

بررسی تأثیر تنظیم کننده‌های رشد گیاهی بر القای کالوس‌زایی در گیاه دارویی تاتوره (*Datura metel* L.)

مهرداد نورآذر^{۱*}، سید مهدی رضوی^۲، علیرضا قاسمیان^۳

چکیده

گیاه تاتوره (*Datura metel* L.) گیاه دارویی مهمی است که جزء تیره سیب زمینی (*Solanaceae*) بوده و حاوی ترکیبات دارویی مهمی از جمله آتروپین و هیوسین (اسکوپولامین) می‌باشد که از تروپان آلکالوئیدها بوده و دارای خواص آنتی‌کولینرژیکی شناخته شده‌ای هستند. در سال‌های اخیر القای بافت کالوس به عنوان روش جدیدی برای به دست آوردن متابولیت‌های ثانویه مطرح شده است. هدف از این پژوهش، القای کالوس از برگ جدا شده گیاهچه‌های تاتوره می‌باشد تا بهترین غلظت هورمونی برای تولید کالوس بیشتر به دست آید. بذرهای تاتوره تحت شرایط استریل در محیط کشت MS کشت شدند و گیاهچه‌های تاتوره حاصل شدند. برگ‌های گیاهچه‌ها جدا شده و به محیط کشت MS بدون هورمون منتقل شد، اما کالوس‌زایی رخ نداد. در مرحله بعد برگ‌های گیاهچه‌ها در ۹ تیمار هورمونی که حاوی غلظت‌های مختلف اکسین 2,4-D و سیتوکینین کینیتین (Kin) بودند، به محیط کشت MS انتقال داده شدند. نمونه‌ها چهار هفته در ژرمیناتور با دوره نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی و دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. نتایج نشان داد حداکثر کالوس‌زایی در محیط کشت MS حاوی ترکیب دو هورمون با غلظت‌های ۱ میلی‌گرم بر لیتر 2,4-D و ۱ میلی‌گرم بر لیتر Kin حاصل شد.

واژه‌های کلیدی: تاتوره (*Datura metel* L.)، القای کالوس، کشت بافت، 2,4-D، کینیتین

^{۱*} - نویسنده مسئول، دانشجوی کارشناسی ارشد گروه زیست شناسی (گرایش فیزیولوژی گیاهی)، دانشگاه محقق اردبیلی. mehrdad.noorazar@gmail.com

^۲ - دانشیار گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل

^۳ - استادیار گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل

مقدمه

گیاه تاتوره با نام علمی *Datura metel* L.، یک ساله، دو لپه‌ای با بوی نامطبوع و سمی بوده و متعلق به تیره سیب زمینی (Solanaceae) و زیرتیره خمیده رویان‌ها و طایفه Hyosyameae می‌باشد که به وسیله بذر تکثیر می‌یابد. این گیاه به صورت عامیانه با نام انگلیسی Thorn apple (تاتوره خاردار) و با نام‌های فارسی تاتوره، علف شیطان نیز شناخته می‌شود (همایی بروجنی و همکاران، ۱۳۹۰). تاتوره گیاهی است به ارتفاع ۱۵۰-۳۰ سانتی‌متر که برگ‌ها دارای دم‌برگ و مثلثی شکل و به رنگ سبز روشن بوده و این گونه از تاتوره فاقد بریدگی در اطراف برگ‌های خود می‌باشد. ساقه این گیاه صاف افراشته، محکم و منشعب و همچنین ریشه آن سفید و بسیار منشعب است. گل‌ها در هر محور منفردند و جامی بزرگ، سفید رنگ و قیفی شکل دارند. زمان گل‌دهی بین خرداد تا شهریور می‌باشد. میوه گیاه از نوع کپسول خاردار هست که با چهار شکاف باز می‌شود و دارای دانه‌های قهوه‌ای رنگ، مسطح و قلوه‌ای شکل تا نیم دایره بسیاری است. دانه‌های کهنه، قهوه‌ای تیره و دانه‌های تازه، رنگ روشن‌تری دارند. منشأ اصلی تاتوره هندوستان بوده ولی امروزه در غالب نواحی آمریکا، اروپا، آسیا و ایران پراکندگی داشته و بیشتر در نواحی گرم و معتدل کره زمین انتشار یافته است (کریمی، ۱۳۷۴؛ محمودزاده و همکاران، ۱۳۸۴).

