مجله بیوتکنولوژی کشاورزی
علمی-پژوهشی و ISC

القای کالوس و باززایی مستقیم در ریزنمونه‌های مختلف گیاه دارویی ازمک (*Lepidium draba* L.)

زهرا زینهـاری[۱]، شهرام پورسیدی[۲*]، جعفر ذوالعلی[۳]

[۱] دانش آموخته کارشناسی ارشد رشته بیوتکنولوژی کشاورزی دانشگاه شهید باهنر کرمان

[۲] دانشیار گروه بیوتکنولوژی کشاورزی دانشگاه شهید باهنر کرمان

[۳] استادیار گروه بیوتکنولوژی کشاورزی دانشگاه شهید باهنر کرمان

تاریخ دریافت: ۱۳۹٤/۰۸/۱۰، تاریخ پذیرش: ۱۳۹۵/۰۵/۱٤

چکیده

گیاه ازمک به واسطه تولید ترکیب ضدسرطانی و ضدمیکروبی سولفورافان، از گیاهان دارویی ارزشمند به‌حساب می‌آید. بهینه‌سازی روش‌های کشت‌بافت به‌منظور آسان نمودن استحصال ترکیبات‌دارویی آن، فرآیند انتقال‌ژن و نیز بهبود صفات این گیاه‌دارویی، بسیار مهم است. این تحقیق، با ریزنمونه‌های برگ‌لپه‌ای، ساقه و ریشه در محیط کشت MS در قالب دو آزمایش جداگانه، صورت گرفت. تجزیه داده‌ها به صورت آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملا تصادفی انجام شد. در نتایج آزمایش اول با غلظت‌های متفاوتی از تنظیم‌کننده‌های رشد NAA وBAP، بیشترین درصد پاسخ‌دهی، شاخه‌زایی مستقیم و میانگین تعداد شاخه در ریزنمونه ریشه و بیشترین درصد ریشه‌زایی و میانگین تعداد ریشه در ریزنمونه برگ‌لپه‌ای مشاهده شد. تیمار ۱ میلی‌گرم در لیترBAP بدون حضور NAA سبب القای بیشترین میانگین تعداد شاخه مستقیم در جداکشت ریشه گردید. برگ‌لپه‌ای در تیمار ۲ میلی‌گرم درلیتر NAA و۰/۵ میلی‌گرم درلیترBAP بالاترین درصد ریشه‌زایی و میانگین تعداد ریشه را تولید کرد. درصد کالوس‌زایی و آغازش کالوس ریزنمونه ساقه بیشتر از دیگر ریزنمونه‌ها بود، درحالی‌که درصد باززایی کالوس در سه ریزنمونه مورد مطالعه اختلاف معنی‌داری نداشت. اما بیشترین میانگین تعداد شاخه‌های حاصل از کالوس‌های باززاشده در ریزنمونه برگ‌لپه‌ای دیده شد. آزمایش دوم با ترکیبی از غلظت‌های مختلف 2,4-D و BAP، تحت تاثیر دو تیمار تاریکی مطلق و ۱٦ ساعت دوره روشنایی، انجام شد. طبق نتایج، بالاترین مقدار صفات مورد بررسی، مربوط به تیمار ۱٦ ساعت دوره روشنایی بود. ریزنمونه‌های برگ‌لپه‌ای و ساقه بیشترین درصد کالوس‌زایی و ریزنمونه برگی بیشترین وزن کالوس را نشان دادند. درحالی‌که بالاترین درصد باززایی کالوس و نرخ رشد کالوس از ریزنمونه ریشه بدست آمد. بیشترین وزن کالوس در ریزنمونه برگی و درغلظت ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D و۳ میلی‌گرم در لیتر BAP و بالاترین نرخ رشد کالوس در ریزنمونه ریشه و در غلظت ۰/۵ یا ۱ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D و۳ میلی‌گرم در لیتر BAP و بیشترین درصد باززایی کالوس در ریزنمونه ریشه و درغلظت ۲ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D و۲ میلی‌گرم در لیتر BAP و یا تنها درغلظت ۳ میلی‌گرم در لیتر BAP مشاهده شد.

واژه‌های کلیدی: ازمک، القای کالوس، باززایی مستقیم، بهینه‌سازی کشت بافت.

[*] نویسنده مسئول: شهرام پورسیدی تلفن: ۰۹۱۳۳٤۳۰۳۸۹ Email: spseyedi@uk.ac.ir

مقدمه

ازمک (*Lepidium draba* L.) یک علف هرز چندساله و متعلق به خانواده شب‌بو (Brassicaceae) است که توسط بذر، قطعات ریشه و ریزوم تکثیر می‌شود. هر گیاه حدود یک تا پنج هزار بذر تولید می‌کند که جوانه‌زنی آن‌ها در پاییز است و زمستان و اوایل بهار را به صورت روزت سپری می‌کنند (Jacobs, 2007). گیاه ازمک بومی اروپا و آسیا است (Mohlenbrock, 2013). در حقیقت این گیاه بومی آسیای مرکزی و سیبری است، که از آن جا به جنوب اروپا منتقل و در حال حاضر به همه قاره ها گسترش یافته است (Ball, 1993; Jalas *et al.*, 1996) و البته در ایران نیز بومی جنوب غرب کشور است (Koie and Rechinger, 1954-55). این گیاه غنی از گلوکورافانین* است که از گلوکوزینولات‌ها† به‌شمار می‌آید و شامل نیتروژن و سولفور می‌باشد، که تقریبا به‌طور انحصاری در گیاهان خانواده براسیکا یافت می‌شود (Del Carmen Martínez-Ballesta *et al.*, 2013). گلوکوزینولات در بافت آسیب‌دیده گیاهی به ترکیب ارزشمند سولفورافان‡ تبدیل می‌شود (Bones and Rossiter, 2006; Del Carmen Martínez-Ballesta *et al.*, 2013). این متابولیت دارای خواص ضدسرطانی و ضدمیکروبی است (Fahey *et al.*, 2002). گلوکورافانین خالص‌شده از *L. draba* به‌عنوان افزودنی به رژیم غذایی برای درمان سرطان و فشار خون بالا استفاده شده است (Powell *et al.*, 2005a,b). همچنین محققین، ازمک را دارویی با خاصیت ضداسکروی§ معرفی کردند (Mojab *et al.*, 2003). براساس تحقیقات صورت‌گرفته، مشخص شده است که گیاه ازمک علاوه بر خواص دارویی و مقابله با پاتوژن‌ها، میزان جذب بالایی از نظر عناصر سرب، روی، منگنز، آهن، مس و کادمیوم دارد (Chehreghani and Malayeri, 2007; Cheraghi *et al.*, 2011; Nouri *et al.*, 2011). با این قابلیت، ازمک می‌تواند گیاهی ارزشمند در مباحث گیاه‌پالایی باشد. با وجود این خواص و ویژگی‌ها در گیاه ازمک، افزایش ترکیبات دارویی و اصلاح صفات آن بایستی مورد توجه قرار گیرد. تاکنون از کشت این ویترو به‌منظور باززایی یا تکثیر اغلب گونه‌های گیاهی از جمله گیاهان دارویی استفاده شده است. ازدیاد در شرایط درون شیشه‌ای دارای پتانسیل بالایی برای تولید گیاهان دارویی با کیفیت مناسب است و این مهم، می تواند از طریق روش‌های مختلف ریزازدیادی بدست آید. ریزازدیادی در گونه‌های گیاهی متنوعی از جمله تعداد زیادی از گیاهان دارویی شامل *Catharanthus roseus, Datura melet, Digitalis spp., Cinchona ledgeriana, Chlorophytum borivilianum, Bacopa monnieri* نتایج مطلوبی را نشان داده است (Kayser and Quax, 2007; Tripathi, 2003). اندام‌زایی در شرایط درون شیشه به استفاده از هورمون‌های گیاهی و همچنین به توانایی بافت‌ها برای پاسخ به تغییرات هورمونی در طول کشت

* -glucoraphanin
† -Gulocosinolates
‡ - Sulforaphane
§ - antiscorbutic

وابسته است (Akbas *et al*., 2009). اگرچه میزان تنظیم‌کننده‌های خارجی به شدت به ژنوتیپ و مقدار هورمون داخلی گیاه بستگی دارد (Bhaskaran and Smith , 1990)، اما به‌طور کلی کنترل فرآیندهای تمایزیابی بستگی به حضور اکسین و سیتوکینین داشته و توازن بین آن‌ها تولید اندام هوایی و ریشه‌ها را سبب می‌شود. انتخاب یک ریزنمونه در مرحله رشد مطلوب نقش اساسی در موفقیت‌آمیز بودن کشت بافت در شرایط درون شیشه بازی می کند. پیچیدگی مورفولوژیکی یک ریزنمونه به همراه انتخاب تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی مناسب، تاثیر چشم‌گیری بر باززایی نوساقه‌ها و القای کالوس دارد (Khawar *et al*., 2005). هرچند که سن ریزنمونه‌ها و نحوه قرار گرفتن آن‌ها روی محیط کشت نیز حائز اهمیت است (Neibaur *et al*., 2008). کشت بافت روشی مناسب جهت تکثیر آسان برای تولید گیاهان یکسان از نظر ژنتیکی و افزایش ماده مؤثره می‌باشد (Azizi and Omidbeigi, 2002). در شرایط آزمایشگاهی می‌توان متابولیت‌های باارزش موردنظر را در تمام فصول سال و با مقدار و کیفیت دلخواه تولید کرد (Debnath *et al*., 2006). همچنین پیش‌نیاز بسیاری از روش‌های انتقال ژن، بهینه‌سازی شرایط کشت بافت جهت انجام باززایی با راندمان بالا است. گونه‌های مختلف، ارقام درون گونه‌ای و اندام‌های مختلف یک گیاه، به یک روش کشت بافت واکنش یکسان نشان نمی‌دهند (Farsi and Zolala, 2003). بدیهی است دست‌یابی به روش‌های کارآمد و تکرارپذیر جهت باززایی و تولید گیاهچه‌های عاری از بیماری با حداقل تنوع ژنتیکی در زمان کوتاه، می‌تواند در این گیاه مؤثر واقع شود. لذا بهینه‌سازی کشت درون شیشه‌ای ازمک ضمن تکثیر استریل گیاه و استفاده از آن برای تولید متابولیت‌های ثانویه، جهت تهیه گیاه تراریخته دارای صفات مطلوب با روش‌های نوین مهندسی ژنتیک نیز اهمیت دارد. تاکنون از کشت درون شیشه‌ای به‌منظور تکثیر و باززایی *Lepidium meyenii* (Poizerova *et al*., 2010) و *L. campestre* (Ivarson *et al*., 2013) و برخی دیگر از گونه های جنس *Lepidium* استفاده شده است. اما تنها یک مورد، باززایی گیاه ازمک از طریق کشت بافت، توسط Ghotbzadeh Kermani *et al*. (2012)، گزارش شده است و در مورد بهینه‌سازی کشت بافت گیاه دارویی ازمک گزارشی وجود ندارد. تحقیق حاضر با هدف بهینه‌سازی سیستم کشت بافت ازمک به منظور افزایش باززایی و عوامل مختلف تأثیرگذار بر آن برای مطالعات بعدی در خصوص ریزازدیادی، مهندسی ژنتیک و انتقال ژن‌های مطلوب به این گیاه و بهبود ویژگی‌های کمی و کیفی آن انجام گرفت.

