مجله زیست فناوری گیاهان دارویی
سال دوم، شماره چهارم، پاییز و زمستان ۱۳۹۵

بررسی تولید کالوس از ریزنمونه‌های مختلف گیاه چوغان *Salsola tragus* L.

نگار منیری راد[1*]، بهرام ملکی زنجانی[2] و علی عمارلو[3]

چکیده

گیاهان بومی اکوسیستم های بیابانی، دارای ویزگیهای منحصربفردی هستند که بقا آنها را در شرایط سخت زیستگاهی تضمین می نماید. گیاه چوغان *Salsola tragus* گیاه باستانی و بیابانی ارزشمندی است که همراه با سایر گونه‌های این جنس، علاوه بر کاربرد دارویی، قرنهای متوالی به عنوان تنها شوینده گیاهی مورد استفاده انسان قرار گرفته است. در این تحقیق ابتدا بر اساس پیمایش منطقه‌ای، و اطلاعات فولکلور محلی، گیاه هدف شناسایی، بذرگیری و سپس در شرایط گلدانی سازگار و اهلی گردید. سپس جهت مطالعه پاسخ بافت‌های مختلف گیاه به کالزایی، بذرهای این گیاه پس از برنامه استریل دو مرحله ای با الکل ۷۰ درجه به مدت ۳ دقیقه و هیپوکلریت سدیم نیم درصد به مدت ۱۰ دقیقه، در محیط کشت MS کشت گردید. پس از جوانه زنی و رشد گیاهچه، ریزنمونه‌های ریشه چه، ساقه چه و برگچه در محیط کشت فوق، با غلظت های مختلف هورمون نفتالین استیک اسید (NAA) در سه سطح صفر، ۵ و ۱۰ میلی گرم در لیتر، کشت شد. بعد از سه هفته، تشکیل کالوس‌ها مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج تحقیق نشان داد که بهترین جداکشت برای ایجاد کالوس در این گیاه، ریز نمونه برگچه و سپس ساقچه در شرایط نوری ۱۶ ساعت روشنایی با شدت ۳۰۰۰ لوکس در غلظت ۵ میلی گرم از هورمون NAA می‌باشد.

واژهای کلیدی: گیاهان دارویی، زیست فناوری، کشت بافت، هالوفیت، چوغان

۱*- کارشناس ارشد بیوتکنولوژی، فارغ التحصیل از دانشکده کشاورزی، دانشگاه زنجان، زنجان، ایران.npmr.negar@gmail.com
۲- دانشیار گروه اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زنجان، زنجان، ایران.
۳- استادیار گروه زیست فناوری، پژوهشکده فناوریهای نوین زیستی، دانشگاه زنجان، زنجان، ایران.

