The Use of Leaf and Internode Explants and Different Combinations of Growth Regulators for Callus Formation, Regeneration and Root Formation of Black Henbane (*Hyoscyamus niger* L.)

Pages 93-110

R. BiglariFarrash[*1], A. Kheiri[2] and M. SaniKhani[3]

1) PhD student, Department of Horticultural Science and Engineering, Faculty of Agriculture, Zanjan University, Zanjan, Iran.
2) Associate Professor, Department of Horticultural Science and Engineering, Faculty of Agriculture, Zanjan University, Zanjan, Iran.
3) Assistant Professor, Department of Horticultural Science and Engineering, Faculty of Agriculture, Zanjan University, Zanjan, Iran.

*Corresponding author**: razibiglari65@gmail.com**

Received date: 2023.10.22 **Accepted date: 2024.01.20**

Abstract

In recent years, callus formation, regeneration and in vitro fertilization of medicinal plants with genetic engineering purposes are one of the interesting topics in biotechnology and plant tissue culture. In line with this goal, the optimization of the regeneration of the medicinal plant, *Hyoscyamus niger* L., was carried out in vitro in a factorial manner in the form of a completely randomized design with 3 treatments in 3 replications. The test factors include the type of micro sample (leaf and internode), different growth regulators that include 3 treatments: one (T1) containing 1 mg/L BA and 0.5 mg/L 2,4-D, treatment two (T2) included NAA and BA each at the rate of 5 mg/l and treatment three (T3) contained 3 mg Kin and 1 mg 2,4-D. T0 (hormone-free) treatment was used as a control. The results showed that 100% callus formation occurred in the leaf explant with treatment 2 and in the stem internode microsample in treatment 3, the highest fresh weight of callus and the largest diameter of callus produced in leaf tissue occurred in treatment T1. The highest number of regeneration and stem formation, 100%, was observed in the internode tissue of the stem in T2 treatment. In the T3 treatment, 87% of the calli produced in the leaf entered the regeneration stage and 92% of the stem internode samples were regenerated. In T2 treatment, new stems had better longitudinal growth. Root production was observed in stem internode explants and in leaves and directly in T3 treatment.

Keywords: Micropropagation, Callus, Tissue culture and Plant hormone.

استفاده از ریزنمونه های برگ و میانگره و ترکیبات مختلف تنظیم کننده های رشد برکالوس زایی، باززایی و ریشه زایی گیاه بذرالبنج سیاه (*Hyoscyamus niger* L.)

شماره صفحات
۱۱۰-۹۳

راضیه بیگلری فراش[۱*]، عزیزاله خیری[۲] و محسن ثانی خانی[۳]

۱) دانشجوی دکتری، گروه علوم و مهندسی باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زنجان، زنجان، ایران.
۲) دانشیار، گروه علوم و مهندسی باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زنجان، زنجان، ایران.
۳) استادیار، گروه علوم و مهندسی باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زنجان، زنجان، ایران.

* نویسنده مسئول: **razibiglari65@gmail.com**

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۰۷/۳۰ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۱۰/۳۰

چکیده

در سال های اخیر کالوس زایی، باززایی و پرآوری درون شیشه ای گیاهان دارویی با اهداف مهندسی ژنتیک، یکی از موضوعات جالب توجه در بیوتکنولوژی و کشت بافت گیاهی می باشند. در راستای این هدف بهینه سازی باززایی گیاه دارویی بذرالبنج سیاه (*Hyoscyamus niger* L.) در شرایط درون شیشه ای بصورت فاکتوریل در قالب طرح کاملا تصادفی با ۳ تیمار در ۳ تکرار صورت پذیرفت. فاکتورهای آزمایش شامل نوع ریز نمونه (برگ و میانگره)، تنظیم کننده های رشدی مختلف که شامل ۳ تیمار: یک (T_1) حاوی ۱ میلی گرم بر لیتر BA و ۰/۵ میلی گرم بر لیتر 2,4-D ، تیمار دو (T_2) شامل NAA و BA هر کدام به میزان ۵ میلی گرم در لیتر و تیمار سه (T_3) محتوی۳ میلی گرم Kin و ۱ میلی گرم 2,4-D بود. از تیمار T_0 (فاقد هورمون) به عنوان کنترل استفاده شد. نتایج نشان داد، ۱۰۰٪ کالزایی در ریزنمونه برگ با تیمار ۲ و در ریز نمونه میانگره ساقه در تیمار۳ رخ داد، بالاترین وزن تر کالوس و بیشترین قطر کالوس تولید شده مربوط به بافت برگ در تیمار T_1رخ داد. بیشترین تعداد باززایی و ساقه زایی به مقدار ۱۰۰٪ در بافت میانگره ساقه، در تیمار T_2مشاهده شد. در تیمار T_3 نیز ۸۷٪ از کالوس های تولید شده در برگ وارد مرحله باززایی شدند و ۹۲٪ ریز نمونه های میانگره ساقه باززایی شدند. در تیمار T_2 نو ساقه ها از رشد طولی بهتری برخوردار بودند. تولید ریشه در ریزنمونه میانگره ساقه و در برگ و بصورت مستقیم در تیمار T_3 مشاهده شد.

واژه‌های کلیدی: ریزازدیادی، کالوس، کشت بافت و هورمون گیاهی.

مقدمه

بذرالبنج سیاه (*Hyoscyamus niger* L.) یکی از مهم ترین گیاهان خانواده بادمجانیان (*Solanaceae*) بـوده و قسمت های مختلف آن حاوی مواد موثره آلکالوییدی است که در صنایع داروسازی کاربرد فراوانی دارد (Omidbeigi, 2009). مهمترین اثرات گزارش شده عبارتند از : سمیت، ضد درد بودن، بیحس کننده، ضد استیل کولین، آنتی کولینرژیک، ضد سم سرب، ضد ترشح بزاق، ضد اسپاسم، قابض، ضد نفخ، تشنج آور، خواب آور، مسهل، گشاد کننده ی مردمک چشم، شل کننده ی عضلات، اعتیاد آور، مسکن، پاراسمپاتولیتیک و جونده کش (Omidbeigi, 2009). آلکالوئیدهای این گیاه در چشم پزشکی و درمان بیماریهای قلبی و عروقی و گوارشی کاربرد دارد (Omidbeigi, 2009). به‌دلیل درخواست‌های رو به افزایش جهت ترکیب‌های دارویی، غلظت کم این ترکیب‌ها درگیاه، محدودیت منابع طبیعی و روند رو به نابودی گونه‌های گیاهی، استفاده از روش های زیست فن آوری برای افزایش تولید و بهره‌وری گیاهان دارویی، مورد توجه قرار گرفته است (Omidi & Farzin, 2015). از تکنیک‌های مهم مورد استفاده در این زمینه کشت بافت می باشد که قادر به تولید سریع و انبوه مواد دارویی و متابولیت‌های ثانویه به صورت تجاری است (MasuomiAsl *et al*., 2015). نحوه باززایی درون شیشه ای برای تکثیر غیرجنسی انبوه ژنوتیپ های خالص و انتقال ژن مهم است. نتایج تحقیقات مختلف نشان داده است که عوامل مختلفی مانند ژنوتیپ، محیط کشت، نوع و غلظت مواد هورمونی در میزان باززایی گیاهان موثر می‌باشند (Tripathi and Tripathi, 2003). پرآوری شاخساره و افزونگری آن بیشتر تحت تأثیر هورمون سیتوکینین در محیط کشت است، هورمون های اکسینی بدون توجه به غلظت هورمون تأثیری در پرآوری شاخساره ندارند(Rout *et al*., 1999) . فاکتورهای شیمیایی، مواد معدنی و تنظیم کننده های رشد در تمایززایی و رشد گیاه مؤثرند (Rout *et al*., 1999). از مهمترین این فاکتورها، اثرات تنظیم کننده های رشد نظیر اکسین و سیتوکینین روی شاخساره گیاهان دارویی مختلف می باشد. نوع، غلظت و نسبت هورمون ها در موفقیت کشت بافت مؤثر است و معمولاً به منظور ریشه زایی از هورمون های اکسینی، جهت شاخه زایی از هورمون های سیتوکینینی و برای تولید کالوس از نسبت های متعادلی از این دو هورمون در محیط کشت موراشیگ و اسکوگ (MS) استفاده می شود (Farsi and Zolala, 2003). بیشترین تعداد ساقه باززاشده در بذرالبنج سیاه در محیط کشت MS تکمیل شده با ۰/۵ میلیگرم در لیتر نفتالین استیک اسید (NAA) به همراه ۱ میلیگرم در لیتر بنزیل آدنین (BA) گزارش گردیده است (Ghorbanpuor *et al*., 2013). در آزمایشی بالاترین میانگین القای جوانه در بذر البنج مشبک (*Hyoscyamus reticulatus* L.) در محیط حاوی کینیتین (Kin) به میزان یک میلی گرم در لیتر در ترکیب با ۱ میلی گرم در لیتر ایندول استیک اسید (IAA) رخ داد (Amini *et al*., 2014). در مطالعه ای ترکیب ۰/۰۵ میلی گرم در لیتر NAA به همراه ۰/۵ میلی گرم در لیتر بنزیل آمینو پورین (BAP) به تولید جوانه از بذرالبنج (*Hyoscyamus muticus* L.) منجر شد (Basu. and Chand, 1996). در گزارشی جهت باززایی در بذرالبنج سیاه از غلظت های مختلف BAP و تیادیازیرون (TDZ) استفاده شدکه ۱۰۰٪ درصد باززایی در ریز نمونه هیپوکوتیل