مواد و روش‌ها

بذور ازمک از اطراف شهر کرمان جمع‌آوری و در هرباریوم دانشگاه شهید باهنر کرمان شناسایی شدند. استریل کردن بذر، پس از شستشو با آب و مواد شوینده، با الکل ۷۰ درصد به مدت ۳۰ ثانیه و محلول هیپوکلریت سدیم ۲/۵ درصد به مدت ۱۵ دقیقه انجام شد. در نهایت بذرها سه مرتبه با آب مقطر استریل آبکشی شدند. بذرهای استریل بر روی محیط کشت پایه MS با غلظت یک دوم (Murashige and Skoog, 1962) حاوی ۱/۵ درصد ساکارز و ۵ گرم در لیتر آگار با pH معادل ۵/۸، برای جوانه‌زنی، قرار گرفتند. پس از دو هفته از گیاهچه‌های دو برگی یکنواخت، سه نوع ریزنمونه برگ لپه‌ای و قطعات یک سانتی‌متری ساقه و ریشه تهیه گردید. ریزنمونه‌ها در قالب سه تکرار، بر روی محیط کشت پایه MS حاوی۳ درصد ساکارز و ۸ گرم در لیتر آگار با pH معادل ۵/۸، با شش سطح ٤، ۲، ۱، ۰/۵، ۰/۲، ۰ میلی‌گرم در لیتر NAA* و هفت سطح ٤/۵، ٤، ۳، ۲، ۱، ۰/۵، ۰ میلی‌گرم در لیتر BAP† در اتاقک رشد در شرایط ١٦ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی با دمای ٢٦ درجه سانتی‌گراد کشت شدند. همچنین در آزمایشی دیگری به‌منظور تولید کالوس، سه ریزنمونه برگ لپه‌ای، ساقه و ریشه مشابه قبل، بر روی محیط کشت پایه MS حاوی ۳ درصد ساکارز و ۸ گرم در لیتر آگار با pH معادل ۵/۸، با چهار سطح ۲، ۱، ۰/۵، ۰ میلی‌گرم در لیتر-2,4 و پنج سطح ۳، ۲، ۱، ۰/۵، ۰ میلی‌گرم درلیتر BAP کشت و در دمای ٢٦ درجه سانتی‌گراد تحت دو تیمار نوری، تاریکی مطلق و ١٦ ساعت دوره روشنایی قرار گرفتند.

اندازه گیری و محاسبه صفات مورد نظر

پس از گذشت یک ماه نمونه‌ها پایش و در آزمایش اول درصد پاسخ‌دهی، درصد شاخه‌زایی مستقیم، میانگین تعداد شاخه مستقیم، درصد ریشه‌زایی، میانگین تعداد ریشه، درصد کالوس‌زایی، درصد آغازش کالوس، درصد باززایی کالوس و میانگین تعداد شاخه حاصل از کالوس‌های باززاشده محاسبه شد. در آزمایش دوم نیز درصد کالوس‌زایی، وزن تر کالوس، نرخ رشد کالوس و درصد باززایی کالوس مورد بررسی قرار گرفت. درصد پاسخ‌دهی، درصد شاخه‌زایی مستقیم، درصد ریشه‌زایی و درصد کالوس‌زایی در هر پتری از تقسیم تعداد ریزنمونه‌هایی که صفت مورد نظر را نشان داده بودند، بر تعداد کل ریزنمونه‌های پتری و ضرب کردن در عدد ۱۰۰ بدست آمد. برای محاسبه درصد آغازش کالوس تعداد کل کالوس‌های پتری بر تعداد ریزنمونه‌هایی که در آن پتری تولید کالوس کرده بودند تقسیم و در ۱۰۰ ضرب شد. همچنین از تقسیم تعداد کالوس‌های باززاشده بر تعداد کل کالوس‌های پتری و ضرب در عدد ۱۰۰، درصد باززایی کالوس‌ها بدست آمد. به‌منظور محاسبه میانگین تعداد شاخه مستقیم و میانگین تعداد ریشه، تعداد کل شاخه مستقیم یا

* -Naphthalene Acetic Acid
† -6-Benzyl Amino Purine
‡ -2,4-dichlorophenoxy acetic acid

ریشه در پتری بر تعداد ریزنمونه‌هایی که شاخه‌زایی یا ریشه‌زایی داشتند تقسیم شد. میانگین شاخه حاصل از کالوس‌های باززاشده از تقسیم مجموع تعداد شاخه‌های باززاشده از کالوس‌ها بر تعداد کل کالوس‌های باززاشده پتری بدست آمد. میانگین وزن تر کالوس و میانگین نرخ رشد کالوس محاسبه‌شده در تیمارهای حاوی سطوح مختلف 2,4-D و BAP به ترتیب از تقسیم وزن کل کالوس‌های پتری بر تعداد ریزنمونه‌های پاسخ‌داده و تقسیم وزن کل کالوس‌های پتری بر مجموع وزن اولیه ریزنمونه‌های پاسخ‌داده حاصل شد.

القای ریشه و سازگاری با محیط

ریزنمونه‌هایی که اندام‌زایی داشتند به قطعات کوچکتر تقسیم و در سطح محیط القای ریشه که محیط MS کامل حاوی ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر NAA بود، کشت شدند. پس از ریشه‌دار شدن، نمونه‌ها جهت توسعه ریشه و رشد بیشتر ساقه‌ی نوپدید به محیط MS کامل بدون هورمون، حاوی ساکارز و آگار با همان نسبت‌های قبل منتقل شدند و به مدت دو هفته در شرایط نوری و دمایی قبل قرار گرفتند. گیاهچه‌هایی که در محیط توسعه رشد کافی داشتند، به گلدان‌های کوچک حاوی پیت ماس استریل انتقال یافتند. این نمونه‌ها تا زمان استقرار کامل و سازگاری با شرایط گلدانی، با محیط مایع حاوی نصف غلظت نمک های MS آبیاری شدند. برای سازگاری تدریجی با شرایط طبیعی (حفظ رطوبت نسبی بالا و کنترل آلودگی) از سرپوش‌های شفاف استفاده شد. پس از سازگاری، سرپوش‌ها حذف گردید و گیاهان به شرایط طبیعی خاک منتقل شدند.

تجزیه آماری

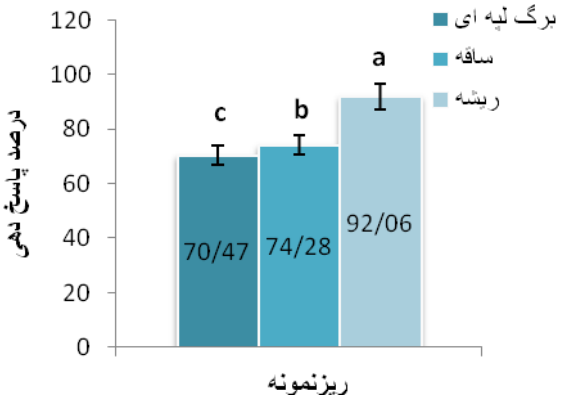
آزمایش به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار انجام و داده‌ها با استفاده از نرم افزار SPSS 22 تجزیه گردیدند. با توجه به اینکه اکثر داده‌ها بر اساس درصد بودند، برای نرمال کردن توزیع داده‌ها، از تبدیل داده زاویه‌ای $\mathrm{Arcsin}\sqrt{X}$ استفاده شد و در مواردی که داده‌ی صفر نیز وجود داشت از $\mathrm{Arcsin}\sqrt{X+0.5}$ استفاده گردید (Westhof, 1999). تجزیه واریانس با استفاده از آزمون F و مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون چنددامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ۵ درصد صورت گرفت. در پایان نمودارها در محیط Excel رسم شدند.