تاتوره یکی از گیاهان دارویی محسوب می‌شود که برگ‌های این گیاه منبع مهمی از تروپان آلکالوئیدهایی مانند آتروپین و هیوسین (آسکوپولامین) می‌باشد. اهمیت اقتصادی این مواد به دلیل کاربردهای دارویی بسیار مهم آن‌ها می‌باشد. این آلکالوئیدها با توجه به اثرات آنتی-کولینرژیکی و ضد اسپاسم که دارند سیستم عصبی پاراسمپاتیک را تحت تأثیر قرار می‌دهند. آلکالوئیدهای مذکور قبل از بیهوشی جهت کاهش ترشحات مجاری تنفسی و غدد بزاقی و همچنین برای درمان آسم، بیماری‌های حرکتی و پارکینسون استفاده می‌شود و به علاوه این مواد دارویی خاصیت آرام بخش، ضد درد و ضد ویروس هم

دارند. گیاهان دارویی یکی از مهمترین منابع دارویی می‌باشند که در سال‌های اخیر تمایل به استفاده از گیاهان دارویی و ترکیبات حاصل از آن‌ها در حال افزایش است (Shakeran et al., 2015).

در حال حاضر یکی از پر کاربردترین شاخه‌های بیوتکنولوژی گیاهی، کشت بافت گیاهی است. کشت بافت گیاهی نقش و کاربردهای مهم را در باززایی، حفاظت از گونه‌های در حال انقراض، تکثیر سریع و انبوه گیاهان دارویی و تولید متابولیت‌های ثانویه از طریق کشت سوسپانسیون سلولی، اندام و القای کالوس ایفا می‌کند. بیوتکنولوژی تولید متابولیت‌های ثانویه از طریق کشت بافت (القای کالوس) یک روش مناسب برای استخراج مواد مؤثره گیاهان است. نرخ تکثیر سریع و چرخه کوتاه‌تر گیاه در روش کشت بافت نسبت به کشت گیاهان در مزرعه یکی از مزیت‌های این روش می‌باشد که باعث رشد سریع و تولید انبوه آن گیاه می‌گردد. همچنین در کشت بافت گیاه تحت شرایط کنترل شده از نظر آب و هوایی، زیست محیطی و تغذیه‌ای قرار می‌گیرد که همین سبب نرخ بالای رشد گیاه نسبت به کشت در مزرعه و به وجود آمدن گیاهان عاری از بیماری می‌شود. با توجه به خواص درمانی گیاه تاتوره و دارا بودن متابولیت‌های ثانویه آتروپین و هیوسین که مواد دارویی بسیار ارزشمندی هستند، در این پژوهش برای القای کالوس در برگ‌های گیاهچه تاتوره در محیط کشت MS از اکسین 2,4-D (۴۰۲- دی کلرو فنوکسی استیک اسید) و سیتوکینین کینیتین (Kin) با غلظت‌های مختلف استفاده شد (Skrzypczak et al., 2014; Rao et al., 2002).

مواد و روش‌ها

بذر تاتوره (*Datura metel*) از شرکت پاکان بذر اصفهان تهیه شد. سپس نمونه‌های تصادفی از مخلوط بذرها برای اجرای پژوهش به آزمایشگاه تحقیقاتی گیاهی منتقل شد. در زیر هود لامینار، بذرها ابتدا به مدت ۳۰ ثانیه در اتانول ۷۰ درصد قرار گرفتند و سپس سه مرتبه با آب مقطر

لازم به ذکر است که این پژوهش در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۳ تکرار و هر تکرار با ۴ ریزنمونه برگ گیاه تاتوره انجام پذیرفت.