و با غلظت ۱۶ میکرو مول (µM) رخ داد. سپس نوساقه ها با غلظت های مختلف هورمون های ریشه زایی ایندول بوتیریک اسید (IBA) و NAA تیمار شدند که بیشترین ریشه زایی در محیط MS حاوی IBA به میزان ۸µM رخ داد (Cheng *et al.*, 2005). تاکنون هیچگونه گزارشی از باززایی مستقیم از بذرالبنج مشاهده نشده است، بنابراین در ابتدا تولید کالوس از ملزومات باززایی در این گیاه می باشد. اورانبی با استفاده از هورمون‌های TDZ و IBA توانست کالوس را در بنگدانه القا کند (Uranby, 2005). تحقیقات نشان داده است که در گیاه بنگ دانه نوع ریز نمونه و هورمون ها نقش تعیین کننده ای در کالوس زایی و سپس باززایی از آن دارند (Basu and Chand, 1996). در تحقیقی که بر روی تولید کالوس از ریشه موئین بذرالبنج مصری انجام شد، دریافتند که کالوس زایی بر روی این ریشه ها در تمامی محیط های کشت جامد حاوی غلظت های مختلف 2, 4-D و NNA و حتی در محیط کشت جامد فاقد هر گونه تنظیم کننده رشد اتفاق افتاد. این مطلب نشان می دهد که هورمون های اکسینی درون زاد و بیرونی مانند NAA و 2, 4-D قادر به القاء کالوس در گیاه بذرالبنج هستند (فارسی و همکاران، ۱۳۸۵). در آزمایشی نشان داده شد که 2, 4-D بهترین تنظیم کننده ی رشد برای القاء کالوس با درصد بالا در بذرالبنج نسبت به NAAو IAA است و اضافه کردن ۱ میلی گرم در لیتر توفوردی (2, 4-D) و ۲ میلی گرم در لیتر NAA به محیط کشت MSبالاترین فراوانی القایی کالوس (۸۸/۶٪ و ۷۲/۵٪) را به خود اختصاص داد (Khater and Elashtokhy, 2015). در مطالعه ای بهترین غلظت القاء کالوس بذرالبنج سیاه در محیط کشت MS حاوی ۲ میلی گرم در لیتر NAA و ۲ میلی گرم در لیتر BAPمشاهده شد (Sonbolnazeri *et al.*, 2013). باززایی غیر مستقیم که به وسیله تولید کالوس صورت می‌گیرد دارای فوائد زیادی از جمله مطالعه مرفولوژیکی و فیزیولوژیکی گیاهان، تولید متابولیت های ثانویه، تنوع سوماکلونال و انتقال پایدار ژن می باشد. از اینرو تحقیق حاضر به منظور شناخت بهترین، سریعترین و اقتصادی ترین روش تکثیر و دست یابی به محیط کشت مناسب برای باززایی و تکثیر درون شیشه ای این گیاه و همچنین تدوین گوشه ای از دانش فن کشت درون شیشه ای این گیاه در ایران انجام گردید.

مواد و روش‌ها

ضد عفونی و کشت بذر

این پژوهش در زمستان ۱۴۰۲ در آزمایشگاه گروه علوم باغبانی دانشگاه زنجان انجام شد. آزمایش بصورت فاکتوریل (دو فاکتور ریز نمونه و غلظت و ترکیب هورمون) در قالب طرح کاملا تصادفی با ۳ تیمار (T1 حاوی ۱ میلی گرم بر لیتر BA و ۰/۵ میلی گرم بر لیتر D-۲،۴ ، تیمار T2 شامل NAA و BA هر کدام به میزان ۵ میلی گرم در لیتر و تیمار سه T3 محتوی۳ میلی گرم Kin و ۱ میلی گرم D-۲،۴ و تیمار T0 فاقد هورمون به عنوان کنترل) در ۳ تکرار اجرا شد. بذر مورد نظر از کلکسیون باغ گیاهان دارویی همدان تهیه و توسط گیاه شناس مجموعه تایید شد. . ابتدا بذور با استفاده از بنومیل ۳ درصد در یک دقیقه، هیپوکلریت سدیم ۵۰ درصد بمدت ۷ دقیقه، الکل ۷۰ درصد به مدت ۱ دقیقه ضد عفونی شده و سپس

در سه مرحله با آب مقطر شستشو شدند. سپس بذور در محیط کشت پایه MS (Murashige and Skoog, 1962) با ۰/۷٪ حجمی وزنی آگار قرار داده شد. بذور کشت شده در شیشه مربا و در اتاقک کشت با دمای ۲± ۲۷ درجه سانتیگراد و با فتوپریود ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی قرار داده شدند. جوانه زنی بذرها از روز سوم پس از کشت آغاز شد. پس از ۶ تا ۸ برگه شدن گیاهچه های درون شیشه ای، ریز نمونه هایی از برگ و میانگره ساقه، هر کدام به تعداد ۳ عدد در هر پتری دیش جهت تولید کالوس استفاده گردید (پیش تر ریز نمونه ساقه به دلیل عدم باززایی حذف گردید).

کالوس زایی

جهت تولید کالوس برگ هایی به قطر یک سانتی متر از گیاهچه های کشت بافتی جدا و به دو قسمت تقسیم شد و قطعات ساقه به همراه میانگره به طول ۱ الی ۲ سانتی متر تهیه شد و در محیط کشت MS حاوی ۳ تیمار جداگانه از تنظیم کننده های رشد به همراه تیمار شاهد قرار داده شدند به نحوی که سطح پشتی برگ (سطح پر روزنه) در تماس با آگار باشد. ترکیبات هورمونی شامل تیمار T_1 حاوی ۱میلی گرم بر لیتر BA و ۰/۵ میلی گرم بر لیتر 2,4-D ، تیمار T_2 شامل NAA و BA هر کدام به میزان ۵ میلی گرم در لیتر و تیمار T_3 محتوی۳ میلی گرم Kin و ۱ میلی گرم 2,4-D به وسیله فیلترسر سرنگی در محیط کشت با pH=5.8 استفاده شد. سپس کشت ها تحت شرایط تاریکی برای مدت زمان سه هفته در انکوباتور با دمای۳۵°C قرار گرفتند. در این مرحله صفات مورد مطالعه شامل تغییرات ظاهری ریز نمونه ها، تعداد و شکل کالوس، قطر و وزن کالوس ها، کیفیت ظاهری و رنگ کالوس ها اندازه گیری شد.