مقدمه

گیاهان بیابانی نقش مهمی در پویایی اکوسیستمهای خشک دارند. این گیاهان باعث ثبات خاک رویشگاه شده، موجب افزایش میزان مواد آلی خاک گردیده و با کاهش اسیدیته خاک و افزایش محتوی فسفر ریزوسفر، چرخه رشد گیاهی و جانوری را مستمر و در نتیجه در بقا سایر گونه‌های زیستی نقش ویژه‌ای دارند (La rosa et al. ,2011). چوبک یا چوغان اصطلاحی است که عموماً به گونه ای از گیاهان که خاصیت صابونی شدن و کف افزایی در محیط آبی را دارند اطلاق شده و در مناطق مختلف کشور بسته به پوشش گیاهی و اقلیم منطقه تنوع بسیاری دارند. برخی از این گیاهان از جنس Salsola بوده و عموما بعد از رسیدگی گیاه در اواخر بهار تا اواسط تابستان مورد آسیاب قرار گرفته و بصورت پودر گیاهی برای اهداف مختلف از جمله ضدعفونی سطحی و نیز شستشو مورد استفاده قرار می‌گیرند. جنس سالسولا شامل گیاهان علفی و درختچه ای از خانواده کنوپودیاسه بوده که بومی آفریقا، آسیا و اروپا می‌باشند. بیش از ۱۰۰ گونه از این جنس در دنیا شناسایی شده‌اند (Oyunbileg et al., 2011) . گونه‌های یك ساله سالسولا، عموماً در مراحل بلوغ مقاومت بالایی نسبت به شوری وخشکی خاك وعدم ثبات شرایط آب و هوایی دارند (Malcom et al., 2003; Heidari-.Sharifabadi et al., 2006) در نواحی خشك و نیمه خشك به علت کمبود آب و تعرق بالا، نمکهای محلول در خاك زیاد شده و شوری خاك افزایش می‌یابد، در نتیجه دسترسی گیاهان به آب کم می‌گردد(Mudgal et al. ,2010). پس به علت تحمل بالا نسبت به شوری، این گیاهان می‌توانند برای بهبود زمین های خشك و نیمه خشك مورد استفاده قرار گیرند. تحقیقات نشان داده است هالوفیت ها به دلیل مقاومت بالا به تنش شوری می‌توانند به عنوان منبعی جهت انتقال ژن مقاومت به تنش شوری به گیاهان غیر مقاوم جهت استفاده از زمین‌های خشک و شور مورد استفاده قرار گیرند (Malcom et al., 2003; Heidari-Sharifabadi et al., 2006). جنس سالسولا در مناطق بیابانی، ارزش علوفه مرتعی بالایی دارد (Stefaniak et al., 2003) و در برخی از مناطق روستایی استان زنجان هنوز از این گیاه به عنوان گیاه دارویی (ضدعفونی سطحی) و نیز برای اهداف شستشو و پاک کنندگی استفاده می‌شود. تحقیقات جدید محققین حاکی از وجود مقادیر متنابهی از ترکیبات صابونی در این جنس می‌باشد (Munir et al., 2014). از این خانواده در تولید برخی از شامپوها استفاده شده است .(Aghel et al., 2007) خاصیت اصلی ساپونین‌ها که در برخی از گیاهان دارویی نیز به وفور وجود دارند کاهش کشش سطحی آب است .ساپونین‌ها مواد شیمیایی هستند که در تعداد زیادی از گیاهان دیگر نیز وجود دارند و دارای خاصیت پاک کنندگی هستند. برخلاف صابون¬ها که قلیایی می‌باشند، این مواد از نظر شیمیایی خنثی بوده و به آسانی در آب کف می کنند. خاصیت پاک کنندگی آن‌ها بدین سبب است که محلول آن‌ها، می تواند با مواد رزینی یا روغنی واکنش تشکیل دهد. تمـام ساپونین‌ها شدیداً کف کرده و پاك کننده عالی هستند (Karimian and Ghasemlou., 2015). براساس تازه ترین گزارشات علمی، این گیاه یکی از گیاهان دارویی مهم بوده که کاربردهای وسیعی در داروسازی دارد. این جنس دارای مقادیر متنابهی مواد ارزشمند دارویی و نیز ترکیبات ثانویه می‌باشد (Munir et al., 2014). از برخی گونه‌ها موادی مانند آلکالوئیدها (سالسولین) استخراج می‌شود (Toderich, 2008).

بیوتکنولوژی یک روش علمی برای تولید اشکال جدید موجودات زنده یاتولید محصولات جدید توسط این موجودات است (Sharma and Dubey, 2011). با ابزارهای بیوتکنولوژی می‌توان گیاهان دارویی را تکثیر کرده و دستکاری ژنتیکی در آنها انجام داد. از این ابزارها می‌توان برای افزایش تولید متابولیت ثانویه گیاهان دارویی نیز استفاده کرد (Tripathi and Tripathi, 2003). ذخایر ژنتیکی گیاهی منبع بیولوژیکی اصلی امنیت غذایی جهان بوده و بدین دلیل حفاظت از این منابع بسیار ضروری است (Tandon et al., 2009). اخیرا پیشرفت‌های قابل توجهی در بیوتکنولوژی رخ داده است و روشهای درون شیشه‌ای

برای تکثیر بسیاری از گیاهان دارویی با موفقیت بکار گرفته شده‌اند (Sridhar and Aswath, 2014). بیوتکنولوژی ابزاری قدرتمند برای حفاظت از گیاهان است و برخی از روش‌های موجود در بیوتکنولوژی شامل ریزازدیادی، مهندسی ژنتیکی، و انتقال ژن از ضریب تاثیر زیادی در طبیعت برخوردار می‌باشند(Sharma and Dubey, 2011).