بعد از چهار هفته وزن تر و وزن خشک کالوس‌ها توسط ترازوی آنالیتیکال برحسب گرم محاسبه گردید و محتوای ماده خشک (Dry Matter Content) کالوس‌ها که بر حسب درصد بیان می‌شود از طریق رابطه زیر به دست آمد که در آن DW وزن خشک و FW وزن تر کالوس و DMC همان محتوای ماده خشک کالوس می باشد.

$$DMC = \frac{DW}{FW} \times 100$$

برای تجزیه و تحلیل آماری داده‌های حاصل از کشت بافت از نرم افزار MSTAT-C و برای رسم نمودارها از نرم افزار Excel استفاده شد. مقایسه میانگین داده‌ها نیز به روش آزمون دانکن در سطح احتمال ۵ درصد صورت گرفت.

نتایج و بحث

نتایج حاصل از تجزیه واریانس فاکتورهای مورد بررسی (وزن تر، وزن خشک و محتوای ماده خشک کالوس) در مورد کالوس‌های حاصل از کشت بافت گیاه تاتوره در جدول ۱ بیان گر آن است که اثرات اصلی هر ۹ تیمار هورمونی با غلظت‌های مختلف بر روی فاکتورهای مورد بررسی مذکور در سطح احتمال ۱ درصد معنی دار می باشد.

استریل (اتوکلاو شده) شستشو داده شدند. در مرحله بعد بذرها در محلول هیپوکلریت سدیم ۵ درصد به مدت ۱۰ دقیقه گذاشته شدند و سه بار با آب مقطر استریل شستشو داده شدند و سپس دوباره بذرها به مدت ۳۰ ثانیه در اتانول ۷۰ درصد قرار گرفتند و در سه مرحله ۵ دقیقه‌ای با آب مقطر استریل شستشو داده شدند و بذرها به پتری دیش‌های حاوی محیط کشت پایه MS منتقل شدند و در ژرمیناتور با دوره نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی و دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. بعد از ۲۵ روز هیچ جوانه زنی صورت نگرفت و مشخص شد که بذرها دارای رکود می‌باشند. به همین علت پوسته بذرها با اسکالپل حذف (تیمار مکانیکی) و به پتری دیش‌های حاوی محیط کشت پایه MS با رعایت شرایط استریل منتقل شدند و پتری دیش‌ها در ژرمیناتور با شرایط نوری و دمایی مذکور قرار گرفتند. مشاهده شد که تیمار با اسکالپل موجب رفع رکود و شکستن خواب بذرها و تحریک جوانه زنی آن‌ها شد و مشخص شد که خواب بذر گیاه تاتوره ناشی از پوسته غیرقابل نفوذ آن به آب و گازها به ویژه اکسیژن می‌باشد که به وسیله تیمار مکانیکی مرتفع شد. بعد از جوانه زنی بذرها و نمایان شدن برگ‌ها، تحت شرایط استریل و زیر هود لامینار، برگ‌ها به محیط پایه MS بدون هورمون (شاهد) و محیط پایه MS با ۹ غلظت مختلف هورمونی از 2,4-D و کینیتین انتقال داده شدند و در ژرمیناتور با شرایط نوری و دمایی مذکور قرار داده شدند. در محیط پایه MS بدون هورمون (شاهد) کالوس‌زایی رخ نداد.

