بررسی میزان کالوس‌زایی و باززایی گلرنگ (*Carthamus tinctorius* L.) با استفاده از کشت قطعات هیپوکوتیل و کوتیلدون

جواد معتمدی[1و2]، علیرضا زبرجدی*[3و4]، دانیال کهریزی[3و4]، علی‌هاتف سلمانیان[5] و ژاله سهیلی‌خواه[6]

[1]دانشجوی کارشناسی ارشد اصلاح نباتات، گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه رازی کرمانشاه
[2]دانشگاه آزاد اسلامی، واحد کرمانشاه، باشگاه پژوهشگران جوان، کرمانشاه، ایران
[3] استادیار گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه رازی کرمانشاه
[4] استادیار گروه پژوهشی بیوتکنولوژی مقاومت به خشکی، دانشگاه رازی کرمانشاه
[5] دانشیار پژوهشگاه ملی تحقیقات مهندسی ژنتیک و زیست فن‌آوری، تهران
[6] کارشناس ارشد زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه رازی کرمانشاه

چکیده

گیاهان روغنی بعد از غلات، به عنوان دومین منبع تامین‌کننده کالری برای جوامع بشری محسوب می‌شوند. گیاه گلرنگ به دلیل داشتن روغنی با کیفیت و محتوای بالای اسیدهای چرب، مورد توجه می‌باشد. به منظور بهینه‌سازی کشت بافت گلرنگ، آزمایشی به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی در سه تکرار، طی سال‌های 88-87 انجام گرفت. در این آزمایش، صفات کالوس‌زایی و باززایی نوساقه ریزنمونه‌های کوتیلدون و هیپوکوتیل ارقام Dincer و سینا در غلظت‌های مختلف هورمون‌های NAA و BAP روی محیط پایه MS، مورد بررسی قرار گرفت. بررسی اثرات متقابل در خصوص صفات فوق نشان داد که ارقام مورد بررسی در این آزمایش در واکنش به هورمون NAA به طور مستقل عمل کرده‌اند. مقایسه میانگین‌ها برای صفت کالوس‌زایی نشان داد که بهترین محیط‌ها برای کالوس‌زایی ریزنمونه‌ها که بیشترین درصد تولید کالوس را داشته‌اند ترکیبات (0/5 BAP و 0/5 NAA) میلی‌گرم در لیتر و (1 BAP و 1 NAA) میلی‌گرم در لیتر به‌ترتیب با میانگین‌های 94/33 و 97 درصد بوده است. علاوه بر این، رقم Dincer و ریزنمونه هیپوکوتیل واکنش بهتری را نسبت به کالوس‌زایی از خود بروز داده‌اند. در خصوص صفت باززایی، بیشترین درصد باززایی در ترکیب (2 BAP و 0/1 NAA) به میزان 35/07 درصد، در رقم Dincer و ریزنمونه کوتیلدون به‌دست آمد.

واژه های کلیدی: *گلرنگ، کالوس‌زایی، باززایی، ریزنمونه، کشت بافت*

* نویسنده مسئول: علیرضا زبرجدی تلفکس: 0831-8323731 Email:zebarjadiali@yahoo.com

مقدمه

گلرنگ (*Carthamus tinctorius* L.) گیاهی روغنی از خانواده *Asteracea* است. اهمیت گیاه گلرنگ به دلیل روغن استحصال شده از آن است زیرا دارای درصد بالایی از اسیدهای چرب غیراشباع تک زنجیره و چند زنجیره مانند اولئیک اسید و لینولئیک اسید همراه با سطوح بالای آلفا توکوفرول[1] (بیش از 400 میلی گرم در هر کیلوگرم بذر) است (Singh and Nimbkar, 2006). گلرنگ به عنوان مهم‌ترین نمونه از یک گیاه زراعی با تنوع در اسیدهای چرب شناخته شده است (Knowles, 1989). سطح زیر کشت گلرنگ در سال 2008 در دنیا 735918 هکتار با عملکرد 845/2 کیلوگرم در هکتار گزارش شده است، در حالی‌که در ایران سطح زیر کشت در سال 2008 حدود 1000 هکتار با میانگین عملکرد 500 کیلوگرم در هکتار بوده است (FAO, 2008). در این زمینه، گیاه گلرنگ پتانسیل زیادی برای ایجاد تغییرات ژنتیکی و القاء صفات مطلوب از طریق سیستم‌های کشت بافت دارد و دستورالعمل‌های ابداع شده برای آن ساده، سریع و کارآمد بوده و امکان باززایی از بافت‌های رویشی را همانند بافت‌های زایشی از طریق اندام‌زایی و جنین‌زایی سوماتیکی به وجود آورده است (Sujatha, 2002). در گلرنگ، فراوانی تغییرات ایجاد شده در محیط کشت در کشت‌های سوماتیکی بسیار بالا است. از این رو، ارزیابی تنوع آندروکلونال[2] امکان پذیر شده و می‌تواند در جداسازی ارقام مفید به‌کار رود (Seeta *et al.*, 2000). جداسازی لاین‌هایی با برتری عملکرد 30 درصد از طریق روش‌های کشت بافت در گیاه گلرنگ گزارش شده است (Sujatha, 2002). اولین گزارش در مورد کشت بافت گیاه گلرنگ توسط George and Rao (1982) منتشر شد. آنها باززایی مستقیم ریز نمونه‌های مریستمی را در محیط *in vitro* مورد مطالعه قرار دادند. در تحقیقی دیگر، باززایی و تکثیر ارقام گلرنگ در محیط *in vitro* مورد مطالعه قرار گرفت (Orlikowska and Dyer, 1993). آن‌ها دریافتند که بیشترین میزان تولید کالوس در غلظت 1 میلی‌گرم در لیتر NAA رخ داده است و موثرترین ترکیب هورمونی جهت باززایی مستقیم، ترکیب 0/1 میلی‌گرم در لیتر NAA و 1 میلی‌گرم در لیتر TDZ بوده است. در مورد کالوس‌زایی و باززایی مستقیم نیز، ریز نمونه کوتیلدون بهتر از برگ واکنش نشان می دهد. در سال 1999 کشت *in vitro* گیاه گلرنگ به لحاظ جنبه‌های مختلف مانند بهینه‌سازی شرایط رشد، تکثیر و اندام‌زایی از ریزنمونه‌های کوتیلدون، هیپوکوتیل، ریشه و برگ رقم "Bhima" مورد مطالعه قرار گرفت (Nikam and Shitole, 1999). آن‌ها مشاهده کردند که در ریز نمونه