اندام زایی مستقیم و غیر مستقیم (ریشه، ساقه، برگ)

کالوس های بدست آمده از تیمارهای مختلف هورمونی بدون عمل واکشت و تغییر محیط هورمونی از محیط تاریک به روشنایی با شدت نور ۷۰ لوکس و دمای محیط ۲± ۲۷ درجه سانتی گراد انتقال داده شدند. پس از گذشت ۷ هفته تعداد شاخساره و درصد القای نوساقه اندازه گیری شد.

ریشه زایی نوشاخه ها

آزمایشی به منظور بررسی تأثیر غلظت نمک (MS) و هورمون های ایندول استیک اسید (IAA) و ایندول بوتیریک اسید(IBA) بر میزان ریشه زایی گیاهچه های باززایی شده در آزمایشگاه انجام گرفت. تیمارهای آزمایشی شامل محیط کشت MS , ½ MS و غلظت های هورمونی شامل ۱ و ۲ میلی گرم بر لیتر IBA و ۱ و ۲ میلی گرم بر لیتر IAA بودند. همچنین محیط کشت MS و ½ MS فاقد هورمون به عنوان تیمار شاهد استفاده شد. آزمایش به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملا تصادفی در ۳ تکرار صورت پذیرفت. در پایان واکشت ها، میانگین القای ریشه حاصله اندازه گیری گردید.

سازگاری در محیط *in vivo*

در آخرین مرحله، آزمایشی به منظور بررسی تاثیر نوع بستر کشت بر میزان زنده مانی گیاهچه ها انجام شد. تیمارهای آزمایشی شامل سه نوع بستر کشت T_1 (کوکوپیت، پرلیت، پیت ماوس)، T_2 (کوکوپیت،پرلیت) و T_3 (کوکوپیت، پرلیت، ورمی کمپوست) به ترتیب با نسبت ۳×۱×۱ (مشترک در هر سه تیمار) و تغذیه آبیاری با آب معمولی بود. آزمایش به صورت طرح کاملا تصادفی در ۳ تکرار صورت پذیرفت. آزمایش بدین صورت بود که گیاهچه های ریشه دار شده از محیط کشت خارج و ریشه ها با آب مقطر شسته شد و گیاهچه ها به گلدان های پلاستیکی حاوی بسترهای کشت T_1، T_2 و T_3 انتقال و برای حفظ رطوبت، گلدان ها با پوشش سلفونی شفاف پوشانده شدند و در اتاقک رشد نگهداری شدند. بعد از دو هفته درپوش گلدان بتدریج باز و گیاهچه های سازگار شده نهایتا به گلخانه با دمای ۲± ۲۷ درجه سانتی گراد و رطوبت نسبی ۷۰٪ منتقل و درصد زنده مانی گیاهچه ها محاسبه شد.

روش تجزیه آماری

تجزیه آماری داده ها با استفاده از نرم افزار آماری SPSS و مقایسه میانگین ها با آزمون چنددامنه ای دانکن انجام و نمودارها با استفاده از نرم افزار Excel رسم شد.

نتایج

اثر نوع ریز نمونه و تنظیم کننده های رشد بر کالوس زایی

ریز نمونه ها از هفته دوم شروع به تولید کالوس کردند و در هفته سوم کالوس های شفاف و نرم دو سوم برگ را در تیمار T_1 فرا گرفت و در تیمار های T_2 و T_3 برگها به رنگ سبز تیره، ضخیم و غول پیکر شدند. نتایج آنالیز واریانس نشان داد که نوع ریز نمونه و نوع و غلظت تنظیم کننده های رشد و اثر متقابل آنها بر وزن کالوس معنی دار بود(جدول ۱). ریز نمونه های برگ و میانگره در تیمار T_1 با تشکیل کالوس های روشن شفاف و یکدست و با بیشترین وزن تر و قطر کالوس نسبت به سایر تیمارهای هورمونی دارای اثرات معنی دار شد.

جدول۱: نتایج تجزیه واریانس اثر تیمارهای هورمونی و نوع ریز نمونه بر میانگین القای کالوس گیاه بذرالینج سیاه

منابع تغییرات	درجه آزادی	میانگین القای کالوس	
		برگ	میانگره ساقه
2,4-D × BA	۱	۱۰۰۷,۸۹**	۱۳۱۵,۰۴۲**
BA × NAA	۱	۳۰۲۵,۵۶**	۲۱۷۹,۵۶**
2,4-D × Kin	۱	۵۸۰۴,۷۴۶**	۴۳۵۷,۴۲۱**
اشتباه آزمایشی	۲۴	۴,۸۳	۷,۸۵

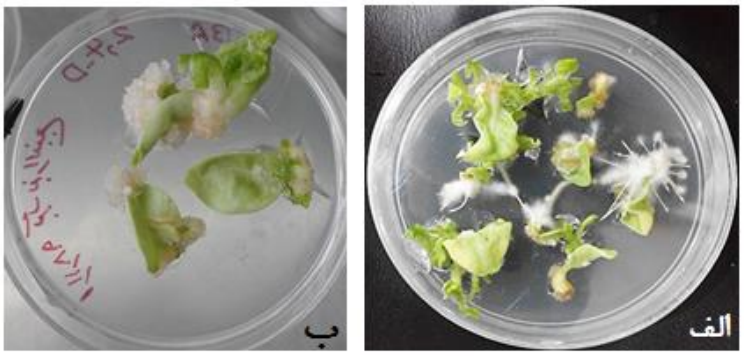
جدول ۲: صفات کیفی کالوس های گیاه بذرالبنج سیاه در محیط MS حاوی غلظت های مختلف هورمون

نوع تیمار و غلظت های هورمونی	نوع جدا کشت	بافت کالوس	رنگ کالوس
1BA+0/5۲ ,4-D	برگ	نرم و آبدار	**سفید شفاف**
	میانگره ساقه	نرم متوسط	**کرم روشن**
5NAA+5BA	برگ	سفت و جنین زا	**کرم قهوه ای مات**
	میانگره ساقه	ترد وکمی نرم	**سفید مات**
3 Kin +1 2,4-D	برگ	متراکم و جنین زا	**سبز تیره**
	میانگره ساقه	ترد و کمی نرم	**سفید مات**

مقایسه میانگین درصد کالوس زایی در ریز نمونه های برگ در محیط کشت MS تحت تیمار T_2 توسط آزمون تجزیه واریانس اختلاف معنی دار آماری را نشان داد. ۹۵ درصد کالوس زایی و بیشترین وزن تر و قطر کالوس در تیمار T_1 رخ داد. کالوس ها از نوع نرم و توپی به رنگ سفید شفاف بودند (شکل۱ الف). ریز نمونه میانگره ساقه با سرعت کمتری شروع به کالوس دهی کرد. ساقه و میانگره ابتدا متورم گردید و پس از گذشت ۳ ماه ناگهان وارد فاز کالوس زایی شد. تیمار T_2 و T_3 رفتار مشابهی را در پیش گرفتند. در این تیمارها فرایند کالوس زایی ابتدا به کندی صورت گرفت و نخست برگها غول پیکر شده و بافت اسفنجی و ترد و شکننده پیدا کردند و به رنگ سبز تیره در آمدند (شکل۱ب). که با توجه به آزمایشات صورت گرفته قبلی توسط نویسنده و نتایج مشابه اینگونه استنباط می شود که مقادیر بالای هورمون در محیط کشت ریز نمونه های بذرالبنج سیاه ابتدا سبب تغذیه کلی برگ و رشد آن می شود. سپس محل برش ریز نمونه ها قهوه ای رنگ شد و کالوس ها نه از محل برش و زخم بلکه بر روی سطح بالایی و زیرین برگ و از نوع سفت و نقطه ای و به شدت ساقه زا به رنگ سفید مات ایجاد شد. این کالوس ها به تدریج بزرگ شده و به هم پیوستند و کل ریز نمونه را فرا گرفتند.