کالوس توده‌ای تماز نیافته از سلول‌هاست که در محیط کشت حاوی هورمون‌های گیاهی مناسب تشکیل می‌شود (Bhojwani and Razdan, 1966). بررسی تشکیل کالوس روی ریزنمونه‌های گیاهی نشان می‌دهد که پاسخ محیط‌های کشت بافت به تولید کالوس بسیار متفاوت است. برای تشکیل کالوس و رشد آن در گیاهان مختلف از تنظیم کننده‌های رشد و ریز نمونه‌های متفاوتی استفاده می‌شود. نوع کالوس ایجاد شده از این بافت ها بر اساس حجم، رنگ و شکنندگی بسیار متفاوت خواهد بود. بر این اساس، کالوس‌ها را می‌توان به کالوس زایی غیرجنین‌زا و جنین‌زا تقسیم کرد. کالوس‌های جنین‌زا به کالوس‌های صاف و ناصاف تقسیم می‌شوند. کالوس‌های غیرجنین‌زا اغلب آبکی و دارای سلول‌های کشیده (لاروی شکل) هستند و هسته، حجم کمی از سلول (در مقایسه با سلول‌های جنین‌زا) را اشغال کرده است، در صورتی که کالوس‌های جنین‌زا، رنگ سفیدتری (برفکی) با ساختار فشرده‌تر دارند و سلول‌های تشکیل دهنده آن‌ها کم وبیش کروی و دارای هسته به نسبت بزرگتر هستند. کالوس‌های جنین‌زا ممکن است دارای سطحی صاف یا ناصاف باشند. به طور کلی کالوس‌های غیرجنین‌زا به سختی باززا می‌شوند و اغلب در تهیه کشت‌های سوسپانسیونی و تبدیل به سلول‌های جنین زا مورد استفاده قرار می‌گیرند. کالوس‌های جنین‌زای ناصاف توانایی باززایی بیشتری نسبت به دیگر کالوس‌ها دارند (طباطبایی و امیدی، ۱۳۸۸).

تحقیقات محدودی از ریزازدیادی و نیز کالزایی در Salsolaانجام شده است. با اینحال در Salsola pestifer کالوس از جداکشت ساقه نسبت به برگ نمو بهتری داشت و در گونه S. lanata جداکشت برگ نتیجه بهتری داده است .(Stefaniak et al., .2003) با توجه به اینکه اطلاعات محدودی از گونه مورد مطالعه Salsola tragus و نیز تجربیات کشت بافت با هدف تولید انبوه ژنوتیپ های مقاومتر به شرایط شوری و تنش در آن وجود دارد، این تحقیق با رویکرد افزایش اطلاعات ریزازدیادی در این گیاه طراحی گردیده است. بدیهی است که یکی از زیرساختهای لازم برای تولید انبوه مواد پایه دارویی یا صنعتی در مقوله کشت بافت، موفقیت در تولید کالوس از بافت گیاه است. لذا در این تحقیق نحوه و نوع پاسخ ریزنمونه های مختلف گیاه مورد مطالعه به محیط های کالوس زایی بررسی گردید.

مواد و روش ها

مواد گیاهی

جهت مطالعه پاسخ بافتهای مختلف گیاه به کالزایی، بذرهای این گیاه از رویشگاههای طبیعی آن در شهرستان طارم تهیه و در ضمن مطالعات کشت بافت، در شرایط کنترل شده گلدانی کشت گردید.

ضدعفونی و تهیه محیط کشت

بذرهای بدست آمده بعد از دو مرحله استریل در الکل ۷۰ درجه به مدت ۱ دقیقه و هیپوکلریت نیم درصد به مدت ۱۰ دقیقه در محیط کشت MS (Murashig and Skog,1962) کشت گردید. بعد از دو روز، ریزنمونه‌های ریشه چه ، ساقه چه و برگچه در محیط کشت فوق با غلظت‌های مختلف هورمونی NAA در سه سطح صفر، ۵ و ۱۰ میلی گرم در لیتر، در قالب آزمایشات فاکتوریل مبتنی بر طرح پایه کاملا تصادفی در سه تکرار کشت شد.