[1] -α-tocopherol

[2] - Androclonal variation

کوتیلدون، فراوانی باززایی در غلظت‌های مختلف BAP نسبت به سایر ریزنمونه‌ها بیشتر است. در تحقیقی دیگر، اندام‌زایی مستقیم ساقه و باززایی گیاه کامل در ژنوتیپ‌های مختلف گلرنگ مورد ارزیابی قرار گرفت (Mandal and Gupta, 2001). تاثیر ترکیب هورمونی TDZ و IBA روی باززایی از ریزنمونه کوتیلدون رقم "Dincer" گلرنگ توسط Basalma *et al.* (2008) در شرایط *in vitro*، مورد مطالعه قرار گرفت. تحقیق حاضر با هدف بهینه‌سازی سیستم کشت بافت گلرنگ به منظور افزایش پدیده باززایی و عوامل مختلف تاثیرگذار بر آن جهت مطالعات بعدی در خصوص ریزازدیادی، مهندسی ژنتیک و انتقال ژن‌های مطلوب به گلرنگ جهت بهبود ویژگی‌های کمی و کیفی انجام شد.

مواد و روش‌ها

در این پژوهش از دو رقم گلرنگ، " Dincer" با عملکرد بالا و بومی کشور ترکیه و رقم اصلاح شده ایرانی "سینا" استفاده گردید. به‌منظور ضدعفونی بذور، ابتدا بذور گلرنگ در اتانول 70% به مدت 1 دقیقه و پس از شستشو با آب مقطر به مدت 7 دقیقه در محلول کلرید جیوه ($HgCl_2$) 0/1 % قرار گرفتند. پس از ضد عفونی، بذور 3 الی 4 مرتبه با آب مقطر استریل در فواصل زمانی 5 دقیقه‌ای، شستشو داده شدند. سپس بذور با کاغذ صافی استریل خشک شدند و روی محیط کشت MS (Murashige and Skoog, 1962) قرار گرفتند. تمامی مراحل ضدعفونی و کشت در زیر هود بیولوژیک و در شرایط استریل انجام شد. محیط کشت را در شیشه‌هایی به قطر 10 سانتی‌متر ریخته و به مدت 20 دقیقه در دمای 121 درجه سانتی‌گراد و فشار 15 پوند بر اینچ مربع، در اتوکلاو استریل نموده که بعد از سرد شدن به صورت محیط جامد قابل استفاده می‌باشند. بذور استریل گلرنگ را به تعداد 12-10 عدد در شیشه‌های مذکور کشت کرده و به اتاقک رشد تحت شرایط 25 درجه سانتی گراد و شدت نور 35 ($\mu molm^{-2}s^{-1}$) و فتوپریود (16ساعت روشنایی و 8 ساعت تاریکی)، منتقل شدند. در فاصله زمانی 10 روز، گیاهچه‌هایی به طول 8-5 سانتی‌متر به‌دست آمدند. پس از جوانه‌زنی در شرایط استریل، گیاهچه‌های 10 روزه را به زیرلامینار ایرفلو منتقل نموده و ریزنمونه کوتیلدون پس از جدا شدن به روی محیط MS پایه حاوی غلظت‌های مختلف هورمونی به‌همراه ساکارز با غلظت 30 گرم در لیتر به‌عنوان منبع هیدرات کربن و آگار 7 گرم در لیتر با pH 5/8 قرار داده شدند. در خصوص ریزنمونه هیپوکوتیل، از قطعات 1-0/5 سانتی‌متری استفاده شد و به طور متوسط در هر پتری، 10 عدد ریز نمونه کشت داده شد. تمامی تیمارها پس از 14 روز در محیط مشابه واکشت شدند تا بتوانند حداکثر استفاده از مواد مغذی محیط