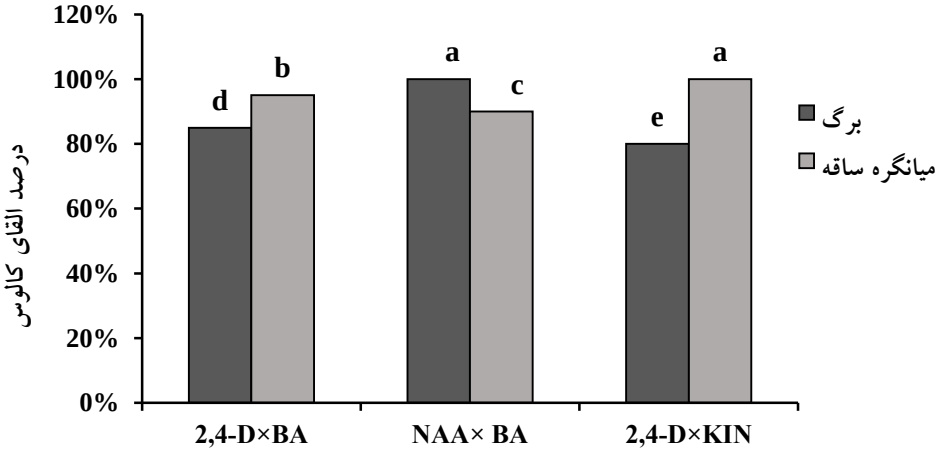
شکل ۱: الف) کالوس های نرم در تیمار T_1، ب) کالوس های سخت در تیمار T_2و T_3

تولید ریشه با ریشه های موئی فراوان در ریزنمونه میانگره ساقه و در برگ و بصورت مستقیم در تیمار T3 مشاهده شد (شکل۲ الف) و تنها مورد از باززایی در تیمار T1 (شکل ۲ ب) رخ داد. سایر نمونه ها همگی کالوس های توپی و غیر جنین زا بودند.



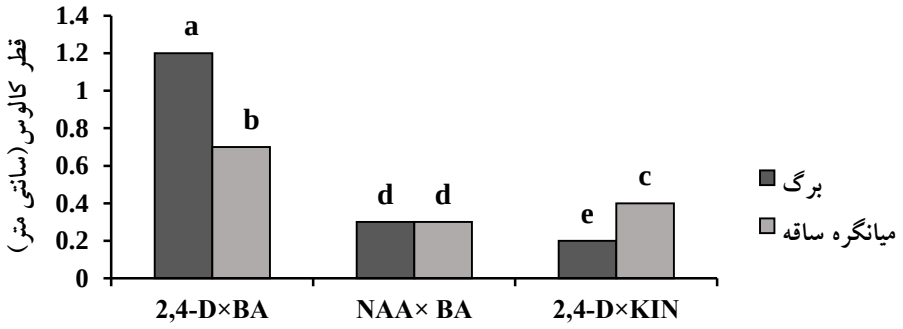
شکل۲: الف)تشکیل ریشه از محل کالوس در تیمار T_3 ، ب) باززایی از محل کالوس در تیمار T_1

نتایج مقایسه میانگین صفت درصد القای کالوس تحت تاثیر تنظیم کننده های رشد و نوع ریز نمونه در گیاه بذرالبنج سیاه در(شکل ۳) نشان داده شده است. همانطور که در این شکل دیده می شود، تنظیم کننده های رشد ی در تیمارT2 (NAA و BA)در ریز نمونه برگ و تیمار هورمونی T3 (2,4-D و Kin) در ریز نمونه میانگره ساقه با میانگین ۱۰۰درصد کالوس زایی دارای حداکثر میزان القای کالوس بود که اختلاف آماری معنی داری با سایر تیمارها نداشت. در کل در تمامی تیمارها القای کالوس با درصد بالا رخ داد که تنها تفاوت در بافت و کیفیت کالوس های تولیدی بود. در تیمار شاهد کالوس زایی ناچیز بود.



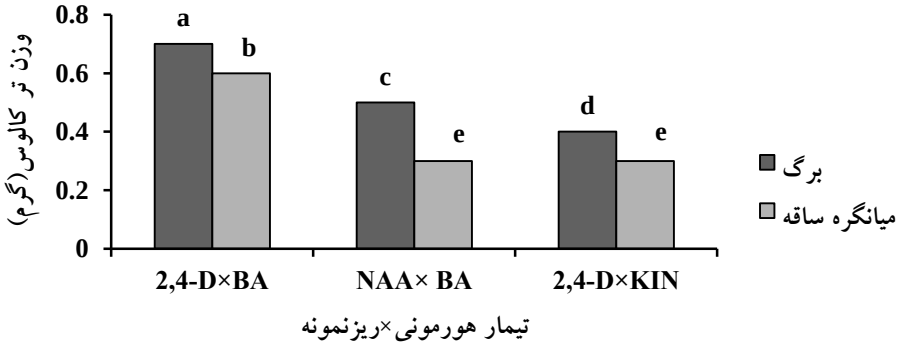
شکل۳: نمودار مقایسه میانگین درصد القای کالوس تحت تاثیر نوع ریز نمونه و تنظیم کننده های مختلف رشد

نتایج مقایسه میانگین قطر کالوس تحت تاثیر تنظیم کننده های رشد و نوع ریز نمونه در گیاه بذرالبنج سیاه (شکل ۴) بیانگر این است که تیمار هورمونی 2,4-D به همراه BA اختلاف آماری معنی داری را با سایر تیمارها و در خود تیمار با نوع ریز نمونه نشان می دهد. در این تیمار کالوس ها حجیم، توپی شکل و نرم و آبدار و به رنگ سفید شفاف بودند. میانگین بزرگترین قطر کالوس در ریز نمونه برگی به اندازه ۱/۲ سانتی متر بود.



شکل۴: نمودار مقایسه میانگین قطر کالوس تحت تاثیر اثرات متقابل غلظت و نوع تنظیم کننده های رشد و نوع ریز نمونه

در بررسی نتایج مقایسه میانگین وزن تر کالوس تحت تاثیر تیمارهای مختلف هورمونی و نوع ریز نمونه همانگونه که در شکل ۵ قابل مشاهده است، در تیمارهای مختلف هورمونی و بین ریز نمونه ها اختلاف آماری چندانی مشاهده نشد. چرا که اگرچه در تیمار T_1 کالوس ها بزرگ و یکدست بودند، اما در تیمار T_2 و T_3 مجموع تعداد هر کالوس بر سطح ریز نمونه ها زیاد بود و با وجود اینکه کوچک و کروی بودند اما در مجموع وزن خوبی پیدا کردند.



