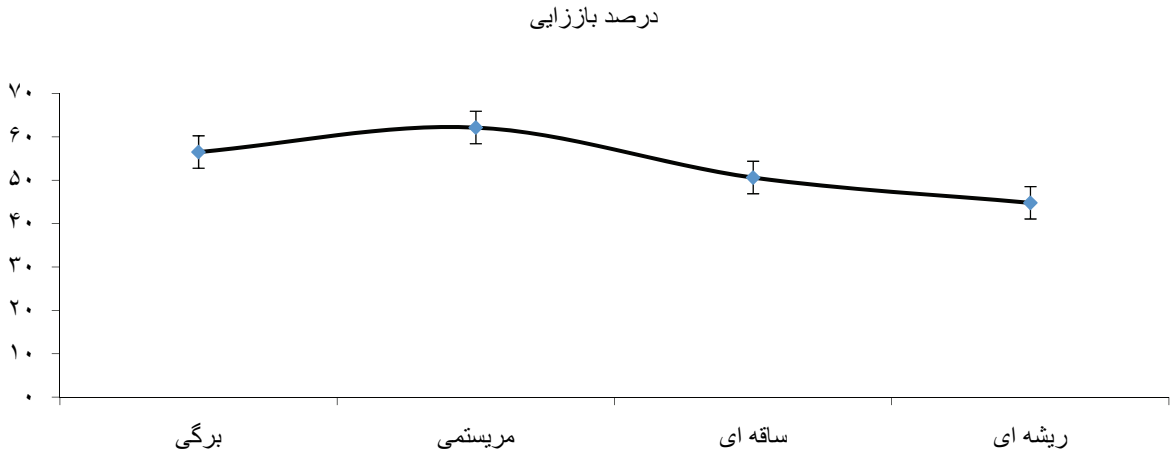
شکل ۵- مقایسه میانگین اثر متقابل ژنوتیپ در محیط کشت برای صفت میانگین تعداد کالوس جوانه‌زده



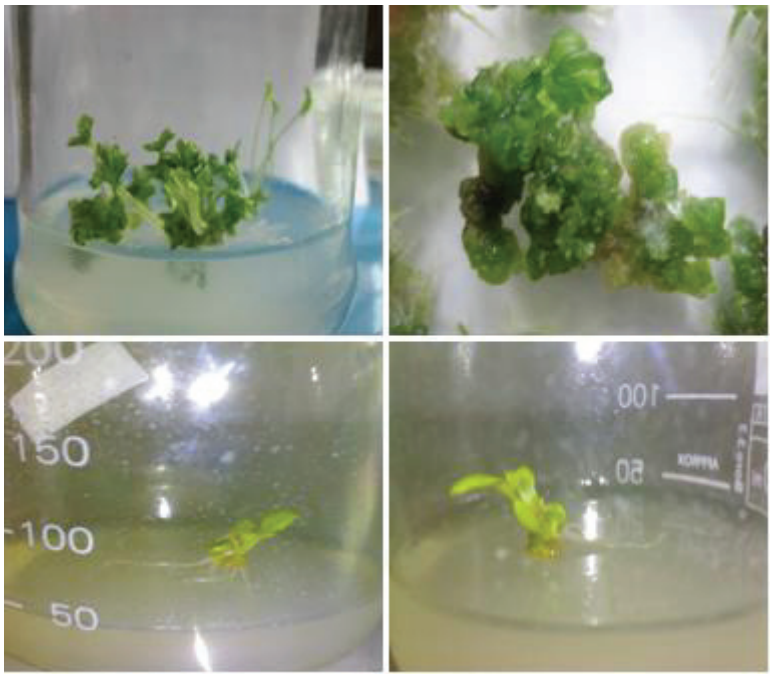
شکل ۶- مقایسه میانگین صفت درصد باززایی بین محیط‌های کشت باززا



شکل ۷- مقایسه میانگین دو ژنوتیپ همدان و اصفهان نسبت به درصد باززایی



شکل ۸- مقایسه میانگین بین ریزنمونه‌های کشت‌شده نسبت به میانگین درصد باززایی



شکل ۹- کالوس‌های باززا شده و مراحل باززایی سنبل‌الطیب در محیط باززایی

نتیجه‌گیری کلی

در مجموع نتایج این تحقیق نشان داد که در زمینه‌ی کشت بافت گیاه سنبل‌الطیب، بهترین کالوس‌دهی در ریزنمونه‌ی ریشه‌ای و بهترین محیط نیز محیط اول با وجود $2^{mg}/_{l}$2-4-D هست. در تمامی محیط کشت‌ها، بهترین کالوس‌زایی در حضور 2-4-D و kin در غلظت $0.1\ ^{mg}/_{l}$ و باززایی کالوس‌ها به سمت ساقه‌دهی در ترکیب NAA با BAP صورت پذیرفت. بهترین محیط جهت ساقه‌دهی ازنظر درصد باززایی، محیط چهارم با ترکیب هورمونی 2BAP, $0.5^{mg}/_{l}$NAA بود. باززایی به سمت ریشه‌دهی در واکشت‌های متوالی و در محیط پایه‌ی MS بدون هیچ تنظیم کننده‌ی رشدی مشاهده گردید. در جهت ایجاد محیط سوسپانسیون سلولی، NAA با 2-4-D در ترکیب با BAP در غلظت $0.5\ ^{mg}/_{l}$ بهترین و بیشترین میانگین تعداد سلول‌های شمارش شده در هر