جدول ۱- نتایج تجزیه واریانس اثر غلظت‌های مختلف هورمونی بر صفات مورد بررسی کالوس‌های حاصل از گیاه *D. metel*

میانگین مربعات				
منابع تغییر	درجه آزادی	وزن تر کالوس	وزن خشک کالوس	محتوای ماده خشک کالوس
تیمار	۸	۲۲/۱۱۵**	۰/۲۴۲**	۰/۷۴۵**
خطا	۱۸	۰/۰۰۷	۰/۰۰۱	۰/۰۰۴
کل	۲۶	-	-	-
ضریب تغییرات(%)	-	۰/۰۱	۰/۱۳	۰/۰۵

** نشانه معنی دار بودن در سطح ۱ درصد است.

غلظت‌های مختلف هورمونی از 2,4-D و Kin در محیط کشت MS، طبق جدول ۲ بر روی برگ‌های گیاه تاتوره جهت القای کالوس اعمال شد. همان‌طور که گفته شد القای کالوس در محیط کشت پایه MS بدون هورمون رخ نداد و کالوس‌زایی در برگ‌های گیاه تاتوره مشاهده نشد.

جدول ۲- ترکیب غلظت‌های مختلف 2,4-D و Kin مورد استفاده جهت القای تولید کالوس در گیاه *D. metel*

ترکیبات محیط کشت	تیمارها
MS + 2,4-D (0/5 mg/L) + Kin (0/5 mg/L)	A
MS + 2,4-D (0/5 mg/L) + Kin (1 mg/L)	B
MS + 2,4-D (0/5 mg/L) + Kin (2 mg/L)	C
MS + 2,4-D (1 mg/L) + Kin (0/5 mg/L)	D
MS + 2,4-D (1 mg/L) + Kin (1 mg/L)	E
MS + 2,4-D (1 mg/L) + Kin (2 mg/L)	F
MS + 2,4-D (2 mg/L) + Kin (0/5 mg/L)	G
MS + 2,4-D (2 mg/L) + Kin (1 mg/L)	H
MS + 2,4-D (2 mg/L) + Kin (2 mg/L)	J

2,4-D و ۱ میلی‌گرم بر لیتر Kin است که باعث افزایش وزن تر، وزن خشک و درصد محتوای ماده خشک کالوس شده است. لازم به ذکر است که مقایسه میانگین‌ها به روش آزمون دانکن در سطح ۵ درصد صورت گرفته است.

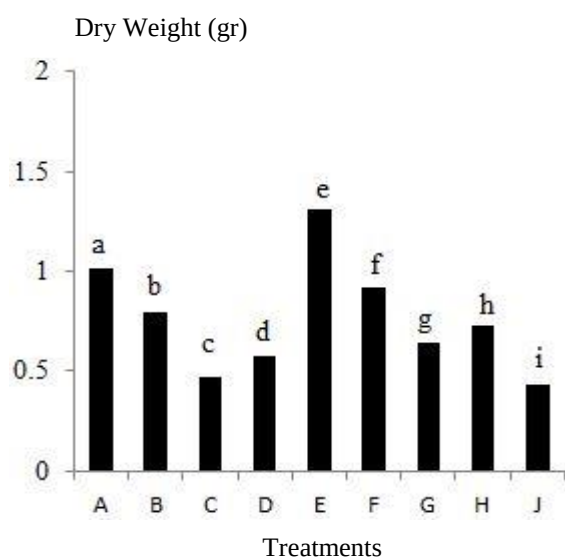
شکل ۱ کالوس‌زایی در برگ‌های گیاه تاتوره را نشان می‌دهد. نتایج حاصل از پژوهش در شکل‌های ۲، ۳، ۴ و ۵ نشان داد که بهترین تیمار هورمونی برای ایجاد حداکثر کالوس‌زایی، محیط کشت MS حاوی ۱ میلی‌گرم بر لیتر



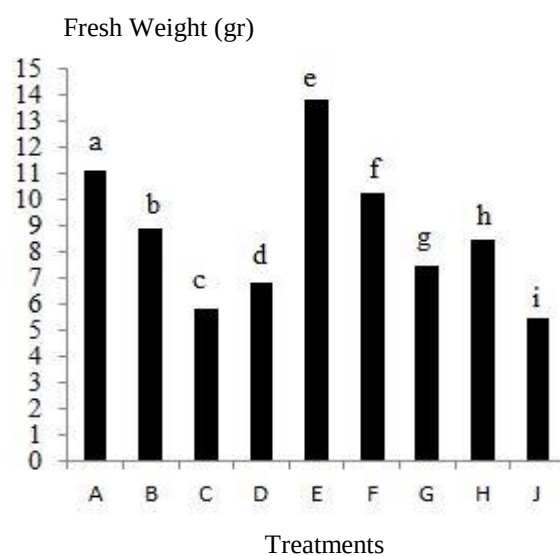
شکل ۱- کالوس‌زایی در ریزنمونه‌های برگ گیاه تاتوره تحت تیمار هورمونی MS + 2,4-D (1 mg/L) + Kin (1 mg/L)