کشت را بنمایند. کالوس‌ها (جنین‌زا و غیر جنین‌زا) پس از 15 روز تشکیل شدند و فراوانی کالوس‌زایی با شمارش تعداد ریزنمونه‌های کال داده به تعداد کل ریزنمونه‌های کشت شده به دست آمد. نمونه‌های مورد آزمایش تا زمان تشکیل نوساقه هر دو هفته یکبار به محیط مشابه منتقل و پس از 4-3 هفته نوساقه‌ها بتدریج مرحله باززا شدن را از خود نشان دادند. فراوانی باززایی نوساقه با شمارش تعداد نوساقه تولید شده به تعداد ریزنمونه کشت شده در هر پتری دیش محاسبه گردید و به‌طور متناوب تحت شرایط استریل به محیط کشت MS عاری از هورمون (محیط طویل شدن ساقه[1]) منتقل شدند، تا در این محیط به حداکثر رشد خود برسند. پس از 35 -45 روز، گیاهچه‌هایی با طول حدود 10 سانتی‌متر به دست آمدند. گیاهچه‌های مذکور به منظور تولید ریشه تحت شرایط استریل به محیط کشت MS حاوی هورمون اندول بوتیریک اسید (IBA) به میزان 2 میلی‌گرم در لیتر به‌همراه 20 گرم در لیتر ساکارز و 7 گرم در لیتر آگار با pH=7 منتقل شدند (محیط القاء ریشه‌زایی[2]). گیاهچه‌های ریشه‌دار شده، به گلدان‌های کوچک با خاک استریل (ترکیب یکسان پرلیت، ماسه و خاک) منتقل و تحت شرایط آزمایشگاه نگهداری شدند. تحقیق حاضر در قالب دو آزمایش جداگانه انجام شد. به ترتیبی که ابتدا در یک آزمایش، کالوس‌زایی و درآزمایش دیگر میزان باززایی نوساقه‌های گلرنگ بهینه گردید. برای این منظور، A (فاکتور رقم) در دو سطح (دینسر و سینا)، B (فاکتور ریزنمونه) در دو سطح (هیپوکتیل و کوتیلدون)، C (فاکتور هورمون نفتالین استیک اسید) در سه سطح و D (فاکتور هورمون 6-بنزیل آمینو پورین) در سه سطح در قالب آزمایش فاکتوریل با طرح پایه کاملاً تصادفی در 3 تکرار، بررسی شدند. جهت کالوس‌زایی، ترکیب فاکتوریل هورمون‌های NAA (0، 0/5 و 1) میلی‌گرم در لیتر و BAP (0، 0/5 و 1) میلی‌گرم در لیتر و برای باززایی نوساقه‌ها ترکیب فاکتوریل هورمون‌های NAA (0، 0/1 و 0/2) و BAP (0، 1 و 2) میلی‌گرم در لیتر مورد استفاده قرار گرفت و تیمار (0 و 0) به‌عنوان شاهد در آزمایش لحاظ گردید. تجزیه و تحلیل داده‌های آزمایش با استفاده از نرم افزارهای SPSS و MSTAT-C انجام شد و قبل از انجام تجزیه واریانس نرمال بودن داده‌ها مورد بررسی قرار گرفت. برای انجام آزمون مقایسه میانگین‌ها از آزمون چند دامنه‌ای دانکن استفاده گردید.

نتایج و بحث

نتایج تجزیه واریانس برای صفات کالوس‌زایی و باززایی در جدول-1، مشاهده می‌شود. این نتایج نشان می‌دهد که بین عوامل اصلی یعنی ارقام، ریزنمونه‌ها، هورمون NAA و هورمون BAP اختلاف معنی‌داری در سطح 1

[1] -Shoot elongation medium
[2] -Root induction medium

درصد برای هر دو صفت مشاهده می‌شود. همچنین بررسی اثرات متقابل چندگانه حاکی از آن است که ارقام مورد بررسی در این آزمایش در واکنش به هورمون NAA به‌طور مستقل عمل کرده‌اند امّا تا حدودی تحت تاثیر هورمون BAP قرار گرفته‌اند. با توجه به جدول تجزیه واریانس (جدول 1)، ارتباط تنگاتنگی نیز بین رقم و نوع ریزنمونه برای صفت کالوس‌زایی وجود داشته است (اثر متقابل AB).

جدول 1- تجزیه واریانس برای صفات کالوس‌زایی و باززایی.

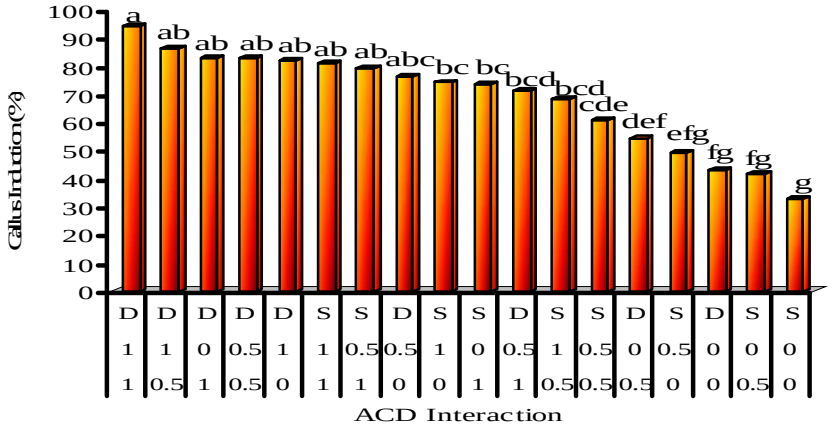
میانگین مربعات (MS) Mean square		درجه آزادی df	منابع تغییر S.O.V.
باززایی Shoot regeneration	کالوس‌زایی Callus induction		
291.39 **	4231.26 **	1	فاکتور A (رقم) Cultivar
288.83 **	3136.33 **	1	فاکتور B (ریزنمونه)Explant
11.46 ns	4008.92 **	1	AB
65.71 **	6334.75**	2	فاکتور C (NAA)
1.37 ns	17.56 ns	2	AC
47.07 **	5194.36**	2	BC
3.52 ns	2669.28**	2	ABC
426.78 **	4069.33**	2	فاکتور D (BAP)
27.72 **	404.03 *	2	AD
93.80 **	1204.11**	2	BD
6.91 ns	167.14 ns	2	ABD
92.58 **	1035.91 **	4	CD
11.04 *	383.42 *	4	ACD
705.95 **	6065.47**	4	BCD
20.24 **	175.42 ns	4	ABCD
3.44	112.67	72	اشتباه آزمایشی Error
		107	کل Total
14.12	15.51		ضریب تغییرات (CV %) Coefficient Variation

ns عدم وجود اختلاف معنی‌دار، * و ** بترتیب اختلاف معنی دار در سطح 0/05 و 0/01

ns: Non-significant, * and **: Significant at 0.05 and 0.01 probability levels, respectively.