شکل۵: نمودار مقایسه میانگین وزن تر کالوس تحت تاثیر اثرات متقابل غلظت و نوع تنظیم کننده های رشد و نوع ریز نمونه

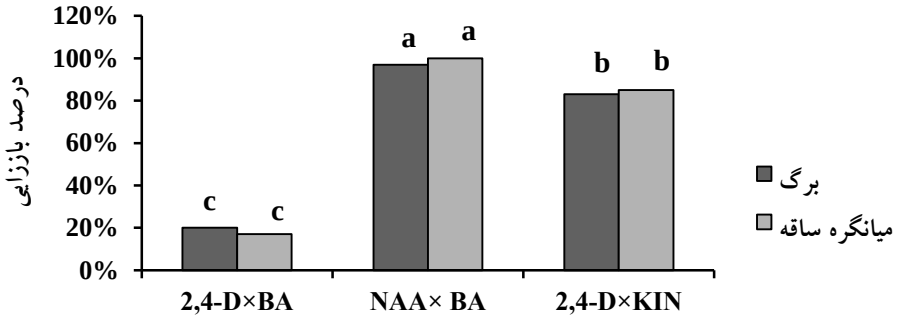
جدول ۳: نتایج تجزیه واریانس اثر تیمارهای هورمونی بر میانگین القای جوانه از کالوس های حاصل از ریز نمونه های مختلف گیاه بذرالینج سیاه

منابع تغییرات	درجه آزادی	میانگین القای جوانه ی باززایی	
		برگ	میانگره ساقه
2,4-D × BA	۱	۱۲۴۲,۶۳**	۱۴۷۵,۰۷۵**
BA × NAA	۱	۱۵۴۱,۹۳۴**	۱۱۶۳,۸۷۳**
2,4-D × Kin	۱	۱۶۴۳,۸۶۵**	۱۳۷۸,۶۵۹**
اشتباه آزمایشی	۲۴	۲,۸۵	۵,۷۳

** - معنی دار بودن در سطح احتمال ۱ درصد، *- معنی دار بودن در سطح احتمال ۵ درصد ns- عدم معنی دار بودن

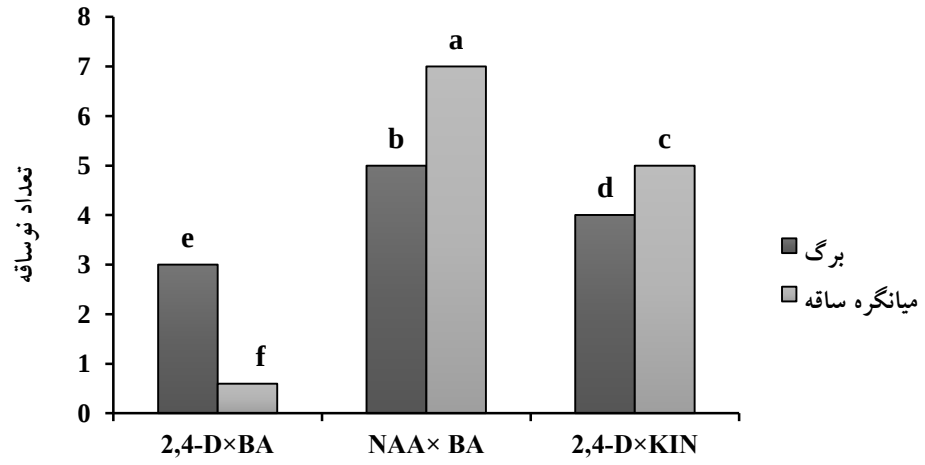
در بررسی های حاصل از مقایسه میانگین در صفت درصد باززایی همانگونه که در شکل ۶ مشاهده می شود، بیشترین درصد باززایی از کالوس در تیمار T_2 و بیشترین تعداد ساقه در هر ریز نمونه در همین تیمار رخ داد. به طوری که در هر ریز نمونه به

ابعاد یک سانتی متر مربع تا ۷ عدد جوانه نوساقه بر سطح بالایی و زیرین ریز نمونه برگ تشکیل شد. در این تیمار در چند مورد از ریز نمونه برگ و میانگره ساقه از محل کالوس ریشه تشکیل شد(شکل۲الف). تیمار BA در ترکیب با 2,4-D پاسخ مناسبی را به باززایی از خود نشان نداد، اگر چه در یک مورد در تمامی ریز نمونه های برگی، نوساقه تولید شد(شکل۲ب) که ممکن است بر اثر یکسان نبودن شرایط نگهداری و یا سایر عوامل تصادفی رخ داده باشد.



شکل۶: نمودار مقایسه میانگین درصد باززایی تحت تاثیر اثرات متقابل غلظت و نوع تنظیم کننده های رشد و نوع ریز نمونه

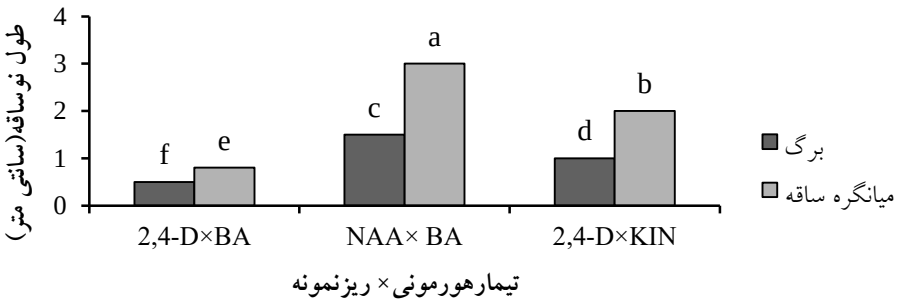
نتایج مقایسه میانگین نوع ریز نمونه، نوع و غلظت تنظیم کننده های رشد و همچنین بر هم کنش این عوامل بر همدیگر بر تعداد نوساقه طبق (شکل۷) نشان داد بیشترین تعداد نوساقه (۷ عدد) در تیمار کالوس تولید شده از ریز نمونه میانگره ساقه و برگ در محیط کشت حاوی NAA و BA مشاهده گردید که کالوس های فشرده و ترد داشتند (شکل۸) نتایج نشان داد که کیفیت کالوس نیز بر شاخه زایی اثر داشت. در پژوهش Yan و همکاران (۲۰۰۹) مشخص شد که کالوس های محکم و ترد، نسبت به کالوس های آبکی قابلیت بالاتری در شاخه زایی داشتند. نتایج این پژوهش با یافته های آنان همسویی داشت.



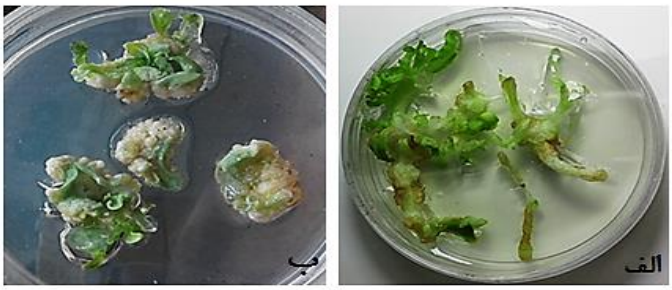
شکل۷: نمودار مقایسه میانگین تعداد نوساقه تحت تاثیر اثرات متقابل غلظت و نوع تنظیم کننده های رشد و نوع ریز نمونه

شکل ۸-الف) جوانه های تشکیل شده بر ریزنمونه برگی در تیمارT_2، ب) نوساقه های تشکیل شده بر میانگره ساقه در تیمار T_2

بلندترین شاخساره (3 سانتی متر) از کالوس تهیه شده از ریز نمونه میانگره در محیط کشت حاوی NAA و BA به دست آمد و با سایر تیمارها اختلاف معنی دار داشت (شکل ۱۰الف). در حالی که کمترین طول شاخساره مربوط به کالوس های به دست آمده از ریز نمونه برگ در محیط کشت حاوی 2,4-D و BA (تیمار۱) بود (شکل ۱۰ب). بر اساس گزارش Magyar-Tabori و همکاران(۲۰۱۰) غلظت های بالای سیتوکینین سبب جلوگیری از طولانی شدن شاخه و کوتاهی میانگره ها می شود که با نتایج این بررسی همسویی دارد.