نتایج و بحث

تحقیق حاضر با هدف بهینه‌سازی کشت بافت گیاه دارویی ازمک انجام شد. برای این منظور از گیاهچه‌های دو برگی یکنواخت ازمک سه نوع ریزنمونه برگ لپه، ساقه و ریشه تهیه شد. به‌طور معمول نوع ریزنمونه، ظرفیت شاخه‌زایی و باززایی متفاوتی در محیط کشت دارد و برگ لپه‌ای در بیشتر موارد شاخه‌زایی بیشتری نسبت به قطعات برگ نشان می‌دهد (Guo *et al.*, 2005). بنابراین، در این آزمایش ریزنمونه برگی، از برگ‌های لپه‌ای انتخاب شد. به‌منظور بررسی تأثیر

برخی از تنظیم‌کننده‌های رشد (BAP,2,4-D, NAA)، ریزنمونه برگ لپه‌ای، ساقه و ریشه در محیط کشت‌های پایه MS، حاوی نوع و غلظت‌های متفاوت هورمونی، کشت شدند. کشت‌های حاوی دو هورمون NAA و BAP پس از گذشت یک ماه بررسی و صفات موردنظر شمارش و محاسبه شد. نتایج حاصل از تجزیه واریانس داده‌های مربوط به درصد پاسخ‌دهی، درصد شاخه‌زایی مستقیم، میانگین تعداد شاخه مستقیم، درصد ریشه‌زایی، میانگین تعداد ریشه ، درصد کالوس‌زایی، درصد آغازش کالوس، درصد باززایی کالوس و میانگین تعداد شاخه حاصل از کالوس‌های باززاشده، به‌طور جداگانه، نشان داد که اثر هر یک از تنظیم‌کننده‌های رشد و ریزنمونه به تنهایی و همچنین اثرات متقابل آن‌ها، همگی در سطح احتمال ۵ درصد معنی‌دار می‌باشند (جدول۱). مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون دانکن در سطح احتمال ۵ درصد مشخص کرد، بیشترین درصد پاسخ‌دهی ریزنمونه‌ها مربوط به ریزنمونه ریشه است (شکل۱) و همچنین بیشترین درصد شاخه‌زایی مستقیم را نیز ریزنمونه ریشه داشته است (شکل۲-الف). در جداکشت ریشه بین ۵۳ تا ۱۰۰ درصد، پاسخ‌دهی مشاهده شد و در ۲۲ تیمار از ٤۲ تیمار اعمال‌شده، پاسخ‌دهی ۱۰۰ درصد بود، که بیانگر قابلیت بالای باززایی این ریزنمونه است. در اکثر تیمارهای اعمال‌شده بر ریزنمونه ریشه درصد پاسخ‌دهی و درصد شاخه‌زایی مستقیم بالایی مشاهده شد، به‌طوری که مقایسه میانگین‌ها اختلاف معنی‌داری بین آن‌ها نشان نداد. تیمارهایی که سطح هورمون BAP در آن‌ها بیش از NAA بوده است شاخه‌زایی مستقیم بیشتری را در ریزنمونه ریشه القا کردند. بیشترین درصد شاخه‌زایی مستقیم جداکشت ساقه در تیمارهای فاقد NAA دیده شد. برگ لپه‌ای درحالی‌که کمترین درصد شاخه‌زایی مستقیم را داشته است اما در تیمار۰/۲ میلی‌گرم درلیتر NAA و ۰/۵ میلی‌گرم درلیتر BAP و تیمار ٤ میلی‌گرم درلیتر NAA و۱ میلی‌گرم درلیتر BAP درصد شاخه‌زایی مستقیم بالایی را ایجاد کرد.

.



شکل۱ - درصد پاسخ‌دهی ریزنمونه‌های مختلف گیاه ازمک در غلظت‌های متفاوت NAA و BAP. حروف روی شکل برحسب آزمون دانکن در سطح ۵ درصد می‌باشد.

Figure 1- Response rate on different concentrations of NAA and BAP in *Lepidium draba* explants. The letters on columns are based on Duncan test (p≤0.05).

در مقایسه میانگین‌ها ریزنمونه ریشه بیشترین میانگین تعداد نوساقه مستقیم را نیز نشان

داد و ریزنمونه برگ و ساقه به ترتیب در گروه دوم و سوم قرار داشتند (شکل۲–ب). این صفت در تیمار ۱ میلی‌گرم درلیتر BAP بدون حضور NAA در جداکشت ریشه حداکثر میزان خود را نشان داده است. تیمار ۱ میلی‌گرم درلیتر NAA و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP و تیمار٤ میلی‌گرم درلیتر NAA و ۳ میلی‌گرم درلیتر BAP در ریزنمونه برگی بیشترین تعداد شاخه را ایجاد کردند. درحالی‌که Ghotbzadeh Kermani *et al.* (2012)، در تیمار ۱ یا ۳ میلی‌گرم در لیتر BAP بدون حضور NAA بیشترین میزان این صفت را در برگ لپه‌ای مشاهده کردند. ساقه‌زایی از ریزنمونه‌های مختلف در گونه‌های براسیکا تحت تأثیر تعادل هورمونی استفاده‌شده است که می‌تواند ناشی از موقعیت متفاوت فیزیولوژیکی ریزنمونه (Dunwell *et al.*,1976) و یا تحت کنترل ژنتیکی باشد (Jain *et al.*, 1988). Guo *et al.* (2005) معتقدند که حضور اکسین در کنار سیتوکینین باعث باززایی بهتر بر روی ریزنمونه‌های برگ لپه‌ای می‌شود. Ghasemi *et al.* (2007) نیز بیان می‌کنند که حضور NAA با غلظت یک میلی‌گرم در لیتر در محیط کشت باعث اندام‌زایی مؤثر کلزا می‌شود.

در تیمارهای شاهد نیز باززایی از ریزنمونه‌های گیاه ازمک خصوصا جداکشت ریشه مشاهده شد. البته درصد اندک جوانه‌زنی در محیط فاقد هورمون (شاهد) را می‌توان به حضور عناصر معدنی، کربن و نیز هورمون‌های ذخیره‌شده در قسمت‌های مختلف گیاه نسبت داد، اما باززایی در تیمار شاهد ریزنمونه ریشه این گیاه، به میزان قابل توجهی بوده است. در بررسی درصد ریشه‌زایی ریزنمونه‌ها، این‌بار جداکشت برگ لپه‌ای بیشترین درصد را داشته است (شکل۲–ج). همچنین بیشترین میانگین تعداد ریشه تولیدشده نیز مربوط به ریزنمونه برگی است (شکل۲–د). بااین‌حال در این گیاه ریزنمونه‌های برگ پاسخ‌دهی دیرتری به محیط کشت بافت داشتند.

ریزنمونه برگ در تیمار ۲ میلی‌گرم درلیتر NAA و ۰/۵ میلی‌گرم درلیتر BAP و تیمار ۲ میلی‌گرم درلیتر NAA و ۱ میلی‌گرم درلیتر BAP بیشترین درصد ریشه‌زایی(۱۰۰درصد) را داشته و بیشترین میانگین تعداد ریشه را نیز در تیمار اول یعنی ۲ میلی‌گرم درلیتر NAA و ۰/۵ میلی‌گرم درلیتر BAP نشان داده است. جداکشت ریشه و ساقه کمترین درصد ریشه‌زایی و میانگین تعداد ریشه را داشتند بااین‌حال تیمار ۲ میلی‌گرم درلیتر NAA بدون حضور BAP هم در ریزنمونه ریشه و هم در ساقه توانسته است بالاترین درصد ریشه‌زایی و بالاترین میانگین تعداد ریشه را در این ریزنمونه‌ها القا کند.

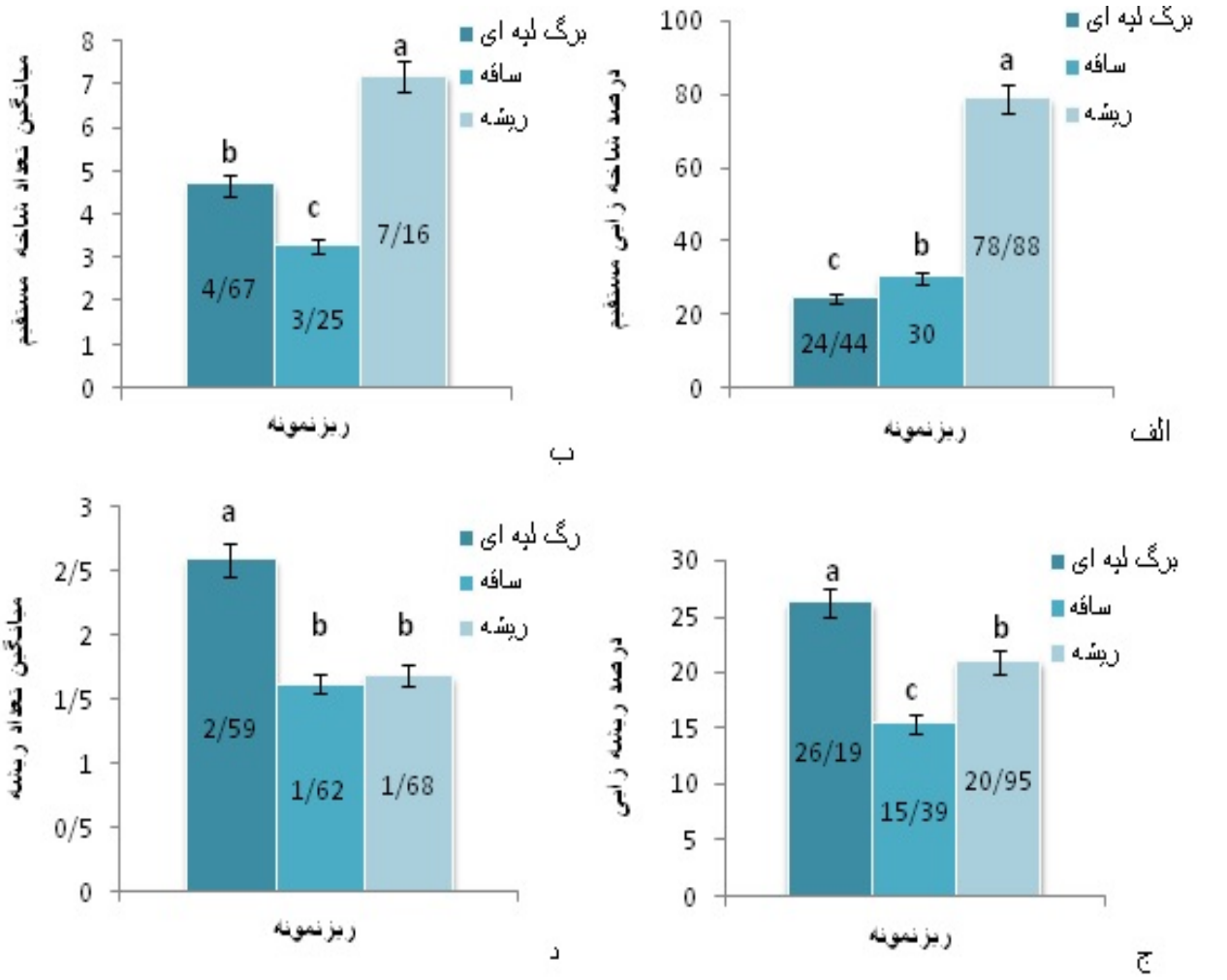
جدول۱- نتایج تجزیه واریانس اثر نوع ریزنمونه و تنظیم‌کننده‌های رشد NAA و BAP بر صفات مورد بررسی در آزمایش اول.