Table 1- Analysis of variance for callus induction and shoot regeneration of safflower.

به‌علاوه، عدم ارتباط بین ارقام و ریزنمونه‌ها با هورمون BAP در القاء کالوس‌زایی مشاهده می‌گردد (اثر متقابل ABD). از طرفی، عامل رقم در واکنش به باززایی مستقل از هورمون NAA عمل کرده است (اثر متقابل AC). همچنین در این آزمایش اثرات متقابل دوگانه ارقام و ریزنمونه‌ها با هورمون BAP برای صفت باززایی، معنی‌دار شده است (اثر متقابل AD و BD) که نشان-دهنده واکنش مثبت این دو فاکتور به هورمون BAP است (جدول 1). مقایسات میانگین‌ها نشان دادند که در اثرات متقابل رقم با هورمون-های مورد مطالعه، بیشترین میزان کالوس‌زایی در رقم Dincer و ترکیب (1 BAP و 1 NAA) به میزان 94/33 درصد و در اثر متقابل ریزنمونه با این دو هورمون، بیشترین کالوس‌زایی در ترکیب (0/5 BAP و 0/5 NAA) میلی‌گرم در لیتر و ریزنمونه هیپوکوتیل به میزان 97 درصد مشاهده شده است (شکل 1 و 2). میزان تولید کالوس بستگی به ترکیب هورمون‌های رشد به کار رفته دارد و تعادل بین هورمون‌های اکسین و سیتوکنین یک فاکتور مورفوژنیکی تعیین‌کننده و مهّم به‌شمار می‌رود (Abbasi *et al.*, 2007). همان‌طور که مشاهده می‌شود، کالوس‌زایی از حاشیه‌های ریزنمونه کوتیلدون و از دو طرف ریزنمونه هیپوکوتیل (محل برش) شروع گردیده است (شکل 3، الف و ب). با توجه به اینکه اثر متقابل چهار گانه (ABCD) در مورد صفت باززایی معنی دار شده بود (جدول 1)، مقایسه میانگین برای آن نشان داد که بیشترین درصد باززایی به میزان 35/07 درصد در ترکیب هورمونی (2 BAP و NAA 0/1) میلی‌گرم در لیتر، در ریزنمونه کوتیلدون و رقم Dincer رخ داده است. این تیمار اختلاف معنی‌داری را با سایر ترکیبات هورمونی نشان داد. بررسی سایر تیمارها نشان داد که بهترین میزان باززایی نوساقه‌ها در سطح 2 میلی‌گرم در لیتر هورمون BAP و در محدوده 35/07-22/19 درصد بوده است. شکل‌گیری جوانه‌های اولیه تولیدکننده نوساقه پس از 2 هفته از کشت ریزنمونه‌های کوتیلدون و هیپوکوتیل در محیط‌های باززایی قابل تشخیص بود (شکل 4 الف) و پدیده باززایی کامل نوساقه‌ها 4-3 هفته بعد از کشت مشاهده گردید (شکل 4 ب).



شکل 1- مقایسه میانگین اثر متقابل سه‌گانه بین رقم و هورمون‌های NAA و BAP در پاسخ به میزان کالوس‌زایی در گیاه گلرنگ. D و S به ترتیب نشان دهنده ارقام Dincer و سینا هستند. محور افقی سطوح مختلف از غلظت-های هورمون‌های NAA (ردیف بالا) و BAP (ردیف پایین) را نشان می‌دهد. حروف متفاوت در بالای ستون‌های نمودار نشان دهنده تفاوت معنی‌دار در سطح احتمال 1٪ با استفاده آزمون چند دامنه دانکن است.

Figure 1- Mean comparison of triple interactions among cultivar, NAA and BAP phytohormones in response to callus induction in safflower. Note: D and S represent Dincer and Sina cultivars, respectively. Horizontal axis is represented different levels of NAA (above) and BAP (below) concentrations. Values within a graph followed by different letters are significantly different (P<0.01), analyzed by Duncan's multiple range test.