خشک و محتوای ماده خشک کالوس مربوط به محیط کشت MS حاوی ۲ میلی گرم بر لیتر 2,4-D و ۲ میلی گرم بر لیتر Kin می باشد.

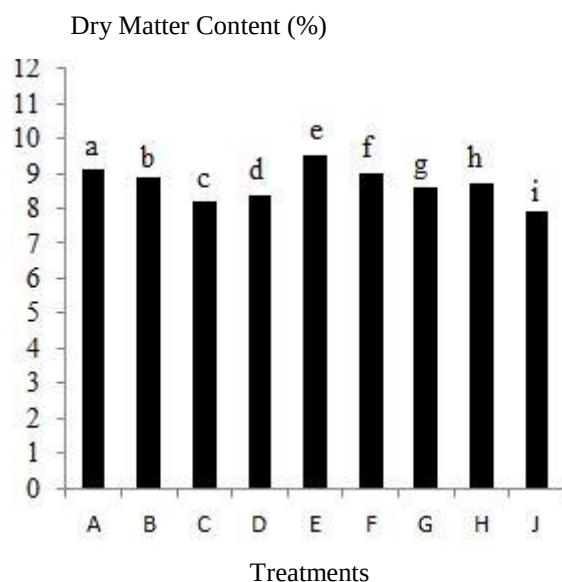
با توجه به داده های به دست آمده که در شکل ۲، ۳ و ۴ نشان داده شده است، بیشترین وزن تر، وزن خشک و محتوای ماده خشک کالوس مربوط به محیط کشت MS حاوی 2,4-D (1 mg/L) + Kin (1 mg/L) است که به ترتیب ۱۳/۸۴ گرم، ۱/۳۱ گرم و ۹/۵۲ درصد می باشد. کمترین میزان کالوس زایی و همچنین کمترین وزن تر، وزن



شکل ۳- میانگین وزن خشک کالوس ها در گیاه تاتوره در سطوح مختلف هورمونی



شکل ۲- میانگین وزن تر کالوس ها در گیاه تاتوره در سطوح مختلف هورمونی



شکل ۴- میانگین محتوای ماده خشک کالوس های گیاه تاتوره در سطوح مختلف هورمونی. حروف متفاوت در بالای ستون های هر یک از نمودارها نشانه اختلاف معنی دار در سطح ۵ درصد است.

و نحوه قرارگرفتن آن‌ها روی محیط کشت نیز در برخی از گیاهان حائز اهمیت است. تنوع در فراوانی تولید کالوس در پاسخ به سطوح مختلف هورمونی، می‌تواند به دلیل تمایز در بیان ژن‌های کنترل کننده تولید کالوس باشد. همچنین ممکن است که در بعضی از سطوح هورمونی مورد استفاده، برخی از ژن‌های مسئول در سنتز کالوس، به طور کامل بیان نشوند. به علاوه، 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 (Mahmood et al., 2012).

سپاس‌گزاری

از دانشگاه محقق اردبیلی به خاطر پشتیبانی مالی پژوهش، از دانشکده علوم پایه دانشگاه و به ویژه دکتر سیدمهدی رضوی عضو هیئت علمی گروه زیست‌شناسی، برای همکاری ارزنده‌شان تشکر و قدردانی می‌گردد.