بررسی‌های آزمایشگاهی

فراوانی کالوس‌زایی با شمارش تعداد جداکشت‌هایی که تولید کالوس نموده بودند به تعداد جداکشت‌های کشت شده اولیه به‌دست آمد. وزن کالوس‌ها در پایان با ترازوی دیجیتالی اندازه‌گیری شد. دو فاکتور A(فاکتور ریزنمونه) در ۳ سطح (ریشه چه، ساقه چه و برگچه) وB (فاکتور هورمون NAA) در سه سطح (۰، ۵، ۱۰ میلی‌گرم در لیتر) مورد بررسی قرار گرفت.

آنالیز داده ها

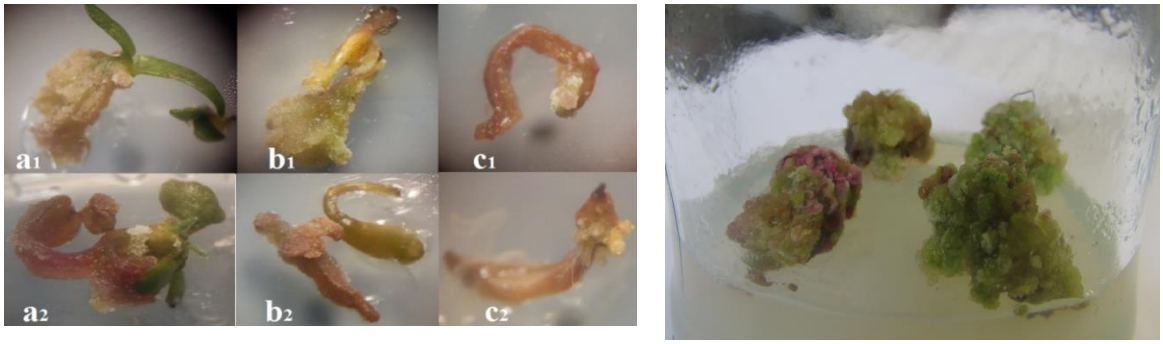
تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS انجام گردید. برای انجام آزمون مقایسه میانگین‌ها از آزمون چند دامنه‌ای دانکن استفاده شد.

نتایج

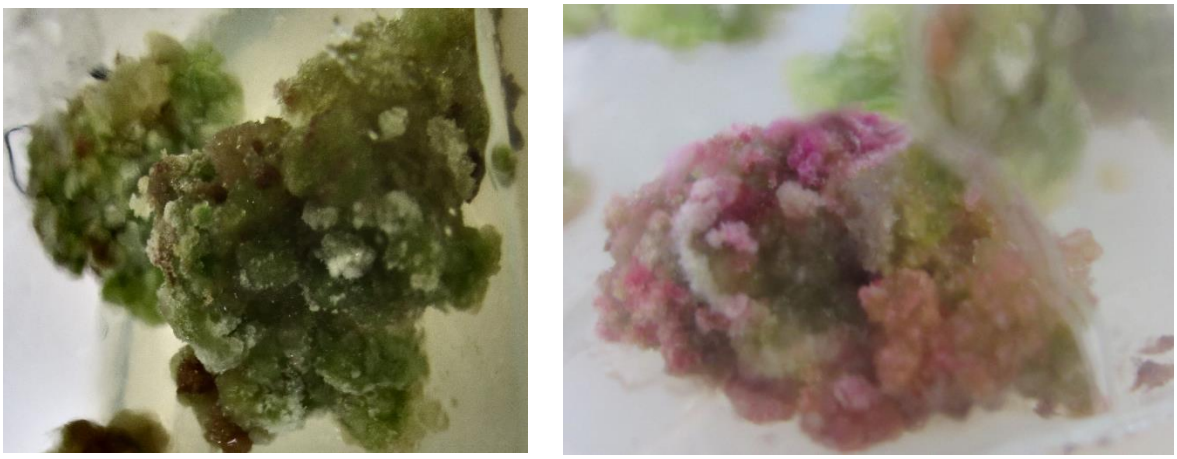
مراحل مختلف رشد و نمو این گیاه در شکل شماره ۱ نشان داده شده است. بر اساس مرور منابع موجود، برای اولین بار این گیاه در شرایط کنترل شده مورد مطالعه دقیق قرار گرفته و بر اساس کلیدهای موجود (Ghahreman, 2006)، این گیاه از گونه *Tragus* شناسایی گردید. طول رشد این گیاه حدود ۵ ماه بوده و عموماً از اواسط فروردین ماه رشد خود را آغاز و اوایل تیرماه به انتهای رشد خود و تولید بذر می‌رسد.