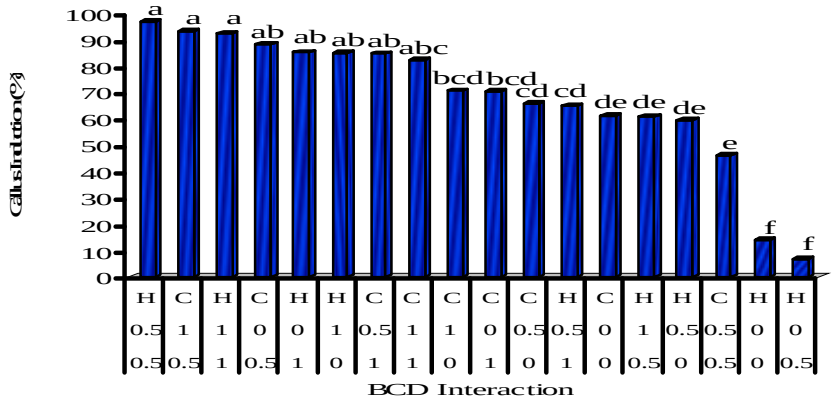
القاء ریشه در ریزنمونه‌های باززاشده در محیط حاوی هورمون IBA انجام شد و گیاهچه‌های رشد کرده در این محیط پس از 2 هفته به گلدان‌های کوچک حاوی خاک استریل منتقل شده و تحت شرایط کنترل شده نگهداری شدند. لازم بذکر است که ریشه‌زایی نوساقه‌های گلرنگ در محیط *in vitro* به سختی صورت گرفت و برای این منظور آزمایش القاء ریشه چندین بار تکرار شد اما تنها، انتقال تعداد اندکی از نوساقه‌ها به محیط خاک (7-5 نوساقه) با موفقیت انجام گرفت. به‌طور کلی، ارقام مورد استفاده در این تحقیق ریشه‌زایی مطلوبی در محیط *in vitro* از خود نشان ندادند. انتخاب یک ریزنمونه در مرحله رشدی مطلوب نقش اساسی در موفقیت آمیز بودن کشت بافت در شرایط *in vitro* بازی می‌کند (Khawar *et al.*, 2005). پیچیدگی مورفولوژیکی یک ریزنمونه به همراه انتخاب تنظیم کننده‌های رشد گیاهی مناسب تاثیر چشمگیری بر القاء کالوس و باززایی نوساقه‌ها دارد (Khawar *et al.*, 2005). هر چند که سن گیاهچه‌ها و نحوه قرارگرفتن آنها روی محیط کشت نیز در برخی از گیاهان حائز اهمیت است (Nikam and Shitole, 1999). با توجه به بررسی منابع انجام شده، در

کشت بافت گونه‌های گلرنگ ریزنمونه‌های کوتیلدون و هیپوکوتیل فراوانی کالوس‌زایی و باززایی بیشتری نسبت به سایر ریزنمونه‌ها از خود نشان می‌دهند که با نتایج تحقیق حاضر مطابقت دارد (Sankara Rao and Rohini, 1999). در خصوص این تحقیق، ریزنمونه کوتیلدون در هر دو رقم واکنش بهتری را به کالوس‌زایی و باززایی مستقیم نوساقه ها نسبت به هیپوکوتیل از خود نشان داده است. داده‌های بدست آمده برای ریزنمونه‌های مختلف در واکنش به کالوس‌زایی نشان می‌دهد که بسته به نوع ریزنمونه، غلظت تنظیم کننده‌های رشد گیاهی تفاوت کرده و این امر تاثیر چشمگیری در روند کالوس‌زایی و باززایی نوساقه‌ها اعمال می‌کند. به عنوان مثال، در ریزنمونه کوتیلدون، فراوانی باززایی در غلظت‌های مختلف BAP نسبت به ریز نمونه هیپوکوتیل بیشتر است. در این رابطه، مطالعات متعددی وجود دارند که صحت این نتیجه را در سایر ارقام و گونه‌های گلرنگ نیز تایید می‌کنند (Orlikowska and Dyer, 1993; Sujatha and Suganya, 1996; Rani *et al*., 1996; Nikam and Shitole, 1999; Mandal and Gupta, 2001; Sujatha and Dinesh Kumar, 2007; Basalma *et al*., 2008). در این رابطه، Zebarjadi *et al*. (2006) و Salmanian and Kahrizi (2007) نیز نتایج مشابهی را در مورد گیاه کلزا مشاهده کردند. به‌نظر می‌رسد که ریزنمونه کوتیلدون گیاه گلرنگ از پتانسیل ارگانوژنیکی بیشتری نسبت به سایر ریزنمونه‌ها برخوردار باشد. علت این امر، تا حدودی به وجود سلول‌های مریستمی تولید کننده جوانه ساقه در سطح رویی[1] کوتیلدون برمی‌گردد. در واقع، تقسیمات مکرر سلول‌های زیرپوستی[2] برگی اولیه منجر به تشکیل سلول‌های مریستمی و متعاقب آن جوانه‌های ساقه می‌شوند (Mandal and Gupta, 2001). از این رو، نحوه قرارگرفتن ریزنمونه کوتیلدون و تماس مستقیم آن با محیط کشت از اهمیت خاصی برخوردار است. به عبارت دیگر، قرارگرفتن سطح پشتی[3] کوتیلدون روی محیط کشت موجب باززایی نوساقه‌های اولیه از سلول‌های اپیدرم سطح رویی آن می‌گردد (Mandal and Gupta, 2001; Basalma *et al*., 2008). علاوه بر باززایی مستقیم، پیامد مهم دیگری که با استفاده از ریزنمونه کوتیلدون به دست می‌آید، امکان باززایی چندین نوساقه از یک برگ است که این موضوع در ریزازدیادی و مهندسی ژنتیک بسیار حائز اهمیت است. اما نوساقه‌هایی که از کشت هیپوکوتیل ایجاد می‌شوند، ابتدا مرحله کالوس‌زایی را طی کرده و سپس تولید نوساقه می‌کنند (Zebarjadi *et al*., 2006; Salmanian and Kahrizi, 2007).