Table1- Analysis of Effect of explants and growth regulators NAA and BAP on traits in first test.

S.O.V	MS								
	پاسخ‌دهی Response	شاخه‌زایی مستقیم Direct shoot regeneration	میانگین تعداد شاخه Direct shoot regeneration	ریشه‌زایی Root production	میانگین تعدادریشه Root generation	کالوس‌زایی Callus induction	آغازش کالوس Callus initiation	بازززایی کالوس Callus regeneration	شاخه‌حاصل از کالوس shoot generation from callus
NAA	1.000*	1.000*	213.000*	1.000*	89.000*	5.000*	3.000*	6.000*	236.000*
BAP	.000*	.065*	26.000*	5.000*	166.000*	.000*	.000*	1.021*	22.070*
Explant	3.000*	20.000*	494.000*	.000*	37.000*	6.000*	3.000*	.000*	51.000*
BAP * Explant	.000*	.000*	28.000*	.000*	15.000*	.000*	.000*	.000*	10.000*
NAA * BAP	.000*	.000*	30.000*	.000*	20.000*	.000*	.000*	.000*	14.000*
NAA * Explant	1.000*	1.000*	59.072*	.000*	25.000*	.000*	.000*	.000*	24.000*
NAA * BAP * Explant	.000*	.000*	24.000*	.000*	7.000*	.000*	.000*	.000*	7.000*

*: در سطح ۵ درصد معنی‌دار

در بررسی اثر تنظیم‌کننده‌های رشد NAA وBAP بر تولید کالوس، پس از گذشت دو هفته تشکیل کالوس بر روی ریزنمونه ساقه در اکثر محیط‌های کشت به‌کاررفته به جز محیط‌های شاهد فاقد هورمون و در تعداد زیادی از ریزنمونه‌های برگ و ریشه قابل مشاهده بود. محاسبه درصد کالوس‌زایی و تجزیه آماری داده‌ها پس از یک ماه نشان داد که اثر تیمارهای NAA وBAP به‌تنهایی و همچنین اثرات متقابل آن‌ها معنی‌دار است. بنابراین در هرسه ریزنمونه ترکیب مؤثر NAA و BAP موجب کالوس‌زایی می‌شود. در آزمایشات کشت بافت، استفاده از بخش‌های هوایی برای باززایی شاخه‌های نوپدید رایج‌تر است و نتایج مطلوب‌تری نیز دارد. دراین‌میان قطعات هیپوکوتیل به دلیل قابلیت رشد سریع و عدم تمایزیابی شدید به سمت اندام‌ها بیشتر مورد استفاده قرار می‌گیرند (Sama *et al.*, 2012; Dixon *et al.*, 1996). درصد کالوس‌زایی و درصد آغازش کالوس ریزنمونه ساقه بیشترین مقدار بوده است (شکل۳-الف و ب). بیشترین کالوس‌دهی در تیمار ٤ میلی‌گرم درلیتر NAA و ۲ میلی‌گرم درلیتر BAP و تیمار ٤ میلی‌گرم درلیتر NAA و ۰/۵ میلی‌گرم درلیتر BAP ریزنمونه ساقه مشاهده شد. دو سطح ۲و٤ میلی‌گرم درلیتر NAA، برای اولین‌بار، در این آزمایش، بر روی ریزنمونه‌های گیاه ازمک مورد بررسی قرار گرفته است که تأثیر چشم‌گیری بر روی کالوس‌زایی ریزنمونه‌ها به‌ویژه جداکشت ساقه نشان داد.

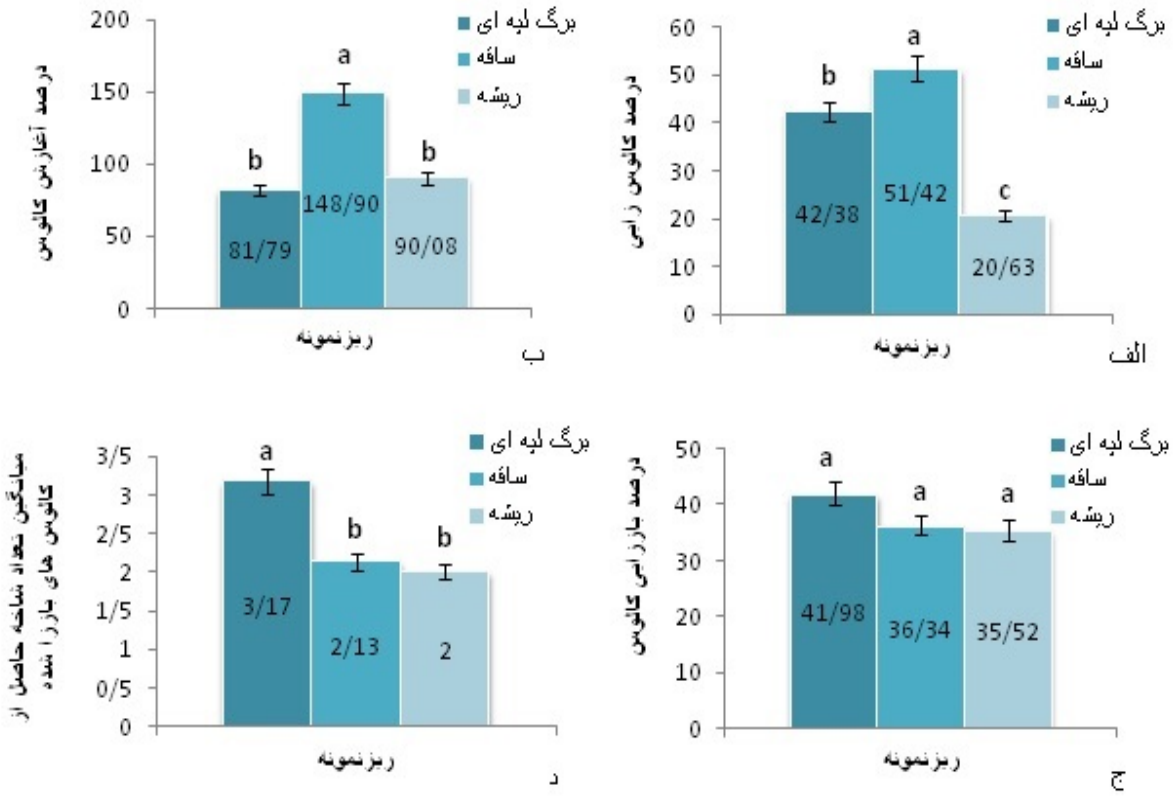


شکل۲ - الف) درصد شاخه‌زایی مستقیم، ب) میانگین تعداد شاخه مستقیم، ج) درصد ریشه‌زایی و د) میانگین تعداد ریشه در ریزنمونه‌های مختلف گیاه ازمک در غلظت‌های متفاوت NAA وBAP . حروف روی شکل برحسب آزمون دانکن در سطح ۵ درصد می‌باشد.

Figure 2 - a) Direct shoot regeneration rate, b) Direct shoot generation, c) Root production rate and d) Root generation on different concentrations of NAA and BAP in *Lepidium draba* explants . The letters on columns are based on Duncan test (p≤0.05).

در مطالعه حاضر با استفاده از تنظیم‌کننده‌های رشد NAA و BAP، ریزنمونه ساقه از نظر بیشترین میزان کالوس‌دهی به‌عنوان ریزنمونه بهتر پیشنهاد می‌شود؛ این درحالی است که Ghotbzadeh Kermani *et al.* (2012)، برگ لپه‌ای را در حضور این دو هورمون، ریزنمونه بهتر در تولید کالوس معرفی کردند؛ اما کهریزی و همکاران نیز اعلام کردند که محور زیر لپه و برگ لپه‌ای کلزا در محیط کشت بافت به ترتیب برای تولید کالوس و باززایی مستقیم مناسب هستند (Kahrizi *et al.*, 2010). همچنین بالاترین درصد کالوس‌زایی در *Brassica juncea* (۶۵/۵۵ درصد) در محور زیر لپه مشاهده شده است (Bano *et al.*, 2010). مشاهده شد که درصد

آغازش کالوس به ناحیه برش‌خورده و نوع ریزنمونه بستگی دارد و در این آزمایش بین صفر تا۲۸۰ درصد متغییر بوده است که بیانگر توانایی تولید بیش از یک کالوس، در یک ریزنمونه است.