شکل۱- مراحل مختلف رشد و نمو گیاه *S. tragus* از گیاهچه تا تولید بذر

بعد از سه هفته، تشکیل کالوس‌ها مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج تحقیق نشان داد که بهترین جداکشت برای ایجاد کالوس، ریز نمونه برگچه و سپس ساقچه در شرایط نوری ۱۶ ساعت روشنایی با شدت ۳۰۰۰ لوکس در غلظت ۵ میلی گرم از هورمون فوق می‌باشد. در شکل‌های ۲ و ۳ میزان کالزایی در سه بافت مورد مطالعه و نیز دو نوع کال رنگی تشکیل شده نشان داده شده است. همه کالوسهای تشکیل شده از نوع نرم بودند. در جدول شماره ۱ مقایسه ویژگیها و شاخصهای تشکیل و رشد کالوس در ریزنمونه های مختلف مورد مطالعه نشان داده شده است.



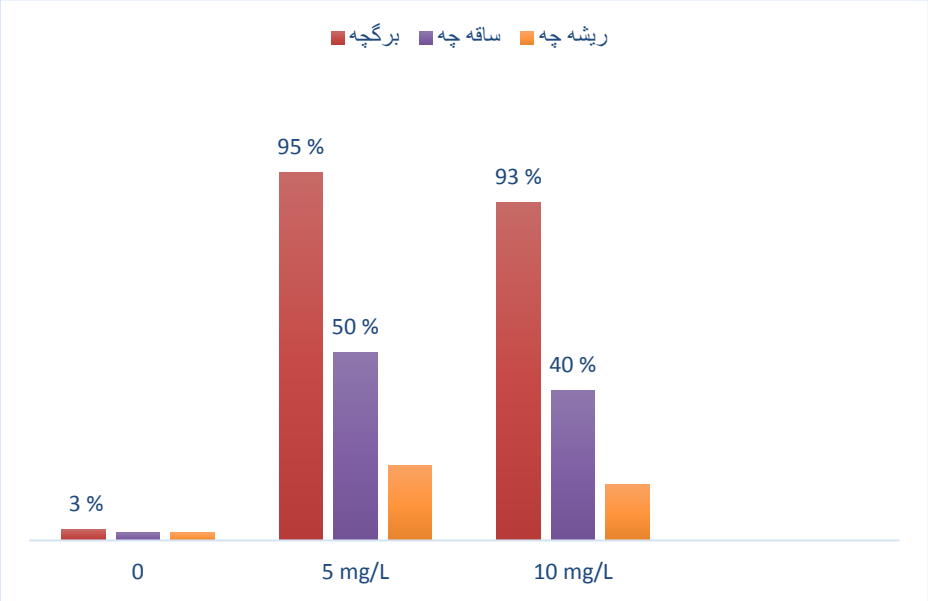
شکل۲- نمونه‌هایی از کالزایی در سه ریز کشت برگچه(a1,a2) ، ساقچه(b1,b2)، و ریشه چه(c1,c2) در گیاه دارویی چوغان



شکل ۳- تشکیل دو نوع کالوس ارغوانی (راست) و سبز (چپ) در محیط کالزایی MS از ریزنمونه های برگچه گیاه چوغان