[1]- Adaxial surface

[2]- Subepidermal

[3]- Abaxial surface



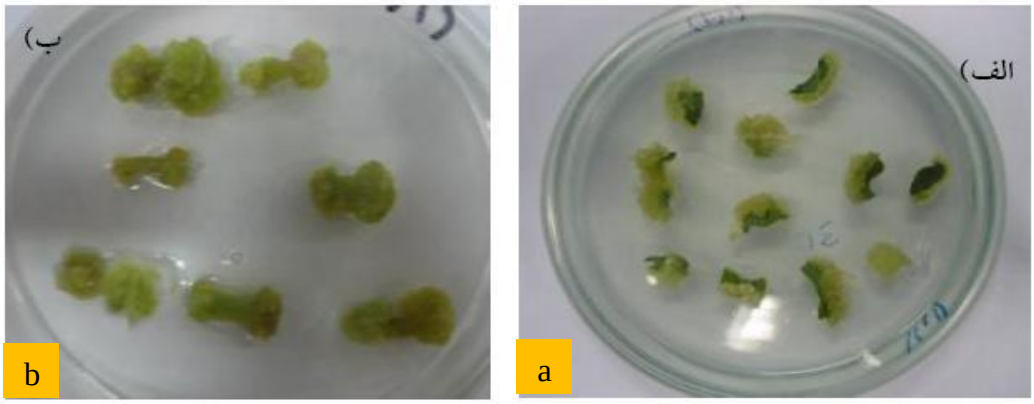
شکل 2- مقایسه میانگین اثر متقابل سه‌گانه بین ریزنمونه و هورمون‌های NAA و BAP در پاسخ به میزان کالوس‌زایی در گیاه گلرنگ. H و C به ترتیب نشان دهنده ریزنمونه‌های هیپوکوتیل و کوتیلدون هستند. محور افقی سطوح مختلف از غلظت‌های هورمون‌های NAA (ردیف بالا) و BAP (ردیف پایین) را نشان می‌دهد. حروف متفاوت در بالای ستون‌های نمودار نشان دهنده تفاوت معنی‌دار در سطح احتمال 1٪ با استفاده آزمون چند دامنه دانکن است.

Figure 2- Mean comparison of triple interactions among explant, NAA and BAP phytohormones in response to callus induction in safflower. Note: D and S represent Dincer and Sina cultivars, respectively. Horizontal axis is represented different levels of NAA (above) and BAP (below) concentrations. Values within a graph followed by different letters are significantly different (P<0.01), analyzed by Duncan's multiple range test.

تاثیر رقم و پاسخ آن به کالوس‌زایی و باززایی نوساقه‌ها در این آزمایش کاملاً مشهود بود. تا کنون، تحقیقات در زمینه کشت بافت و مهندسی ژنتیک گلرنگ تنها روی ارقام خاصی از این گیاه انجام شده است که عمدتاً محدود به ارقامی مانند Bhima، Grina، Manjira، S-144، HUS-305، Dincer، Centennial، A_1 و A_{300} بوده که اکثر آن‌ها بومی هندوستان می‌باشند. در این تحقیق، یکی از ارقام مورد استفاده رقم Dincer که ژنوتیپی با عملکرد بالا و سازگار به مناطق خشک و بومی ترکیه می‌باشد به‌دلیل سهولت دسترسی، مورد استفاده قرار گرفت. در زمینه کشت بافت، تنها یک تحقیق در مورد این رقم توسط Basalma *et al.* (2008) انجام شده است. آن‌ها کالوس‌زایی این رقم را در محدوده 100-93/33 درصد و بیشترین باززایی نوساقه‌ها را در ترکیب هورمونی (0/5 TDZ و 0/25 IBA) به میزان باززایی (54/4%) را در ترکیب هورمونی 2 میلی‌گرم BAP و در رقم S-144 مشاهده کردند. با توجه به مطالب فوق و همچنین معنی‌دار شدن اثر رقم در کالوس‌زایی و باززایی (جدول

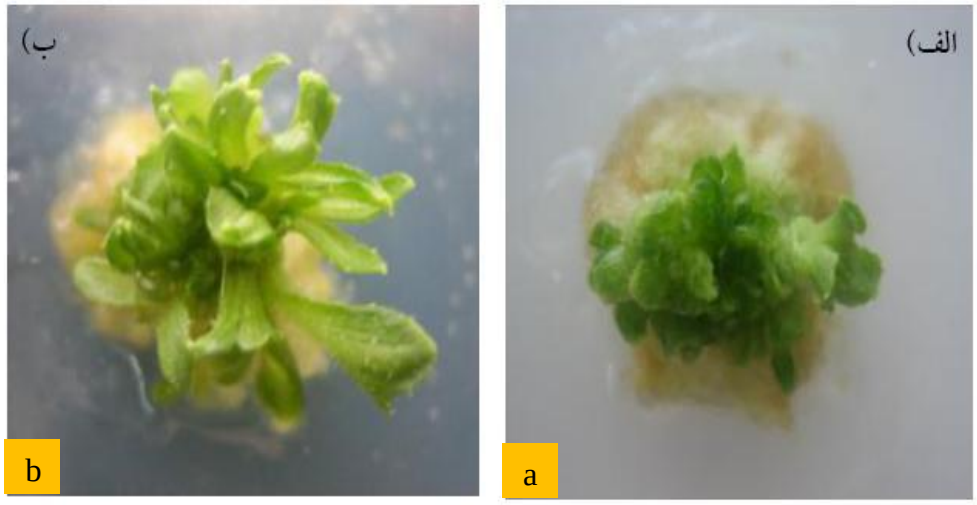
33/33 درصد گزارش کردند. نتایج تحقیق حاضر به لحاظ صفات فوق تا حدودی موافق با نتایج این محققان بوده است. علاوه بر این، Mandal and Gupta (2001) بیشترین درصد