شکل۹: نمودار مقایسه میانگین طول شاخساره تاثیر اثرات متقابل غلظت و نوع تنظیم کننده های رشد و نوع ریز نمونه



شکل ۱۰- الف)بلندترین طول نوساقه در ریز نمونه میانگره در تیمار ۲ ،ب) کمترین طول شاخساره در تیمار ۱

نتایج القای ریشه در نوشاخه ها

در تحقیق حاضر، اثر غلظت نمک در محیط کشت پایه MS و تیمار هورمونی IBA و IAA در گیاهچه های باززایی شده جهت ریشه زایی مورد بررسی قرار گرفت. حدود چهار هفته بعد از قرار گرفتن گیاهچه های حاصل از باززایی در محیط ریشه

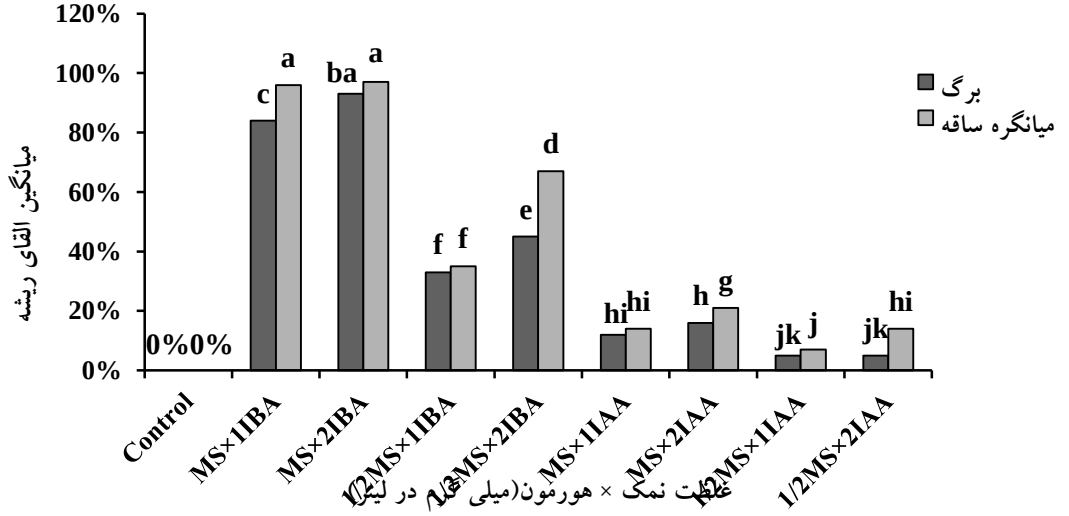
زایی، گیاهچه های ریشه دار شده با دقت از شیشه ها خارج و ریشه های القا شده شمارش شدند. نتایج تجزیه واریانس داده ها نشان داد که اثرات ساده و متقابل محیط کشت و هورمون بر القای ریشه در سطح احتمال یک درصد معنی دار بود (جدول۴). مقایسه میانگین اثرات متقابل هورمون و محیط بر القای ریشه نشان داد که محیط کشت MS کامل با غلظت ۲ میلی گرم بر لیتر IBA بیشترین میانگین القا ی ریشه را ایجاد کرد و کمترین میانگین القای ریشه در محیط½ MS و با غلظت ۱ میلی گرم بر لیتر IAA رخ داد (شکل۱۱). ریزشاخه هایی که در محیط کشت بدون اکسین قرار داده شدند، ریشه های ایجاد نکردند. نتایج مشابهی در کشت درون شیشه ای گیاه اسکوپولیا (*Scopolia carniolica*) به دست آمده است (Deliu *et al*., 2002). ریشه زایی به وسیله عوامل مختلفی نظیر وجود تنظیم کننده های رشد در محیط، ترکیب نمک های پایه، ژنوتیپ و شرایط محیطی تحت تأثیر قرار می گیرد. اکسین ها نقش مهمی در ریشه زایی دارند و برای بیشتر گونه ها وجود اکسین برای انگیزش ریشه زایی لازم است (Nhut *et al*., 2006).

جدول۴: تجزیه واریانس اثرات متقابل غلظت نمک در محیط کشت پایه MS و تیمارهورمونی بر میانگین القای ریشه گیاه بذرالبنج سیاه

منابع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات القای ریشه
غلظت نمک	۱	۸۹۱۵,۵۰۰**
تیمار هورمونی	۳	۹۷۴۰,۸۴۱**
غلظت نمک×تیمار هورمونی	۳	۵۶۴۳,۷۶۸**
خطای آزمایش	۲۱	۴۵,۷۵۳

**- اختلاف معنی دار در سطح احتمال ۱ درصد

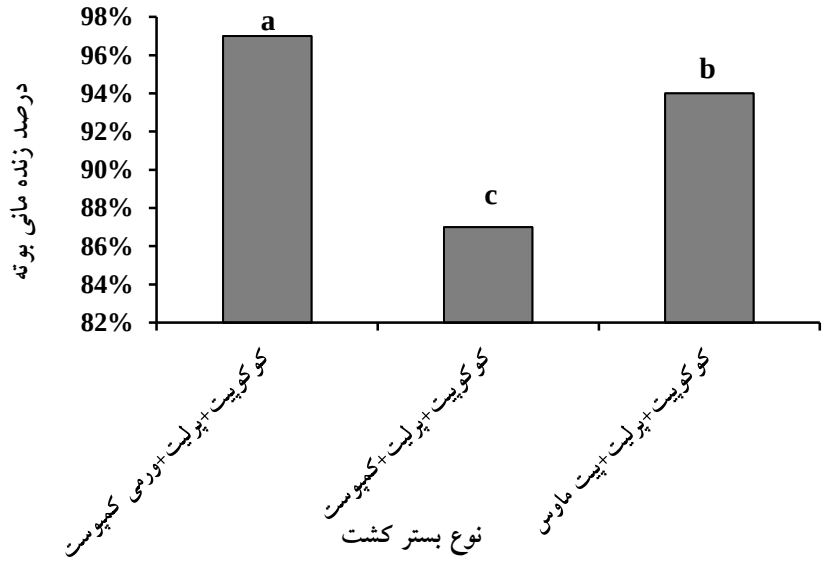
نتایج مقایسه میانگین درصد ریشه زایی نشان داد که بیشترین میزان ریشه دار شدن در گیاهچه های حاصل از باززایی در ریزنمونه گره ساقه رخ داد که این می تواند به توانایی ذاتی ساقه در ریشه زایی و انتقال این خصیصه به گیاهچه های باززایی شده رخ داده باشد. با افزایش غلظت هورمون میزان ریشه زایی کاهش یافت.



شکل۱۱: نمودار مقایسه میانگین درصد ریشه زایی تحت تاثیر غلظت های مختلف هورمونIBA

سازگاری

نتایج بدست آمده حاصل از آزمایش شرح داده شده در بخش روش آزمایش، حاکی از آنست که در ارتباط با اثر محیط سازگاری بر شاخص زنده مانی، بیشترین درصد زنده ماندن با میانگین ۹۷ درصد در محیط کوکوپیت، پرلیت و ورمی کمپوست مشاهده شد (شکل۱۲). کوکوپیت با ظرفیت نگهداری آب بیشتر و پرلیت به دلیل تخلخل و اکسیژن رسانی بهتر محیط مناسبی را برای رشد گیاهک ها ی کشت بافتی فراهم می نماید که در هر سه تیمار مشترک بود. ورمی کمپوست تاثیر بیشتری در زنده مانی بوته ها در مقایسه با کمپوست و پیت ماوس داشت به نظر می رسد که محتوای مواد ریزمغذی بیشتر، PH مناسب تر، بافت قوی تر و آلودگی کمتر می تواند دلیل این موضوع باشد.