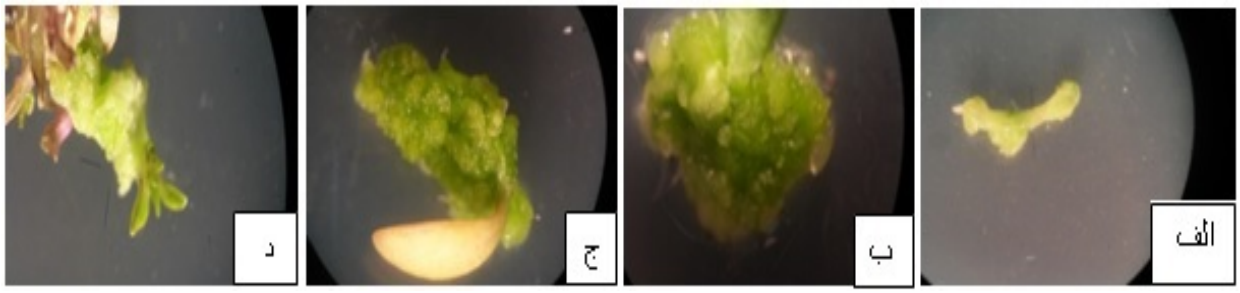


شکل۳ - الف) درصد کالوس‌زایی، ب) درصد آغازش کالوس، ج) درصد باززایی کالوس و د) میانگین تعداد شاخه حاصل از کالوس‌های باززاشده در ریزنمونه‌های مختلف گیاه ازمک در غلظت‌های متفاوت NAA و BAP. حروف روی شکل برحسب آزمون دانکن در سطح ۵ درصد می‌باشد.

Figure 3- a) Callus induction rate, b) Callus initiation rate, c) Callus regeneration rate and d) shoot generation from regenerated callus on different concentrations of NAA and BAP in *Lepidium draba* explants. The letters on columns are based on Duncan test (p≤0.05).

در ریزنمونه‌های ساقه، کالوس در دو سر برش‌یافته ریزنمونه تشکیل شد و در برخی از تیمارها به‌تدریج در طی چند روز سرتاسر ریزنمونه را فرا گرفت (شکل٤-الف و ب). در ریزنمونه‌های برگ لپه‌ای ابتدا کالوس در نزدیکی دمبرگ و در ادامه روی قسمت‌هایی از برگ که در تماس با محیط کشت بود، دیده شد (شکل٤-ج). قابل ذکر است که کالوس‌های تولیدشده در محیط کشت حاوی تنظیم‌کننده‌های رشد NAA و BAP اکثرا جنین‌زا بوده و پس از گذشت زمان، بدون انتقال به محیط باززایی، تولید نوساقه کردند (شکل٤-د). در مقایسه میانگین‌ها هر سه نوع

ریزنمونه از جهت درصد باززایی کالوس در یک گروه قرار گرفتند و اختلاف معنی‌داری بین آن‌ها مشاهده نشد (شکل۳-ج). بیشترین میانگین تعداد شاخه‌های حاصل از کالوس‌های باززاشده در ریزنمونه برگ لپه‌ای بوده است و ریزنمونه ریشه و ساقه در گروه دوم قرار گرفتند (شکل۳-د).



شکل٤- روند کالوس‌زایی و باززایی کالوس درگیاه ازمک در غلظت‌های متفاوت NAA وBAP . الف و ب) تشکیل کالوس در ریزنمونه ساقه، ج) تشکیل کالوس در ریزنمونه برگ لپه‌ای، د) باززایی کالوس.

Figure 4- Callus induction and callus regeneration in *Lepidium draba* on different concentrations of NAA and BAP, a&b) Callus induction in stem explants, c) Callus induction in cotyledon, d) Callus regeneration.

تیمار ۲ میلی‌گرم درلیتر NAA و ٤ میلی‌گرم درلیتر BAP و تیمار ۱ میلی‌گرم درلیتر NAA و ٤/٥ میلی‌گرم درلیتر BAP در برگ لپه‌ای حداکثر مقدار میانگین تعداد شاخه‌های حاصل از کالوس‌های باززاشده را نشان دادند. کالوس‌های حاصل از ریزنمونه ساقه نیز در اکثر تیمارها باززایی مطلوبی نشان دادند. تیمار ۲ میلی‌گرم درلیتر NAA و ۳ میلی‌گرم درلیتر BAP و تیمار ۲ میلی‌گرم درلیتر NAA و ٤ میلی‌گرم درلیتر BAP در ریشه میانگین تعداد شاخه‌های حاصل از باززایی کالوس بالایی داشتند. به‌طورکلی بیشترین درصد باززایی کالوس و میانگین تعداد شاخه‌های حاصل از کالوس‌های باززاشده در هر سه ریزنمونه در تیمارهای حاوی ۲،۱و٤ میلی‌گرم درلیتر NAA و سطوح مختلفBAP مشاهده شد.

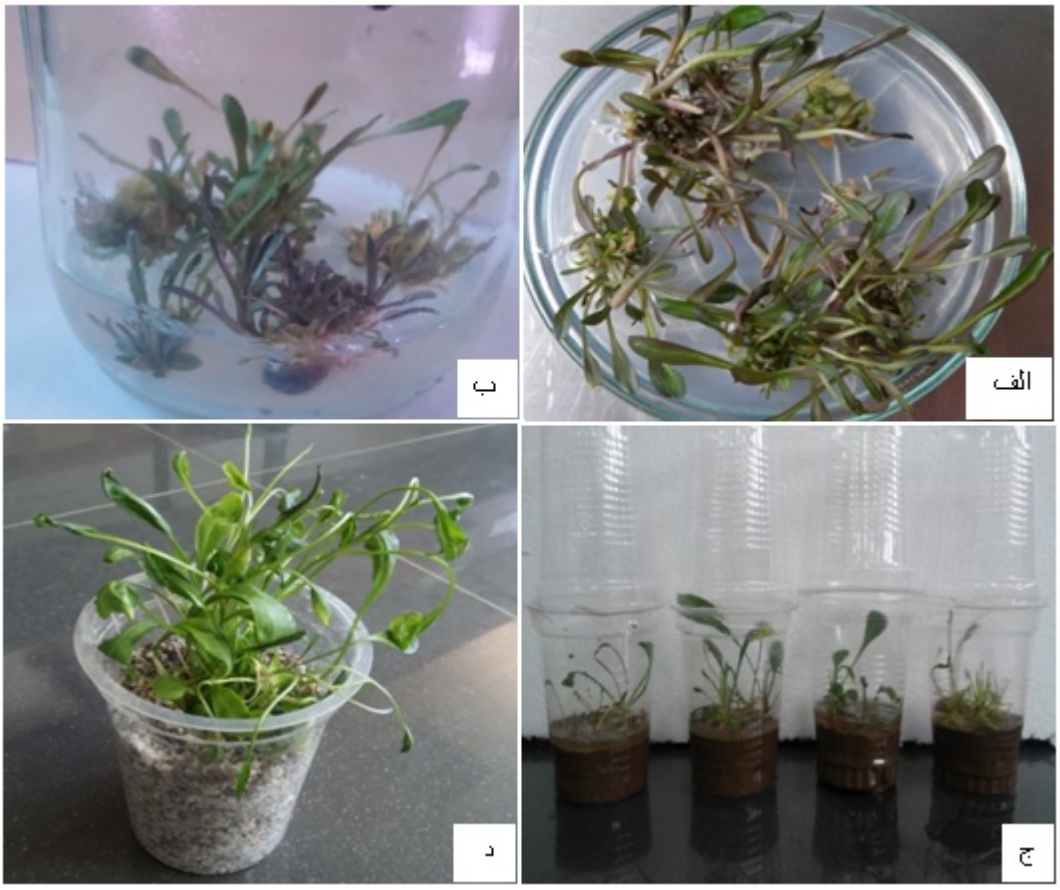
در بحث القای ریشه، هدف از انتقال شاخه به محیط ریشه‌زایی تحریک آن به ایجاد ریشه و تبدیل به گیاه کامل و کسب شرایط لازم برای انتقال به محیط آزاد است. تحریک ساقه به ایجاد ریشه در گونه‌های علفی به آسانی انجام می‌گیرد. به همین دلیل در گیاه ازمک ریشه‌زایی، تکامل و سازگاری با محیط به سهولت انجام شد (شکل٥). در تکثیر گیاهان دارویی، باززایی گیاه از کالوس کاربرد فراوانی دارد (Kokate, 2006). باززایی گیاه از کالوس در گیاهان دارویی چون *Echinacea pallid, Mentha arvensis, Dioscorea alata, Plumbago rosea* و چندین گونه گیاه دارویی دیگر گزارش شده است (Tripathi, 2003). همچنین بافت کالوس گیاهی علاوه بر ازدیاد گیاهان، قابلیت‌های متنوع دیگری

نیز دارد که از جمله می‌توان به استفاده از آن در انتقال ژن به گیاه و یا کاربرد کالوس در تهیه کشت‌های سوسپانسیون سلولی به‌منظور تولید متابولیت‌های ثانویه و یا ترکیبات مفید دیگر حاصل از آن اشاره نمود (Kayser and Quax, 2007). میزان تولید کالوس بستگی به ترکیب هورمون‌های به‌کاررفته در محیط کشت دارد وتعادل بین هورمون‌های اکسین و سیتوکینین یک فاکتور مورفوژنتیکی تعیین‌کننده و مهم به شمار می‌رود (Abbasi *et al*., 2007).

اکسین و سیتوکنین به‌عنوان تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی، فاکتورهای کلیدی برای کنترل تقسیم سلولی در شرایط کشت بافت می‌باشند. استفاده از BAP به‌عنوان سیتوکنین و 2,4-D به‌عنوان اکسین به‌منظور تولید کالوس در کشت بافت گیاهان زیادی گزارش شده است (Awale *et al*., *2006*). همچنین گزارش شده است که ترکیب هورمون 2,4-D و سیتوکینین در تسهیل القای کالوس و حفظ آن موثر است (Abd Elaleem *et al*., 2009). بسته به گونه گیاهی، نوع و سن ریزنمونه‌های مورد استفاده، غلظت به خصوصی از این هورمون‌ها بیشترین تأثیر را در کالوس‌زایی گیاهان نشان داده است.