میلی‌لیتر در محیط دوم با ترکیب هورمونی 2-4-D $2^{mg}/_{l}$ و مربوط به سلول‌های ریزنمونه‌های مریستمی بود.

با توجه به اینکه اجرای هر تحقیق نیاز به وقت، هزینه و امکانات کافی دارد و در اکثر موارد همه شرایط یکجا جمع نیستند در نتیجه همیشه کاستی‌هایی در هر تحقیق بوده و این تحقیق نیز از آن مستثنی نبوده که این کمبودها به‌صورت پیشنهاد به قرار زیر ارائه می‌گردند:

۱- بایستی از تعداد ژنوتیپ‌های بیشتری (در صورت موجود) استفاده شود تا با اطمینان محکم‌تری بتوان نتایج تحقیق را به طور عموم ارائه داد.

۲- با توجه به اینکه روزانه ترکیبات و مشتقات هورمونی جدیدتر و بیشتری جهت کالوس‌زایی، سوسپانسیون سلولی و باززایی به دست می‌آید در نتیجه لازم است از سایر ترکیبات و مشتقات نیز استفاده شود تا با مقایسه تمامی تحقیقات انجام‌شده در این زمینه، کم هزینه‌ترین و پر بازده‌ترین ترکیب انتخاب شود.

منابع:

احمدی، ج.، محمدی، ر.، گروسی، ق ع. و حسینی، ر. (۱۳۹۱). بهینه‌سازی کالوس‌زایی و سوسپانسیون سلولی پروانش (*Catharanthus roseus*). مجله بیوتکنولوژی کشاورزی ۴(۱): ۱۸-۱

آرخی، س.، اقدسی، م. و خلفی، م. (۱۳۹۱). بهینه‌سازی کشت بافت خار مریم به منظور تولید فلاونولیگنانهای دارویی. مجله پژوهش‌های تولید گیاهی ۱۹(۲): ۸۸-۶۹

امینی، ف.، قنبرزاده، ز. و عسکری مهرآبادی، م. (۱۳۹۲). بهینه‌سازی تولید کالوس و باززایی در گیاه *Salsola arbuscula* pall. مجله سلول و بافت (علمی - پژوهشی) ۴(۲): ۲۴۱-۱۲۹

خیاط زاده، م.، نباتی احمدی، د.، رجبی معماری، ح. و عبداللهی، م. ر. (۱۳۹۰). بهینه‌سازی کالوس‌زایی و باززایی در دو رقم اسفناج با استفاده از سه ریزنمونه‌ی مختلف. مجله فن‌آوری زیستی در کشاورزی، ۱۰(۲): ۸-۱

سلطانی پول، م م.، محمدی، ع.، رهنما، ح. و عباس زاده، ب. (۱۳۹۰). بررسی کال‌زایی در گیاه دارویی بادرنجبویه. مجله زراعت و اصلاح نباتات ۷(۱): ۵۴-۴۵

شرفی، ع.، هاشمی‌سهی، ه. و جورابچی، ع. (۱۳۸۷). بهینه‌سازی شرایط باززایی گیاه دارویی. مجله زیست‌شناسی ایران ۲۱(۴): ۵۷۳-۵۶۵

کرمی، م.، باقریه نجار، م ب. و اقدسی، م. (۱۳۹۱). بهینه‌سازی شرایط باززایی گیاه لوبیا (*Phaseolus vulgaris* L.). مجله زیست‌شناسی گیاهی، ۵(۱۵)۱۴-۱.

موافقی، ع.، حبیبی، ق. و علی اصغر پور، م. (۱۳۸۷). باززایی گیاه دارویی کور *Capparis spinosa* L. با استفاده از کشت قطعات هیپوکوتیل. مجله زیست‌شناسی ایران ۲۱(۲): ۱۰-۱

Ahmed, E.G., Bisztray, D. and Velich, I. (2002). Plant regeneration from seedling explants of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). Proceedings of the 7th Hungarian Congress on Plant Physiology. Acta Biologica Szegediensis 46(3-4): 27-28.