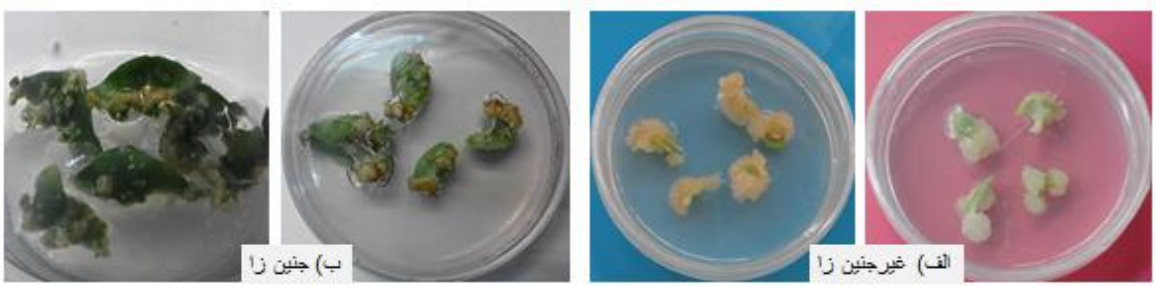


شکل۱۲: اثر بستر کشت سازگاری بر درصد زنده مانی گیاهان حاصل از باززایی در شرایط کشت درون شیشه ای ستون های با حروف غیر مشترک در سطح ۵ درصد آزمون چند دامنه ای دانکن اختلاف معنی داری با هم دارند.

بحث

نتایج به دست آمده تاکیدی بر این مطلب بود که جهت کالوس‌زایی نسبت بهینه از دو تنظیم کننده رشد اکسین و سیتوکینین مورد نیاز است (Dixon and Gonzales, 1996). اکسین به خصوص 2,4-D تشکیل جنین های سوماتیکی را القا می‌کند و تقسیم سلولی را باعث می شود، این تنظیم کننده های رشد در تشکیل کالوس نیز نقش داشته و از رشد جوانه های جانبی و ریشه جلوگیری می کنند. سیتو کینین ها نیز هم تقسیم سلولی و هم تمایز جوانه های جانبی را بر عهده دارند. سیتوکینین در سنتز DNA و mRNA نقش دارد، بنابراین در تقسیم سلولی نقش مهمی ایفا می کند، همچنین در تحریک ساخت پروتئین بر فعالیت برخی آنزیم ها از جمله tRNA synthetase دخالت دارد. تقسیم سلولی در نتیجه عمل توام اکسین و سیتوکینین تنظیم می شود که هر یک تاثیر خاصی بر چرخه سلولی دارند. اکسین به کار برده شده بر تکثیر DNA اثر دارد. در حالی که

سیتوکینین بر مسیر ساخت میتوز دخالت دارد. پس در محیط کشت حاوی اکسین، تنها کالوس تشکیل می شود و سلول ها نمی توانند وارد مرحله میتوز شوند، مگر اینکه سیتوکینین فراهم باشد (George *et al*., 2007). در تحقیق حاضر استفاده از غلظت های پایین تنظیم کننده های رشد تاثیر بیشتری بر درصد کالوس زایی نشان داد. میزان کاربرد تنظیم کننده های رشد خارجی به ژنوتیپ و میزان هورمون های داخلی گیاه بستگی دارد. بافت کالوس بسته به گونه گیاهی می تواند سفت و سخت (به علت وجود لیگنین) و یا ترد و شکننده باشد. با وجود اینکه کشت ریزنمونه های اولیه به کار گیری شده در تحقیق به صورت همزمان انجام گرفت، ویژگیهای کیفی از جمله بافت و رنگ کالوس های ایجاد شده در محیط کشت ها متفاوت بود. عوامل متعددی بر رنگ کالوس موثرند. در تحقیق حاضر میزان قهوه ای شدن و ابکی شدن در غلظت های بالای هورمونی مشاهده شد و در غلظت های بالای هورمونهای اکسین و سایتوکینین ویژگی جنین زا بودن مشاهده شد. کالوس های غیر جنین زا اغلب آبکی و دارای سلولهای کشیده هستند که هسته حجم کمی از سلول را اشغال کرده و به سختی باززایی می شوند (شکل ۱۳). در صورتی که کالوس های جنین زا ساختار فشرده تری دارند و سلولهای تشکیل دهنده آنها کم و بیش کروی و دارای هسته بزرگی هستند که این نمونه در تیمار 2,4-D و Kin ، NAA و BA به راحتی قابل مشاهده بود (شکل۱۳).



شکل ۱۳: الف)کالوس های غیر جنین زا، شفاف و آبکی، ب)کالوس های جنین زا با ساختار فشرده

میزان اکسین و سیتوکینین به کار برده شده در محیط کشت و شرایط اتاق کشت نیز بر رنگ و سفتی بافت کالوس موثرند. کالوس های تولید شده در این آزمایش در تیمارهای مختلف دارای خصوصیات ظاهری و فیزیکی متفاوتی بودند و قابلیت تمایز به ریشه، اندام های هوایی و یا جنین های سوماتیکی را از خود نشان دادند. در این بررسی ضمن تشکیل کالوس هایی با رنگ ها و اشکال مختلف، در نمونه های مورد بررسی، شروع کالوس دهی و رشد آن از سرعت بالایی برخوردار بوده است که میزانی از تمایز در تیمار2,4-D و BA مشاهده شد و در سایر تیمارها تا ۱۰۰٪ باززایی مشاهده شد. از آنجا که کیفیت کالوس به نوع و میزان عناصر موجود در محیط کشت(ماکرو، میکرو، ویتامین ها و ...) وابسته است، تنظیم کننده های مختلف رشد می توانند روی این متغییر اثر گذار باشند. در تحقیق حاضر می توان تیمار 2,4-D و BA هر کدام با غلظت ۵ میلی گرم در لیتر را از حیث کیفیت و اندازه کالوس و به دلیل تولید کالوس با بیشترین قطر و از نوع توپی و به رنگ سفید شفاف به عنوان پروتوکل کالوس زایی معرفی نمود و تیمار NAA و BA با کالوس های متعدد نقطه ای و فشرده و جنین زایی بالا به عنوان پروتوکلی برای باززایی از گیاه بذرالبنج سیاه معرفی نمود. اگرچه نیاز به تحقیقات بیشتر در این زمینه برای دستیابی به نتایج بهتر می باشد.

همچنین نتایج نشان داد که تیمار 2,4-D و BA ریز نمونه ها را به سمت کالوس زایی و نه باززایی تحریک کرد. اگر چه که تغییر شرایط محیطی سبب سوق دادن برخی از کالوس های تکامل یافته به سمت باززایی شد. در حالی که تیمارهای NAA ، BA و Kin، 2,4-D ابتدا سبب غول پیکری و ترد و اسفنجی شدن برگ و میانگره ساقه شد سپس از کالوس های نقطه ای و متراکم ایجاد شده که گویی از منفذ روزنه ها شکل گرفته بودند باززایی شدید رخ داد به گونه ای که در اطراف هر کالوس متراکم و نقطه ای تعداد زیادی جوانه باززایی با بیشینه تا ۷ عدد در دو سطح ریز نمونه ظاهر شد. ریشه زایی درون شیشه ای نیز توسط عوامل مختلفی مانند تنظیم کننده های رشد، ترکیب نمک های پایه، ژنوتیپ و شرایط کشت کنترل می شود. در بیشتر گونه ها وجود اکسین برای ریشه زایی لازم است. همچنین نسبت اکسین به سیتوکینین برای القا و رشد ریشه فاکتور مهمی محسوب می شود و با افزایش اکسین و کاهش سیتوکینین، ریشه ها تشکیل می شوند (Tripathi & Tripathi. 2003). به طور کلی ریشه زایی درون شیشه ای به میزان تنظیم کننده های رشد خارجی وابسته است و میزان تنظیم کننده های رشد خارجی نیز به مقدار مواد تنظیم کننده های رشد اندروژن گیاه بستگی دارد (Nhut *et al.*,2006).