برای نمونه، He *et al*. (2006) اثر هورمون‌های رشد گیاهی را بر کالوس‌زایی گیاه دارویی باباآدم بررسی کردند و نشان دادند که 2,4-D با غلظت ۲ میلی‌گرم در لیتر و BAP در دامنه غلظتی ۱ تا ۲ میلی‌گرم در لیتر، بیشترین درصد فراوانی (100 درصد) را برای تولید کالوس داشتند. همچنین در گیاه *Ceropegia candelabrum* L. ترکیبی از 2,4-D و BAP برای القای کالوس مؤثر واقع شد (Beena and Martin, 2003).

کالوس‌زایی توسط ترکیبی از این دو هورمون گیاهی در گیاهان دیگری مانند *Curcuma longa* L. و *Kaempferia galanga* L. نیز مورد بررسی قرار گرفته و نتایج مشابهی را داشته است (Saenouk, 2011). تنوع در فراوانی تولید کالوس در پاسخ به سطوح مختلف هورمونی، می‌تواند به دلیل تمایز در بیان ژن‌های کنترل‌کننده تولید کالوس باشد. همچنین ممکن است که در بعضی از سطوح هورمونی مورد استفاده، برخی از ژن‌های مسئول در سنتز کالوس، به‌طور کامل بیان نشوند (Mahmood *et al*., 2012). به‌علاوه، گزارش شده است که غلظت‌های خیلی زیاد 2,4-D ممکن است برای بیان ژن‌های درگیر در تقسیم سلولی و تمایززدایی بافت، مهارکننده باشد (Mahmood *et al*., 2012). از جمله عواملی که در تولید کالوس موثرند، ژنوتیپ، تنظیم‌کننده‌های رشد، محیط کشت، نوع هیدرات کربن، نوع جداکشت، سن جداکشت و شرایط محیطی می‌باشد. نتایج نشان داده است که وابستگی خاص القای کالوس و باززایی گیاه به ژنوتیپ اجتناب‌ناپذیر و کلی است و القای کالوس و باززایی گیاه با ژنوتیپ گیاه تغییر می‌کند (Han *et al*., 2011).



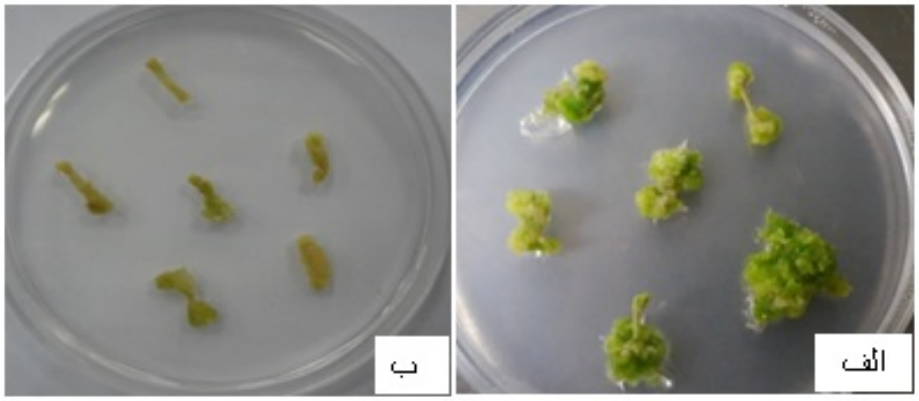
شکل۵- ساقه‌زایی مستقیم در غلظت‌های متفاوت NAA وBAP و ایجاد گیاهچه ازمک. الف) ساقه‌زایی مستقیم، ب) گیاه در محیط توسعه، ج) گیاه کامل در محیط پیت ماس، د) گیاه سازگارشده با محیط.

Figure 5- Shoot regeneration on different concentrations of NAA and BAP and regenerated plantlet of *Lepidium draba.* a) Direct shoot regeneration, b) Elongation, c) Plant in peat moss, d) Adapted plant to environment.

میزان تنظیم‌کننده‌های خارجی و مواد مغذی موجود جهت القای کالوس به رقم گیاهی وابسته است؛ بنابراین ترکیبات محیط کشت وابسته به ژنوتیپ گیاهی تغییر می‌کند (Han *et al.*, 2011). رشد کالوس در یک گونه گیاهی بر اساس نوع جداکشت آن گیاه متفاوت بوده و علت آن به درستی مشخص نشده است. توانایی القای کالوس وباززایی با سن برگ نیز تحت تأثیر قرار می‌گیرد. معمولا برگ‌های جوان برای باززایی مناسب ترند (Magyar-tabori *et al.*, 2010).

تحقیق حاضر روش ساده‌ای برای القاء کالوس توسط هورمون‌های گیاهی 2,4-D و BAP نیز ارائه می‌دهد. به‌منظور تولید کالوس سه ریزنمونه برگ لپه‌ای، ساقه و ریشه، تحت دو تیمار نوری، تاریکی مطلق و ۱۶ ساعت دوره روشنایی کشت شدند. پایش کشت‌های حاوی

سطوح مختلف از دو هورمون 2,4-D وBAP پس از گذشت یک ماه انجام شد. بررسی‌های اولیه نشان داد، در مقایسه با تیمار شاهد، تیمارهای حاوی 2,4-D در هر سه ریزنمونه، پس از گذشت یک ماه، عموما باززایی مستقیم نداشته و بیشتر کالوس‌زایی دیده شد؛ اما در تیمارهایی که صرفا حاوی BAP بودند، باززایی مستقیم هم مشاهده شد. کالوس‌ها در کلیه نمونه‌ها ابتدا در محل برش ریزنمونه و به‌تدریج در طول آن ظاهر شدند. زمان بنیان‌گذاری کالوس در دوره نوری ۱۶ ساعت روشنایی، هفته اول پس از کشت و رنگ این کالوس‌ها سبز روشن بود. این درحالی است که نمونه‌ها در تاریکی مطلق در هفته سوم و چهارم پس از کشت شروع به تولید کالوس‌هایی سخت‌تر، کم حجم‌تر و کرم رنگ نمودند (شکل ٦). طبق گزارشی از Gasper *et al.* (1985)، نور، فعالیت IAA اکسیداز را افزایش می‌دهد و باعث تغییر تعادل اکسین/سیتوکینین و کاهش بنیان‌گذاری و رشد کالوس می‌شود.



شکل ٦- کالوس‌زایی در غلظت‌های متفاوت 2,4-D و BAP در گیاه ازمک. الف) در دوره نوری ۱٦ساعت روشنایی ب) درتاریکی مطلق.

Figure 6- Callus induction in *Lepidium draba* on different concentrations of 2,4-D and BAP. a) In 16 h photoperiod, b) In darkness.

در این آزمایش بالاترین مقدار صفات مورد بررسی، در تیمار ۱٦ ساعت دوره روشنایی مشاهده شد و عامل نور در حضور تنظیم‌کننده‌های رشد 2,4-D و BAP، فاکتوری موثر بر تولید و رشد کالوس در هر سه ریزنمونه از گیاه ازمک شناخته شد. نتایج حاصل از تجزیه واریانس داده‌های مربوط به درصد کالوس‌زایی، میانگین وزن تر کالوس، درصد باززایی کالوس و میانگین نرخ رشد کالوس، به‌طورجداگانه، مشخص نمود که اثر هر یک از تنظیم‌کننده‌های رشد، ریزنمونه و فاکتور نور به‌تنهایی و همچنین اثرات متقابل آن‌ها، همگی در سطح احتمال ۵ درصد معنی‌دار می‌باشند (جدول۲). مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون دانکن در سطح احتمال ۵ درصد نشان داد درصد کالوس‌زایی و درصد باززایی کالوس در ریزنمونه‌های برگ و

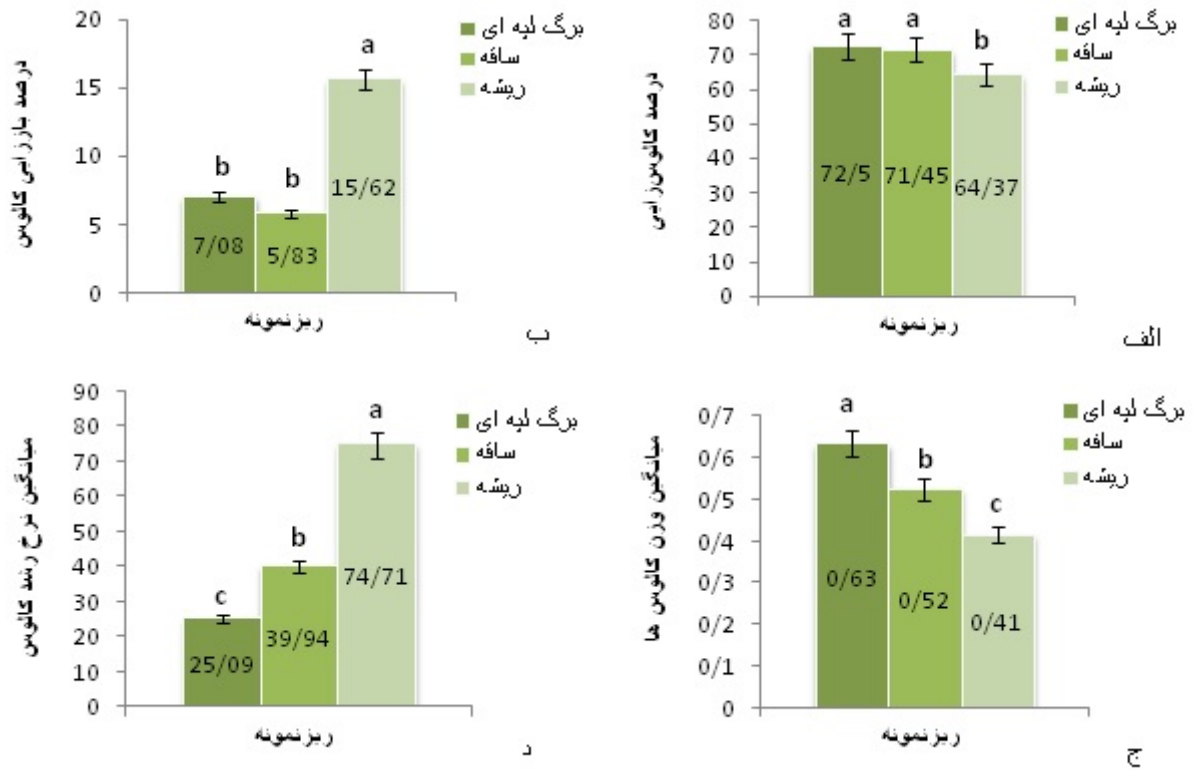
ساقه تفاوت معنی‌داری نداشته و در یک گروه قرار می‌گیرند. درصد کالوس‌زایی در برگ و ساقه نسبت به ریشه بیشتر بوده (شکل۷-الف)، درحالی‌که درصد باززایی کالوس‌های ریشه بیشتر از برگ و ساقه است (شکل۷-ب). در مقایسه میانگین وزن کالوس‌های سه ریزنمونه، بیشترین میانگین وزن کالوس در برگ و کمترین آن در ریشه بود (شکل۷-ج)، درحالی‌که مقایسه میانگین نرخ رشد کالوس در سه ریزنمونه نشان داد که، بیشترین میانگین نرخ رشد را ریشه و کمترین آن را برگ داشته است (شکل۷-د). وزن اولیه ریزنمونه‌های ریشه کمتر از ریزنمونه‌های برگ بوده است بنابراین طبیعی است که میانگین نرخ رشد در ریشه بیشتر از برگ و در حدود سه برابر آن باشد درحالی‌که میانگین وزن کالوس در برگ بیشتر از ریشه است.