Baranauskiene, R. (2007). Essential oil composition of *Valeriana officinalis* ssp. Officinalis grown in Lhuania. Chemistry of Natural Compounds 43(3): 331-333

Benigni, R., Capra, C. and Cattorini, P. (1971). Piante Medicinali Chimica Farmacologia E Terapia. Milano: Inverni & Dela Beffa Press. 730 p.

Boyadzhiev, L., Kancheva, D., Gourdon, C. and Metcheva, D. (2004). Extraction of valerenic acids from valeriana (*Valeriana officinalis* L.) rhizomes. Pharmazie 59: 727-728.

Chawla, H.S. (2003). Introduction to Plant Biotechnology. Enfield and Plymouth: Science Publishers Inc.538 p.

Chen, D.H., Ye, H.C. and Li, G.F. (2000). Expression of a chimerical farnesyl diphophate synthase gene in *Artemisia annua* transgenic plant via *Agrobacterium tumefaciens* – mediated transformation. Plant Science 155: 179 – 185.

Fazeli-nasab, B., Omidi, M. and Amiritokaldani, M. (2004). Effects of abscisic acid on callus induction and regeneration of different wheat cultivars to mature embryo culture. The 4th International Crop Science Congress Brisbane, Australia, 26 Sep - 1 Oct ISBN 1 920842 20 9.

Hanumanaika, R.N. and Venkatarangaiah, K. (2008). Plant Regeneration from Callus Culture of *Clematis gouriana* Roxb. A Rare Medicinal Plant. Turkish Journal of Biology 32: 99-103.

Hobbs, C. (1989). Valerian: a lerature review. Herbal Gram 21: 19-34.

Murashige, T. and Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. Physiologia Plantarum, 15: 473-497.

Pickering, C. (1879). Chronological History of Plants. Boston: Little Brown. 518 p.

Radhakrishnan, R. and Ranjithakumari, B.D. (2007). Callus induction and plant regeneration of Indian Soybean (*Glycine max* (L.) Merr. Cv. CO3) via half seed explant culture. Journal of Agricultural Technology 3(2): 287-297.

American Herbal Pharmacopoeia (AHP) and Therapeutic Compendium, Post Office Box 5159, Santa Cruz, CA 95063 USA

Woodvile, W. (1810). Medical Botany. Vol. 1. 2nd ed. London: Wiliam Philips. 188p.

Yang, J., Gong, Z.C. and Tan, X. (2008). Induction of callus and extraction of alkaloid from Yi Mu Cao (*Leonurus heterophylus* Sw.). Culture African Journal of Biotechnology. 7(8): 1157-1162.

Yeung, E.C., Thorpe, T.A. and Jensen, C.J. (1981). In vitro fertilization and embryo culture. In T. A., Thorpe (Ed.), Plant Tissue Culture Methods and Application in Agriculture. New York Academic Press pp. 253-271.

Zargari, A. (1991). Medical Plants (2). Tehran University Press. pp 752-763.

Zhang, Y., Xu, J., Han, L., Wei, W., Guan, Z., Cong, L. and Chai, T. (2006). Efficient shoot regeneration and agrobacterium-mediated transformation of *Brassica juncea*. Plant Molecular Biology Reporter, 24: 255a-255i.

Zizovic, I., Stamenic, M., Ivanovic, J., Orlovic, A., Ristic, M., Djordjevic, S. and Skala, D. (2007). Supercritical carbon dioxide extraction of sesquiterpenes from valerian root. Journal of Supercritical Fluids 43 249-258.

Raghavan, V. (1980). Embryo culture. International Review of Cytology, supplement 11B. 21: 209-240.

Rani, G., Virk, G.S. Nagpal, A. (2003). Callus Induction and plantlet Regeneration in *Withania somnifera* (L.). In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant 39:468–474.

Raskin, l., Ribnicky, D.M., Komarnytsky, S., Ilic, N., Poulev, A., Borisjuk, N., Brinker, A., Moreno, D.A., Ripoll, C., Yakoby, N., O'Neal, J.M., Cornwell, T., Pastor, I. and Fridlender, B. (2002). Plants and human health in the twenty-first century. Trends in Biotechnology. 20: 522-531.

Safaralie, A., Fatemi, S. and Sefidkon, F. (2008). Essential oil composition *Valeriana officinalis* L. roots cultivated in Iran comparative analysis between supercritical CO_2 extraction and hydrodistilation. Journal of Chromatography A, 1180 159-164.

Uozumi, N., Ohtake, Y., Nakashimada, Y., Morikawa, Y., Tanaka, N. and Kobayashi, T. (1996). Efficient regeneration from GUS transformed Ajuga hairy root. Journal of Fermentation and Bioengineering. 81: 374-378.

Upton, R., Petrone, C., Swisher, D., Goldberg, A., McGuffin, M. and Pizzorno, N.D. (1999). Valerian root, *Valeriana officinalis*, Analytical, quality control and therapeutic monograph.