نتیجه‌گیری کلی

در مجموع در این تحقیق بین ریز نمونه های مختلف و تیمارهای هورمونی در هر سه آزمایش اثرات معنی دار شدند. آزمایش نشان داد که تحت تنش قرار دادن ریز نمونه های کشت شده و ایجاد شرایط متغییر سبب تحریک باززایی می شود. در حالی که شرایط ثابت نور و دما تغییرات کمتری را سبب می شود. بعلاوه استفاده از مقادیر بالا و بیش از نیاز هورمون های اکسین و سایتوکینین سبب تاخیر در کالوس دهی و باززایی می شود چرا که هورمون در ابتدا صرف بزرگ شدن ریز نمونه می شود. برش های بیشتر در ریز نمونه، استفاده از ریز نمونه های سالم و قوی، محیط کشت با نرمی مناسب بسته به ضخامت برگ، ایجاد تماس مناسب ریز نمونه با سطح محیط کشت و بسیاری عوامل و نکات جزئی اما تاثیر گذار بر نتایج آزمایش موثر است. این بررسی یک پروتوکل تولید کالوس، شاخه زایی غیر مستقیم، ریشه زایی نابه جا و همچنین سازگاری گیاه بذرالبنج سیاه است که بر اساس نتایج این پژوهش استفاده از غلظت های تعیین شده تنظیم کننده های رشد گیاهی برای ریز ازدیادی بذرالبنج سیاه پیشنهاد می شود (شکل۱۴). روش ارائه شده در این پژوهش علاوه بر تکثیر گیاه می تواند برای حفظ ژرم پلاسم، انتقال ژن و استخراج ترکیبات دارویی مثل هیوسین و اسکوپولامین از کالوس مورد استفاده قرار گیرد.

شکل۱۴: مراحل بهینه سازی کالوس ، باززایی و سازگاری در بذرالبنج سیاه (*Hyoscyamus niger* L.) از چپ به راست

منابع

Aminnejad M, Hosseini B, Kaderi A. (2013). Investigating the effect of growth regulators on the regeneration of reticulate seed from the explant of Hyoscyamus reticulatus L., papers of Iranian conferences. The first international congress and the 13th Iranian genetics congress

Basu P. and S. Chand. (1996). Regeneration of plantlets from root-derived callus of Egyptian Henbane. Cell Chromosome Research, 19:31-34.

Chand, S., Basu, P. (1998). Embryogenesis and plant regeneration from callus cultures derived from unpollinated ovaries of *Hyoscyamus muticus L.*. Plant Cell Reports 17, 302–305.

Cheng, J., Raghavan, V. Amer. J.Bot: (2005). Somatic embryogenesis and plant regeneration *Hyoscyamus niger*. Biologia Plantarum volume 49, pages427–430(2005). 72: 580–587, 1985.

Deliu C, Keul A, Munteanu-Deliu C, Cost A,ŞTEFĂNESCU C and Tamas M (2002). Tropane Alkaloid biosynthesis in tissue cultures of scopolia carniolica JACQ. Contribuţii Botanice. Pp. 155-164.

Farsi M, Zolala J.(2003). Plant biotechnology. (in Persian). ACECR - Mashhad Branch Publication , pp: 87 - 120.

George, E.F., Hall, M.A. and Klerk. G.D., (2007). Plant propagation by tissue culture(Vol 1). Springer, 508 p.

Ghorbanpour M, Omidi M, Etminan A, Hatami M and Shooshtari L (2013) *In vitro* hyoscyamine and scopolamine production of black henbane (*Hyoscyamus niger*) from shoot tip culture under various plant growth regulators and culture medi. Trakia Science. (2): 125-134.

Ghorbanpour, M., Omidi, M., Etminan, A., Hatami, M., and Shooshtari, L. (2013). In Vitro hyoscyamine and scopolamine production of black henbane *(Hyoscyamus niger)* from shoot tip culture under various plant growth regulators and culture medi. Science Journal. 2: 125-134.

Khater M.A.1 and M.M.A. Elashtokhy (2015). Effect of growth regulators on *in vitro* production of *Hyoscyamus aureus* L. and tropane alkaloids International Journal of ChemTech Research, 8(11):113-119.

Magyar-Tabori , K., Dobranski, J., Teixeira da Silva, J.A., Bulley, S.M. and Hudak. I., (2010). The role of cytokinins in shoot organogenesis in apple. Plant Cell. Tissue and Organ Culture, 101: 251-267.

Masoumi Asl A., Aryai-nejad A., Dehdari M. (2014). Investigation of direct reproduction in German (Matricaria chamomilla L.) and Shirazi (Matricaria recutita L.) chamomiles in vitro. Journal of Horticultural Science, 29(4): 609-601.

Memon, N., (2012). In vitro propagation of Gladiolus plantlets and cormlets. Journal of Horticultural Science and ornamental plants, 4: 280-291. 2012

Mohinder K, Ajmer Singh D, Jagdeep Singh S, Amrik Singh S and Satbir Singh G (2013) Effect of media composition and explant type on the regeneration of eggplant (*Solanum melongena* L.). Biotechnology. 12(8): 860-866.

Murashige T. and Skoog F. (1962). A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. Physiological Plantarum, 15(3): 473-497.

Nazeri S. et al. (2013). Callus induction using different concentrations of NAA and BAP hormones in hemp plant (Hyoscyamus niger). Articles of Iranian conferences. The first national conference on medicinal plants and sustainable agriculture. Hagmetane Environmental Assessors Association. 2012

Nhut. D.T., Duy. N.,Vy,N.N.h., Khue, C.D., Khiem.D.V . and Vinh, D.N., (2006). Impact of Antlnurium spp. Genotype on callus induction derived from leaf explants, shot and root regeneration capacity from callus. Journal of Applied Horticulture, 8(2): 135-137.

Ochatt, S.J ., Abirached-Darmency, M., Marget, P . and Aubert, G., (2007). The *Lathyrus paradox*: poor mens

Omid Beigi R. (2018). Production and processing of medicinal plants, second volume. Astan Quds Razavi Publications. 438 pages

Omid M. and Farzin N. (2013). Biotechnology solutions to increase the effectiveness of medicinal plants. Modern Genetics, 7(3):220-209.

Piric, R. L. M. (1976). Basics of plant tissue culture, (Translators: Bagheri, A.R., Safari, M., 1376), Ferdowsi University of Mashhad Publications, No. 211, Mashhad, 406 pages

Rout G, Saxeena C, Samantaray S and Das P (1999) Rapid clonal propagation of Plumbago zeylanica Linn. Plant Growth Regulation. 28: 1-4.

Rout, G.R., S. Samantaray, J. Mottley and P. Das. (1999). Biotechnology of the rose a review of recent progress. Science Horticulture, 81: 201-228.

Stefaniak, B., (1994). Somatic embryogenesis and plant regeneration of Gladiolus (*Gladiolus Hort*.) plant cell Reports, 13: 386-389.

Tripathi, L. and Tripathi. J.N., (2003). Role of biotechnologe in medicinal plants. Tropical Journal of Pharmaceutical research.2(2): 243-253.

Uranby S. (2005). Thidiazuron induced adventitious shoot regeneration in *Hyoscyamus niger* L. Biological Plantarum, 49: 418-430.

Yan, M., Xu. Ch., Kim, Ch., Um, Y., Bah, A.A. and Guo, D., (2009). Effects of explant type, culture media and growth regulators on callus induction and plant regeneration of Chinese jiaotou *(Allium chinense)*. Scientia Horticulturae, 123: 124-128.