جدول۱- مقایسه مشخصات کالزایی در بافتهای مختلف گیاه چوغان در غلظتهای مختلف NAA

NAA (mg/l)	نوع جداکشت	زمان شروع تشکیل کالوس (روز)	متوسط درصد کالزایی	درجه کالوس (۰ الی ۴)
۰	برگچه	۳۱b	۳c	۰/۲c
۰	ساقه	۳۷b	۱c	۰/۱c
۰	ریشه	۴۵a	۱c	۰c
۵	برگچه	۱۵c	۹۵a	۵a
۵	ساقه	۲۵b	۵۰b	۲b
۵	ریشه	۲۷b	۱۰c	/۸c.
۱۰	برگچه	۲۸b	۹۳a	۴a
۱۰	ساقه	۳۰b	۴۰b	۱/۶b
۱۰	ریشه	۳۵b	۷c	۰/۶c



شکل ۴- مقایسه توان کالزایی بافتهای مختلف گیاه چوغان در سطوح مختلف هورمونی NAA

بحث

ریز ازدیادی یکی از اهداف کشت بافت است که به وسیله‌ی آن می‌توان از یک گیاه(بافت‌های گیاه) تعداد زیادی گیاه مشابه تحت شرایط استریل و مطلوب به دست آورد (Zhou and Wu, 2006). القا و تولید کالوس اولین گام در تولید متابولیتهای ثانویه دارویی یا صنعتی در شرایط درون شیشه ای است. بهینه سازی تولید کالوس در گیاهان دارویی می تواند در تولید متابولیتهای ثانویه دارویی یا صنعتی در شرایط کشاورزی مولکولی Molecular farming مورد استفاده قرار گیرد. کشت سلول و بافت شرایطی را برای ایجاد و توسعه ژرم پلاسم فراهم نموده و بررسی واکنش گیاهان به انواع تنش ها را در سطح بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی تسهیل می نماید (Matkowski, 2008). ریز ازدیادی در دو گونه از سالسولا (*S. pestifer* and *S. lanata*) از ریزنمونه جنین های زیگوتیک مطالعه شده و محیط MS همراه با ۵/. میکرومول Benzylamino-purine (BAP) و ۳/. میکرومول Indole-3-acetic acid (IAA) محیط مناسبی گزارش گردید (Stefaniak and Wozny, 2003). بین ظرفیت آنتی اکسیدانی و تحمل به نمک در هالوفیتها از جمله *Salsola baryosma*, *Trianthema triquetra* and *Zygophyllum simplex* در سطح کالوس همبستگی قابل توجهی گزارش شده است (Li, 2008; Sharma, 2013). بر اساس مرور منابع، گزارشی از کشت بافت و تولید کالوس در گونه مورد مطالعه وجود نداشته و بر این اساس، گزارش یاد شده اولین گزارش از تجربه کشت بافت در این گیاه ارزشمند ولی فراموش شده است.

منابع

طباطبایی، ب. ا. ا. و امیدی، م. (۱۳۸۸). کشت بافت و سلول گیاهی. چاپ اول، انتشارات دانشگاه تهران، ص ۳۶۸.

Aghel, N. Moghimpour, E. Raes-Dana, A. (2007). Formation of a herbal shampoo using total saponin of *Achantophyllum Squarrosum*. Iranian Journal of Pharmaceutical Research. 6:167-172.

Bhojwani, S.S. and Razdan, M.K. (1996). Plant Tissue Culture: Theory and Practice: Developments in Crop Science. Vol. 5. Elsevier, Amsterdam, pp. 766.

Ghahreman, A. (2006). Flora of Iran. Volumes 1-25. Tehran: Research Institute of Forests and Rangelands Publications.

Heidari-Sharifabadi, H. Mirzaie-Nodoushan, H. (2006). Salinity-induced growth and some metabolicchanges in three *Salsola* species. J. Arid Environ. 67: 715–720.

Karimian, R. and Ghasemlou, F. (2015). The study of saponin content in the aerial parts and roots of three *Silene* species (Caryophyllaceae). Nova Biologica Reperta. 1:29-39.

Li, Y. (2008). Kinetics of the antioxidant response to salinity in the halophyte *Limonium bicolor*. Plant Soil Environ. 54: 493–497.

Malcolm, CV. Lindley, VA. O'Leary, JW. Runciman, HV. (2003). Halophyte and glycophyte salt tolerance at germination and the establishment of halophyte shrubs in saline environments. Plant Soil. 253: 171–185.