نتایج نشان دادند که جهت تولید کالوس وجود هورمون ضروری است و در محیط کشت فاقد هورمون کالوسی تولید نگردید. معمولاً محیط کشت حاوی 2,4-D نیز به تنهایی برای تولید کالوس مؤثر نیست و حداکثر کالوس‌زایی در محیط کشت با ترکیب 2,4-D و Kin مشاهده گردیده است (Roy et al., 2008).

تحقیقات در گیاه داوودی نشان داده است که افزایش تراکم Kin و 2,4-D در حد ۱ میلی‌گرم بر لیتر تولید کالوس را افزایش داده است (Shinoyama et al., 2004). میزان تولید کالوس بستگی به ترکیب هورمون‌های رشد به کار رفته در محیط کشت دارد و تعادل بین هورمون‌های اکسین و سیتوکینین يك فاکتور مورفوژنتیکی تعیین کننده و مهم به شمار می‌رود (Abbasi et al., 2007). همچنین گزارش شده است که ترکیب هورمون 2,4-D و سیتوکینین در تسهیل القای کالوس و حفظ آن مؤثر است (Abd Elaleem et al., 2009)، هر چند که سن گیاهچه

منابع

- L.) cultivars and development of efficient regeneration system. Pakistan Journal of Botany, 44, 277-284.
- Rao, R.S. and Ravishankar, G.A. (2002). Plant cell cultures: Chemical factories of secondary metabolites. Biotechnology Advances, 20, 101-153.
- Roy, A., Ghosh, S., Chaudhuri, M. and Saha, P.K. (2008). Effect of different plant hormones on callus induction in *Gymnema sylvestris* (Asclepiadaceae). African Journal of Biotechnology, 7, 2209-2211.
- Shakeran, Z, Keyhanfar, M, Asghari, G.H. and Ghanadian, M. (2015). Improvement of atropine production by different biotic and abiotic elicitors in hairy root cultures of *Datura metel*. Turkish Journal of Biology, 39, 111-118.
- Shinoyama, H., Nomura, Y., Tsuchiya, T. and Kazuma, T. (2004) A simple and efficient method for somatic embryogenesis and plant regeneration from leaves of Chrysanthemum (*dendranthema* × *grandiflorum* (Ramat.) Kitamura). Plant Biotechnology, 21, 25-33.
- Skrzypczak-Pietraszek, E., Słota, J. and Pietraszek, J. (2014). The influence of L-phenylalanine, methyl jasmonate and sucrose concentration on the accumulation of phenolic acids in *Exacum affine* Balf. f. ex Regel shoot culture. Acta Biochimica Polonica, 61, 47-53.
- کریمی، ه. (۱۳۷۴). گیاهان هرز ایران، مرکز نشر دانشگاهی.
- محمودزاده، ا.، نوجوان، م. و باقری، ز. (۱۳۸۴). اثر تیمارهای مختلف در شکستن خواب و جوانه زنی بذور تاتوره (*Datura stramonium* L.). مجله زیست شناسی ایران، ۱۸، ۳۴۹-۳۴۱.
- همایی بروجنی، ط.، احسانپور، ع. و اصغری، غ. (۱۳۹۰). تعیین مقدار میزان آتروپین گیاه تراریخت و باززائی شده *Datura metel* L. به روش TLC. مجله علوم پزشکی مازنداران، ۲۱، ۱۹۶-۲۰۲.
- Abbasi, B., Saxena, P.K., Murch, S.J. and Liu, C.Z. (2007). Echinacea biotechnology: Challenges and opportunities. In Vitro Cellular & Developmental Biology, 43, 481-492.
- Abd Elaleem, K.G., Modawi, R.S. and Khalafalla, M.M. (2009). Effect of plant growth regulators on callus induction and plant regeneration in tuber segment culture of potato (*Solanum tuberosum* L.) cultivar Diamant. African Journal of Biotechnology, 8, 2529-2534.
- Mahmood, I., Razzaq, A., Khan, Z.U.D., Hafez, I.A. and Kaleem, S. (2012). Evaluation of tissue culture responses of promising Wheat (*Triticum aestivum*