1) مشخص می‌شود که ژنوتیپ در ریزازدیادی و مهندسی ژنتیک دارای اهمیت می‌باشد. در این رابطه، همواره بایستی ژنوتیپ‌هایی را به‌کار برد که دارای درصد باززایی بالایی باشند. به علاوه، برای دستورزی ژنتیکی ژنوتیپ‌هایی که دارای خصوصیات زراعی مطلوبی می‌باشند امّا فراوانی باززایی آن‌ها کم است، بایستی به‌وسیله تلاقی با ژنوتیپ‌هایی با فراوانی باززایی بالا این خصیصه را به ژنوتیپ‌های برتر انتقال داد. در خصوص نوع هورمون و تاثیر آن، در اکثر مطالعات انجام شده از هورمون‌های NAA و BAP یا TDZ استفاده شده و بهترین محدوده برای باززایی مستقیم نوساقه‌ها در غلظت 2-0/5 میلی‌گرم در لیتر هورمون‌های BAP و TDZ در ترکیب با هورمون NAA (0/5-0/1 میلی‌گرم در لیتر) گزارش شده است (Orlikowska and Dyer, 1993; Rani *et al*., 1996; Radhika *et al*., 2006). در این تحقیقات، بیشترین میزان باززایی نوساقه‌ها با کاربرد هورمون‌های NAA و BAP، در محدوده 54-33 درصد گزارش شده است؛ امّا تأثیر هورمون TDZ که یک سیتوکنین مصنوعی با ساختار شیمیایی فنیل اوره است در اندام‌زایی و جنین‌زایی سوماتیکی مشابه هورمون BAP و در مواردی حتی بیشتر از آن بوده است. حداکثر فراوانی باززایی نوساقه‌ها با کاربرد این هورمون 98/5 درصد گزارش شده است. این مسئله حاکی از نقش بسیار معنی دار هورمون TDZ به عنوان یک تنظیم کننده رشد برون‌زا در افزایش رقابت مورفوژنیکی در شرایط کشت بافت و نقش مثبت آن در تغییر سطوح هورمون‌های داخلی گیاه گلرنگ به منظور القاء نوساقه بوده است (Radhika *et al*., 2006). از طرف دیگر، غلظت‌های بالای هورمون‌های BAP و TDZ سمی بوده و در برخی موارد هیچ‌گونه واکنشی به لحاظ تولید کالوس و باززایی نوساقه‌ها مشاهده نشده یا این که موجب نکروزه شدن کالوس‌ها یا نوساقه‌های باززا شده گردیده است (Nikam and Shitole, 1999). به‌نظر می‌رسد که ریشه‌دار کردن گیاه گلرنگ در شرایط *in vitro* به‌سختی صورت می‌گیرد و این گیاه یکی از گیاهان سر سخت (Recalcitrant) نسبت به این پدیده است؛ چرا که در این تحقیق، ریشه‌دارکردن نوساقه‌های باززا شده چندان موفقیت‌آمیز نبود و تنها تعداد اندکی از آن‌ها به محیط خاک منتقل شدند. Ying *et al*. (1992) نتایج مشابهی را در زمینه ریشه‌زایی رقم آمریکایی Centennial مشاهده کردند. همچنین، Sankara Rao and Rohini (1999) مجدداً واکنش ضعیف ارقام هندی A_1 و A_{300} گلرنگ را نسبت به ریشه‌زایی در شرایط *in vitro* گزارش کردند. به نظر می‌رسد ژنوتیپ مورد استفاده نقش بسیار مهمی در القاء ریشه در محیط *in vitro* ایفا می‌کند (George and Rao, 1982; Ying *et al*., 1992).



شکل 3- الف) و ب) کالوس‌های تشکیل شده از ریزنمونه‌های کوتیلدون و هیپوکوتیل گلرنگ پس از 15 روز از کشت در محیط‌های کالوس‌زایی. شکل‌گیری کالوس از حاشیه‌های ریزنمونه کوتیلدون الف) و از دو طرف ریزنمونه هیپوکوتیل ب) کاملاً مشهود است.

Figure 3- Callus formations after 15 days of culture of safflower cotyledons and hypocotyl explants on the callus induction medium; callus formation was clearly visible (a) on the margins of the cotyledons and (b) cut surface of hypocotyl explants.



شکل 4- الف) جوانه‌های اولیه در حال باززا شدن از ریزنمونه کوتیلدون، ب) نمای نزدیکی از نوساقه‌های باززایی شده از ریزنمونه کوتیلدون پس از 4 هفته از کشت. در قسمت ب) پدیده **Multiple shoot regeneration** کاملاً قابل تشخیص است.

Figure 4- (a) Emerging of initial primordia producing shoots from the cotyledon explant and (b) close view of regenerated shoots from cotyledon explant after 4 weeks of culture; Hint: Multiple shoot regeneration can be clearly distinguished.

منابع

Abbasi B, Saxena PK, Murch SJ, Liu CZ (2007). *Echinacea* biotechnology: Challenges and opportunities. *In Vitro* Cell Development Biology 43: 481-492.

Basalma D, Uranbey S, Mirici S, Kolsarici O (2008). TDZ×IBA induced shoot regeneration from cotyledonary leaves and in vitro multiplication in safflower (*Carthamus tinctorius* L.). African Journal of Biotechnology 7: 960-966.

FAO (2008). WWW.FAO.ORG/Novamber 2008/Statistics/Agriculture/Safflower/.