Matkowski A. (2008). Plant in vitro culture for the production of antioxidants — a review. Biotech. Adv. 26: 548–560.

Mudgal V, Madaan N, Mudgal A. (2010). Biochemical mechanism of salt tolerance in plants: a review. Int. J. Botany. 6(2): 136-143.

Munir, U. Perveen, A. Qamarunnisa, S. (2014). Comparative Pharmacognostic evaluation of some species of the genera *Suaeda* and *Salsola* leaf (Chenopodiaceae). Pak. J. Pharm Sci. 27:1309-1315.

Murashige, T., Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture.-Physiol. Plant. 15: 473–497, 1962.

Oyunbileg, Y., Munkhtsetseg, T. and Takiko. S. (2011). Shoot induction by organogenic callus of *Salsola laricifola* Turcz. Ex. Official Full-Text Publication, Mongolian Academy of Sciences, Ulaanbaatar, Mongolia.

Sharma, K. and Dubey, S. (2011). Biotechnology and conservation of medicinal plants. Journal of Experimental Sciences, 2: 60-61.

Sharma, V. and Ramawat, K. (2013). Salt stress enhanced antioxidant response in callus of three halophytes (*Salsola baryosma*, *Trianthema triquetra*, *Zygophyllum simplex*) of Thar Desert. Biologia, ISSN (Online) 1336-9563, DOI: https://doi.org/10.2478/s11756-013-0298-8.

Sridhar, T.M. and Aswath, C.R. (2014). Review on medicinal plants propagation: A comprehensive study on role of natural organic extracts in tissue culture medium. American Journal of Plant Sciences, 5: 3073-3088.

Stefaniak, B. Wozny, A. Li, V. (2003). Plant micropropagation and callus induction of some annual *Salsoa* sp. Biologia Plantarum. 46: 305-308.

Tandon, P., Kumaria, S. and Nongrum, L. (2009). Conservation and management of plant genetic resources of Northest India. Indian Journal of Traditional Knowledge, 8: 29-34.

Toderich, Kristina. (2008). Genus *Salsola* of the central Asian flora. Tokyo University of Agriculture and Technology.

Tripathi, L. and Tripathi, J.N. (2003). Role of biotechnology in medicinal plants. Tropical Journal of Pharmaceutical Research, 2: 243 – 253.

Zhou, L.G. and Wu, J.Y. (2006). Development and application of medicinal plant tissue cultures for production of drugs and herbal medicinals in China. Natural Product Reports, 23: 789-810.

Journal of Medicinal Plants Biotechnology

Vol 2, No 4, Autumn & Winter 2016

Callus induction of different explants in *Salsola tragus* L.

Negar moniri rad[1], Bahram Maleki Zanjani[2] and Ali Ammarellou[3*]

Abstract

Native plants to desert ecosystems, have unique features to ensure their survival in harsh conditions. Choghan (local name for *Salsola tragus*) is an ancient desert plant, have used for medicinal properties, and was the only washing plant in many parts of Iran. Urban culture and supply all kinds of chemical detergents have led to the forgetfulness of the capacities of national and patriotic detergent plant. Identify and preserve of such valuable plants that is resistant to harsh conditions and generally are halophyte, can be exploited in therapeutic applications, detergent plant production programs, sustainable agriculture, environmental protection and desertification. In order to study the response of callus initiation of this plant tissues, seeds were sterilized and planted on MS medium. After two days, explants of root, stem and leaf were cultured on MS medium with NAA hormone with three levels: 0, 5 and 10 mg per liter. After three weeks, callus formation was evaluated. The results showed that the best explants for good callus induction, were the explants of leaf and then stem in 16 hours of light with an intensity of 3000 lux at a concentration of 5 mg of the NAA.

Keywords: Desert plants, *Salsola tragus*, Micropropagation, Callus induction.

1*.MSc. in Biotechnology, Faculty of Agriculture, University of Zanjan, Zanjan, Iran. npmr.negar@gmail.com

2.Departement of Plant Breeding, Faculty of Agriculture, University of Zanjan, Zanjan, Iran.

3.Departement of Biotechnology, Research Institute of Modern Biological Techniques, University of Zanjan, Zanjan, Iran.