جدول۲- نتایج تجزیه واریانس اثر نوع ریزنمونه و تنظیم‌کننده‌های رشد 2,4-D و BAP بر صفات مورد بررسی در آزمایش اول.

Table2- Analysis of Effect of explants and growth regulators 2,4-D and BAP on traits in first test.

S.O.V	MS			
	کالوس زایی Callus induction	باززایی کالوس Callus regeneration	وزن تر کالوس Callus weight	نرخ رشد کالوس Callus growth rate
Light	2.099*	5.000*	46.000*	382515.000*
2,4-D	27.000*	.000*	12.001*	91400.000*
BAP	1.000*	.000*	2.000*	26437.000*
Explant	.000*	.000*	1.000*	77826.000*
2,4-D * BAP	.000*	.000*	.000*	1962.073*
BAP * Explant	.000*	.077*	.085*	4835.000*
Light * BAP	.074*	.000*	1.000*	19309.000*
2,4-D * Explant	.000*	.000*	.000*	21156.000*
Light * 2,4-D	.000*	.000*	6.000*	54015.000*
Light * Explant	.000*	.000*	.000*	56281.000*
2,4-D * BAP * Explant	.000*	.000*	.000*	1080.000*
Light * D * BAP	.000*	.000*	.000*	1396.000*
Light * BAP * Explant	.000*	.000*	.000*	4661.000*
Light * 2,4-D * Explant	.000*	.000*	.000*	19116.000*
Light * 2,4-D * BAP * Explant	.000*	.000*	.000*	1139.000*

*: در سطح ۵ درصد معنی دار



شکل۷ - الف) درصد کالوس‌زایی، ب) درصد باززایی کالوس، ج) میانگین وزن تر کالوس و د) میانگین نرخ رشد کالوس در ریزنمونه‌های مختلف گیاه ازمک در غلظت‌های متفاوت 2,4-D وBAP . حروف روی شکل برحسب آزمون دانکن در سطح ۵ درصد می‌باشد.

Figure 7- a) Callus induction rate, b) Callus regeneration rate, c) Callus weight and d) Callus growth rate on different concentrations of 2,4-D and BAP in *Lepidium draba* explants. The letters on columns are based on Duncan test (p≤0.05).

بالاترین مقدار صفات مورد بررسی، در تیمار ۱۶ ساعت دوره روشنایی مشاهده شد. در این تیمار درصد کالوس‌زایی در اکثر تیمارهای اعمال‌شده بر ریزنمونه برگ وساقه بالا بوده و اختلاف معنی‌داری نداشتند، اما بیشترین وزن کالوس در ریزنمونه برگی و درغلظت ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D و۳ میلی‌گرم در لیتر BAP و بیشترین نرخ رشد کالوس در ریزنمونه ریشه و در غلظت ۰/۵ یا ۱ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D و۳ میلی‌گرم در لیتر BAP و بیشترین فراوانی باززایی کالوس در ریزنمونه ریشه و درغلظت ۲ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D و۲ میلی‌گرم در لیتر BAP و یا تنها در غلظت ۳ میلی‌گرم در لیتر BAP بوده است. با توجه به نتایج حاصل از کشت سه نوع ریزنمونه برگ لپه‌ای ، ساقه و ریشه در سطوح مختلف 2,4-D و BAP مشخص شد، تیمار ۱۶ ساعت دوره روشنایی و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D و۳ میلی‌گرم در لیتر BAP در جداکشت برگ لپه‌ای گیاه ازمک جهت کالوس‌زایی، مناسب است؛ چرا که این تیمار علاوه بر تولید بیشترین وزن کالوس از جمله تیمارها با بیشترین فراوانی کالوس‌زایی است.

اگرچه باززایی از طریق کالوس درتولید انبوه گیاهان اهمیت قابل ملاحظه‌ای دارد اما به دلیل بالا بودن احتمال وقوع تنوع سوماکلونی و صرف زمان نسبتاً طولانی‌تر برای تکثیر رویشی با هدف حفظ ژنوتیپ‌های معین، چندان مناسب نیست (Dixon *et al*., 1996; Debnath *et al*., 2006). با این‌حال بافت کالوس گیاهی در انتقال ژن به گیاه، در تهیه کشت‌های سوسپانسیون سلولی به‌منظور تولید متابولیت‌های ثانویه و... کاربرد دارد.

بر اساس نتایج حاصل از این بررسی چنانچه در تحقیقی هدف از کشت بافت ازمک ایجاد تنوع، جهت امکان گزینش صفات باشد، بهتر است که از کشت ریزنمونه برگ لپه‌ای و ساقه استفاده گردد. چرا که گذر گیاه از مرحله کالوس موجب تنوع می‌شود و کشت ریزنمونه برگ لپه‌ای و ساقه در این گیاه برای تولید کالوس مناسب‌تر است، پس برای ایجاد تنوع در گیاهچه‌های باززایی‌شده کشت ریزنمونه برگ لپه‌ای و ساقه توصیه می‌شود. ولی چنانچه حفظ ریخته ژنتیکی در مراحل تراریختی و ریزازدیادی مورد نظر باشد، بهتر است که از کشت ریزنمونه ریشه استفاده گردد، چرا که در گیاه ازمک ریزنمونه ریشه دارای درصد باززایی مستقیم بالایی می‌باشد. در تحقیق حاضر گیاه دارویی ازمک قابلیت باززایی مستقیم و تولید کالوس قابل توجهی را در محیط کشت بافت نشان داد که با نتایج Ghotbzadeh Kermani *et al*. (2012)، مطابقت دارد.

با توجه به اینکه ریزنمونه‌های گیاه دارویی ازمک، به‌ویژه جداکشت ریشه، درصد باززایی بالایی نه‌تنها در تیمارهای هورمونی مختلف بلکه در محیط شاهد فاقد هورمون نشان داده‌اند، می‌توان از این قابلیت ویژه به‌منظور بررسی امکان انتقال ژن به گیاه ازمک در روش‌های بدون نیاز به کشت بافت نیز بهره برد.

منابع

Abbasi B, Saxena PK, Murch SJ, Liu CZ (2007). Echinacea biotechnology: Challenges and opportunities. In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant 43: 481-492.

Abd Elaleem KG, Modawi RS, Khalafalla MM (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.

Akbas F, Isikalan C, Namli S (2009). Callus induction and plant regeneration from different explants of *Actinidia deliciosa*. Applied Biochemistry Biotechnology158: 470-475.

Awale S, Lu J, Kalauni SK, Kurashima Y, Tezuka Y, Kadota S, Esumi H (2006). Identification of arctigenin as an antitumor agent having the ability to eliminate the tolerance of cancer cells to nutrient starvation. Cancer Research 66: 1751-1757.

Azizi M, Omidbeigi R (2002). The investigation of *Hypericum perforatum* L. in the in vitro condition in production of hypericin and other secondary metabolites. Pajouhesh and Sazandegi Journal 40: 15-45 (In Farsi).

Ball PW (1993). Cardaria. Page 402 in T. G. Tutin, N. A.Burges, A. O. Chater, J. R. Edmondson, V. H. Heywood, D.M. Moore, D. H. Valentine, S. M. Walters, and D. A.

Webb,eds. Flora Europaea, 2nd ed., vol. I, Psilotaceae to Platanaceae. Cambridge University Press, Cambridge, UK.

Bano R, Haroon khan M, Sherkhan R, Rashid H, Swati ZA (2010). Development of an Efficient Regeneration Protocol for Three Genotypes of *Brassica juncea*. Pakistan Journal of Botany 42: 963-969.

Beena MR, Martin KP (2003). In vitro propagation of the rare medicinal plant *Ceropegia candelabrum* L. through somatic embryogenesis. In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant 39: 510-513.

Bhaskaran S, Smith RH (1990). Regeneration in cereal tissue culture: A review. Crop Science 30: 1329-1336.

Bones AM, Rossiter JT (2006). The enzymic and chemically induced decomposition of glucosinolates. Phytochemistry 67: 1053-1067.

Chehreghani AK, Malayeri B (2007). Removal of Heavy Metals by Native Accumulator Plants. International Journal of Agricalture and Biology 9: 462-465.