George L, Rao, PS (1982). *In vitro* multiplication of safflower (*Carthamus tinctorius* L.) through tissue culture. Proceeding of the Indian Natural Science Academy 48: 791-794.

Khawar KM, Sarıhan E, Sevimay C, Çöçü S, Parmaksız I, Uranbey S, Ipek A, Kaya MD, Sancak C, Özcan S (2005). Adventitious shoot regeneration and micropropagation of *Plantago lanceolata* L. Period Biology 107: 113-116.

Knowles PF (1989). Safflower. In Oil Crops of the World. Downey RK, Robellen G, Ashri A (eds). McGraw-Hill, New York pp. 363–374.

Mandal AKA, Gupta SD (2001). Direct shoot organogenesis and plant regeneration in safflower. *In vitro* Cellular and Development Biology 37: 50-54.

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

Nikam TD, Shitole MG (1999). *In vitro* culture of Safflower L. cv. Bhima: initiation, growth optimization and organogenesis. Plant Cell Tissue and Organ Culture 5: 15-22.

Orlikowska TK, Dyer WE (1993). *In vitro* regeneration and multiplication of safflower (*Carthamus tinctorius* L.). Plant Science 93: 151-157.

Radhika K, Sujatha M, Rao NT (2006). Thidiazuron stimulates adventitious shoot regeneration in different safflower explants. Biologia Plantarum 50: 174-179.

Rani KJ, Rao TN, Raghunatham G, Rao PV (1996). Studies on callus growth and differentiation in safflower. Indian Journal of Genetics and Plant Breeding 56: 458–461.

Salmanian AH, Kahrizi, D (2007). Study on effect of genotype and explant type on shoot regeneration in rapeseed (*Brassica napus* L.). Journal of Iranian Biology 20: 171-179.

Sankara Rao K, Rohini VK (1999). Gene transfer into Indian cultivars of safflower (*Carthamus tinctorius* L.) using *Agrobacterium tumefaciens*. Plant Biotechnology 16: 201-206.

Seeta P, Talat K, Anwar SY (2000). Somaclonal variation: an alternative source of genetic variability in safflower. Journal of Cytology Genetic 1: 127–135.

Singh V, Nimbkar N (2006). Safflower (*Carthamus tinctorius* L.) Chapter 6. pp. 167-194.

Sujatha M (2002). Current status and future prospects of *in vitro* techniques and biotechnology in safflower breeding. Sesame and safflower Newsletter 17: 92-97.

Sujatha M, Dinesh Kumar V (2007). *In vitro* bud regeneration of *Carthamus tinctorius* and wild *Carthamus* species from leaf explants and axillary buds. Biologia Plantarum 51: 782-786.

Sujatha M, Suganya A (1996). *In vitro* organogenic comparison of different seedling tissues of safflower (*Carthamus tinctorius* L.). Sesame Safflower Newsletter 11: 85-90.

Ying M, Dyer WE, Bergman JW (1992). *Agrobacterium tumefaciens* mediated transformation of safflower (*Carthamus tinctorius* L.) cv. Centennial. Plant Cell Report 11: 581-585.

Zebarjadi AR, Jalali Javaran M, Mousavi A, Karimzadeh GH, Moeini A, Salmanian AH (2006). Transformation of rapeseed (*Brassica napus* L.) plants with sense and antisense constructs of the fatty acid elongase gene. Iranian Journal of Biotechnology 4: 79-87.

Study of Callus Induction and Shoot Regeneration of Safflower (*Carthamus tinctorius* L.) Using Hypocotyl and Cotyledon Explants Culture

Motamedi J.[1,2], Zebarjadi A.R.[*3, 4], Kahrizi D.[3,4], Hatef Salmanian A.[5], Soheilikhah Zh.[6]

[1] M.Sc. Student of Plant Breeding, Faculty of Agriculture, Razi University, Kermanshah, Iran
[2] Young Researches Club, Kermanshah Branch, Islamic Azad University, Kermanshah, Iran
[3] Dep. of Plant Breeding and Agronomy, Razi University, Kermanshah, Iran.
[4] Dep. of Biotechnology for Environmental Stress, Razi University, Kermanshah, Iran.
[5] National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology, Tehran, Iran
[6] Dep. of Biology, Faculty of Sciences, Razi University, Kermanshah, Iran.

Abstract
After cereals, oilseed crops are included as the second source of supplying calorie for human populations. In recent years, safflower was considered due to quality and high content of fatty acids. For optimization of tissue culture of safflower, an experiment was carried out as a factorial arrangement in a completely randomized design with three replications in 2008-2009. Callus induction and shoot regeneration percentage of cotyledons and hypocotyl explants were measured on basal MS medium for two cultivars (Dincer and Sina) of safflower in different concentrations of NAA and BAP hormones. Analysis of interaction effects indicated that the cultivars were independent in response of different level of NAA. Mean comparison showed that the highest percentage of callus induction occurred on MS medium containing 0.5 mg/l NAA and 0.5 mg/l BAP (94.33%) and 1 mg/l NAA and 1 mg/l BAP (97%). Furthermore, hypocotyl explant of Dincer has a good response to callus induction. The highest percentage of shoot regeneration also was achieved on MS medium supplemented with 0.1 mg/l NAA and 2 mg/l BAP from cotyledon explant of Dincer.

Keywords: Safflower, Callus Induction, Shoot Regeneration, Explant, Tissue culture

[*] Corresponding author: A.R. Zebarjadi Telefax: 08318323731 Email: zebarjadiali@yahoo.com