Cheraghi A, Lorestani B, Yousefi N (2011). Introduction of Hyperaccumulator Plants with Phytoremediation Potential of a Lead-Zinc Mine in Iran.World Academy of Science, Engineering and Technology 77: 163-168.

Debnath M, Malik CP, Bisen PS (2006). Micropropagation: a tool for the production of high quality plant –based medicines. Current Pharmaceutical Biotechnology 7: 33-49.

Del Carmen Martínez-Ballesta M, Moreno DA, Carvajal M (2013). The physiological importance of glucosinolates on plant response to abiotic stress in Brassica. International journal of molecular science 14: 11607-11625.

Dixon RA, Gonzales RA (1996). Plant cell culture: a practica approach. IRL press, Oxford, UK.

Dunwell JM (1976). A comparative study of environmental and developmental factors which influence embryo induction and growth in cultured anthers of *Nicotiana tabacum*. Environmental and Experimental Botany 16: 109-118.

Fahey JW, Xavier H, Dolan PM, Kensler TW, Scholtus I, Stephenson K, Talalay P, Lozniewsk A (2002).Sulforaphane inhibits extracellular,intracellular,and antibiotic-resistant strains of *Helicobacter pylori* and prevents benzo[a]pyreneinduced stomach tumors.Medical sciences 99: 7610-7615.

Farsi M, Zolala J (2003). Introduction to Plant Biotechnology, 392, Ferdowsi University of Mashhad publication, Iran, 495 pp.

Gasper Z, Penel C, Castillo FJ, Greppin H (1985). A two step control of basic and acidic peroxidases and its significance for growth and development. Physiologia Plantarum 64: 418-423.

Ghasemi BJ, Karlov GI, Ahmadikhah A (2007). Effects of genotype, explant type and nutrient medium components on canola (*Brassica napus* L.) shoot *in vitro* organogenesis. African Journal of Biotechnology 6: 861-867.

Ghotbzadeh Kermani S, Pourseyedi Sh, Mohamadi GhA, Moieni A, Baghizadeh A (2012). Regeneration of White top (*Cardaria draba* L.) using Tissue Culture. Journal of Agricultural Biotechnology 7: 133-154 (In Farsi).

Guo DP, Zhu ZJ, Hu XX, Zheng SJ (2005). Effect of cytokinins on shoot regeneration from cotyledon and leaf segment of stem Mustard (*Brassica juncea* var. tsatsai). Plant Cell, Tissue and Organ Culture 83: 123-127.

Han Y, Jin X, Wu F, Zhang G (2011). Genotypic differences in callus induction and plant regeneration from mature embryos of barley (*Hordeum vulgare* L.). Journal of Zhejiang University Science 12: 399-407.

He WT, Hou SW, Wang CY (2006). Callus induction and high-frequency plant regeneration from hypocotyls and cotyledon explants of *Arctium lappa* L. In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant 42: 411–414.

Ivarson E, Ahlman A, Li X, Zhu LH (2013). Development of an efficient regeneration and transformation method for the new potential oilseed crop *Lepidium campestre*. BMC Plant Biology 13: 115-123.

Jacobs J (2007).Ecology and Management of Whitetop. Montana Invasive Species Technical Notes.

Jain RK, Chowdhury JB, Sharma DR, Friedt W (1988). Genotypic and media effects on plant regeneration from cotyledon explant cultures of some Brassica species. Plant Cell,Tissue and Organ Culture 14: 197-206.

Jalas J, Suominen J, Lampinen R (1996). Atlas Florae Europaeae - Distribution of vascular plants in Europe. Cruciferae (Ricotia to Raphanus). Helsinki University Printing House, Helsinki, Finland 11: 310 pp.

Kayser O, Quax WJ (2007). Medicinal Plant Biotechnology, Wiley-Vch Verlag GmbH & Co.

Kahrizi D, Salmanian A, Zebarjadi AR (2010). Effect of cultivar and density of cultured cotyledons on shoot regeneration in rapeseed (*Brassica napus* L.). Journal of Agriculture Biotechnology 9: 1-6 (In Farsi).

Khawar KM, Sarýhan E, Sevimay C, Cocu S, *et al*. (2005). Adventitious shoot regeneration and micropropagation of *Plantago lanceolata* L. Periodicum Biologorum 107: 113-116.

Koie M, Rechinger RH (1954-55). Beitragz urF loraS uidwest-Irans. II.D ansk.B ot. A rkiv. 15,1 .

Kokate CK (2006). Medicinal plant biotechnology, CBS publisher and distributors.

Magyar-Tabori K, Dobranszki J, Teixeira DA, Silva JA, *et al*. (2010). The role of cytokinins in shoot organogenesis in apple. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 101: 251-267.

Mahmood I, Razzaq A, Khan ZUD, Hafez IA, Kaleem S (2012). Evaluation of tissue culture responses of promising Wheat (*Triticum aestivum* L.) cultivars and development of efficient regeneration system. Pakistan Journal of Botany 44: 277-284.

Mohlenbrock RH(2013). Vascular Fiora of Illinois. Southern Illinois University Press.Brassicaceae-Mustard Family. pp 172.

Mojab F, Kamalinejad M, Ghaderi N, Vahidipour HR (2003). Phytochemical screening of some species of Iranian plants. Iranian Journal of Pharmaceutical Research 2: 77-82.

Murashige T, Skoog F (1962). A revised medium for rapid growth of and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiologia Plantarum 15: 473-479.

Neibaur I, Gallo M, Altpeter F (2008). The effect of auxin type and cytokinin concentration on callus induction and plant regeneration frequency from immature inflorescence segments of *seashore paspalum* (Paspalum vaginatum Swartz). In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant 44: 480-486.

Nouri J, Lorestani B,Yousefi N, Khorasani N, Hasani N, Seif A, Cheraghi FM (2011). Phytorimediation potential of native plantsgrown in the vicinity of Ahangaran lead-zinc mine (Hamedan,Iran).Environ Earth Science 62: 639-644.

Poizerova H, Greplova M, Frcek J (2011).In vitro multiplication of *Lepidium meyenii* Walp.Journal of Applied Botany and Food Quality 48: 1-5.

Powell EE, Hill GA, Juurlink BHJ, Carrier DJ (2005a). Glucoraphanin extraction from *Cardaria draba*: Part 1.Optimization of batch extraction. Journal of Chemical Technology and Biotechnology 80: 985-991.

Powell EE, Hill GA, Juurlink BHJ, Carrier DJ (2005b). Glucoraphanin extraction from *Cardaria draba*: Part 2.Countercurrent extraction, bioactivity and toxicity testing. Journal of Chemical Technology and Biotechnology 80: 992-997.

Saenouk P (2011). Callus induction and plant regeneration from leaf explant of *Cornukaempferia aurantiflora* Mood & Larsen. Pakistan Journal of Botany 43:2415-2418.

Sama AE, Hughes HG, Abbas MS, Shahba MA (2012). An Efficient In Vitro Propagation Protocol of Cocoyam [*Xanthosoma sagittifolium* (L) Schott]. The Scientific World Journal Article 10 pp.

Tripathi L, Tripathi JN (2003). Role of biotechnology in medicinal plants. Tropical Journal of Pharmaceutical Research 2: 243-253.

Westhof E (1999). Practical Statistics for Experimental Biologists. 2nd edition by Wardlaw A.C. John Wiley & Sons, Chichester P. 255.

Callus Induction and Direct Shoot Regeneration in *Lepidium draba* L. Explants

Zinhari Z.[1], Pourseyedi Sh.[2*], Zolala J.[3]

[1] M.Sc, Shahid Bahonar University of Kerman, Iran.
[2] Associate professor, Department of Biotechnology, Shahid Bahonar University of Kerman, Iran.
[3] Assistant professor, Department of Biotechnology, Shahid Bahonar University of Kerman, Iran.

Abstract

Lepidium draba through the production of anti-cancer and anti-microbial compound, sulforaphane, is considered a valuable medicinal plants.Therefore, optimization of in vitro tissue culture to facilitate genetic transformation and improvement of traits in this plant is important. This study was conducted, by cotyledon, stem and root explants in MS medium in the form of two separate tests. Data were analyzed in a factorial experiment based on completely randomized design. In the first experiment with different concentrations of growth regulators NAA and BAP, the highest response rate, direct shoot regeneration rate and direct shoot generation were related to root explants. The highest root production rate and root generation were showed in cotyledons explants. 1 mgl^{-1} BAP without NAA induced the highest direct shoot generation in root explants. Cotyledons explants in 2 mgl^{-1} NAA and 0.5 mgl^{-1} BAP produced the highest Root production rate and the highest root generation. Callus induction rate and callus initiation of stem explants were more than others, but the callus regeneration rate in three studied explants showed no significant difference. The highest shoot generation from regenerated callus was observed in the cotyledons explants. The second experiment with a combination of different concentrations of 2,4-D and BAP, under the influence of two treatments darkness and 16h photoperiod was performed. The highest investigated traits were in the 16h photoperiod. Cotyledons and stem explants were showed the highest callus induction rate and leaf explants showed the greatest weight of callus; While the highest callus regeneration rate and callus growth rate were obtained from the root explants. From leaf explants, the highest callus weight was obtained from 0.5 mgl^{-1} 2,4-D with 3 mgl^{-1} BAP and the most growth rate of callus was obtained from 0.5 and 1 mgl^{-1} 2,4-D and 3 mgl^{-1} BAP. Also the combination of 2 mgl^{-1} 2,4-D with 2 mgl^{-1} BAP and 3 mgl^{-1} BAP, produced the highest callus regeneration in root explants.

Key words: ***Callus induction, Direct shoot regeneration, Lepidium draba, Tissue culture optimization.***

[*] Corresponding author: Sh. Pourseyedi Tel:09133430389 Email: spseyedi@uk.ac.ir