نشریه علمی تحقیقات ژنتیک و اصلاح گیاهان مرتعی و جنگلی ایران
جلد ۲۷، شماره ۲، صفحه ۲۳۹-۲۳۱ (۱۳۹۸)
شناسه دیجیتال (DOI): 10.22092/ijrfpbgr.2019.121460.1300
شناسه دیجیتال (DOR): 98.1000/1735-0891.1398.27.232.54.2.1575.41

اثر تنظیم‌کننده‌های رشد بر کالوس‌زایی و باززایی درون شیشه‌ای گیاه شابیزک (*Atropa belladonna*)

بتول زارعی[۱]، زهرا تقی‌پور[۲*] و دانیال کهریزی[۳]

۱- دکترای گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ایلام

۲*- **نویسنده مسئول مکاتبات، دانشجوی دکتری، گروه زراعت و اصلاح نباتات،** دانشکده کشاورزی، دانشگاه ایلام

پست الکترونیک: zahrataghipour928@gamil.com

۳- دانشیار، دانشکده کشاورزی، دانشگاه رازی، کرمانشاه

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۰۱/۳۰ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۰۹/۱۷

چکیده

شابیزک (*Atropa belladonna*) گیاهی از خانواده سولاناسه، یکساله و دارای یکی از آلکالوئیدهای تروپانی مهم به نام هیوسیامین می‌باشد. با توجه به اهمیت دارویی و اقتصادی کشت شابیزک، پیشرفت در روش‌های کشت بافت و باززایی این گیاه در شرایط *in vitro* به‌منظور آسان نمودن روش‌های انتقال ژن به این گیاه دارویی مهم می‌باشد. ازاین‌رو در این تحقیق بهینه‌سازی شرایط کشت به‌منظور تولید کالوس و باززایی گیاه *Atropa belladonna* بررسی گردید. برای تولید کالوس ابتدا بذرهای استریل شابیزک در محیط کشت MS کشت شدند. پس از جوانه‌زنی بذر و رشد گیاهچه‌ها به مدت دو ماه، ریزنمونه‌های ساقه و برگ در محیط کشت MS حاوی ترکیبی از غلظت‌های هورمونی مختلف 2,4-D (۰، ۰/۵ و ۱ میلی‌گرم در لیتر) و Kin (۰، ۱ و ۲ میلی‌گرم در لیتر) قرار گرفتند. برای بررسی درصد باززایی کالوس‌های حاصل از ریزنمونه ساقه از هورمون Kin در چهار سطح (۰، ۳، ۵ و ۸ میلی‌گرم در لیتر) در قالب طرح کاملا تصادفی با سه تکرار استفاده شد. نتایج نشان داد که از نظر تیپ ریزنمونه، ریزنمونه‌های ساقه بیشترین کالوس‌زایی را داشتند. از نظر غلظت‌های هورمونی، ترکیب دو هورمون در غلظت‌های MS+2mg/l Kin +1mg/l 2,4,D و همچنین MS+1mg/l Kin +1mg/l 2,4,D بیشترین میزان تولید کالوس را نشان دادند. افزایش غلظت هورمون Kin در محیط MS با افزایش درصد باززایی ارتباط مستقیم داشت و بیشترین میزان باززایی در غلظت ۸ میلی‌گرم در لیتر با ۳۶/۶۶ درصد دیده شد.

واژه‌های کلیدی: باززایی، کالوس‌زایی، 2,4,D، Kin، *Atropa belladonna*

مقدمه

شابیزک با نام علمی *Atropa belladonna* گیاهی از خانواده سولاناسه و یکساله می‌باشد. گونه‌های این گیاه بومی اروپا (استرالیا، اوکراین و آلبانی)، شمال افریقا (آلگریا، موروکو) و غرب آسیا (ایران، ترکیه) می‌باشند (Rani & Prasad, 2013). به دلیل اهمیت فراوان ماده موثره این گیاه و همچنین اهمیت اقتصادی شابیزک، همه ساله در بسیاری از کشورهای اروپایی زمین‌های زیادی به کشت این گیاه اختصاص می‌یابد (Omidbaigi, 2006). شابیزک یکی از آلکالوئیدهای تروپانی مهم را به نام هیوسیامین دارد (Rothe & Drager, 2002)، گیاهی پایا و به‌ارتفاع یک تا یک و نیم متر که دارای ریشه‌هایی دراز، منشعب، ضخیم، گوشت‌دار و

به‌رنگ حنایی است. ساقه آن استوانه، پوشیده از تار و در انتها دارای تقسیمات دوتایی یا سه‌تایی می‌باشد و قسمت‌های مورد استفاده این گیاه برگ، ریشه، میوه و دانه آن است (Rothe & Drager, 2002). در ریشه شابیزک تغییرات مقدار کلی آلکالوئیدها زیاد است ولی تغییرات در برگ گیاه کمتر است، از این نظر مصرف برگ شابیزک توصیه شده و به‌علت وجود همین اختلاف در مقدار کلی آلکالوئیدهای ریشه است که همیشه در مصارف درمانی آن را به مقدار کم به‌کار می‌برند (Zargari, 1996). موارد استعمال خارجی شامل: باز کننده مردمک چشم، آرام‌بخش، ضدتشنج و سیاه‌سرفه است. در طب سنتی برای رفع سردرد، قائدگی، زخم معده، آلرژی، التهاب ناشی از سوختگی و برطرف‌کننده تهوع پیشنهاد می‌شود. همچنین در درمان بیماری پارکینسون، پادزهر مارگزیدگی و دردهای معده مورد استفاده قرار می‌گیرد (Rani & Prasad, 2013).

نظر به اهمیت گیاه دارویی شابیزک، استفاده از روش‌هایی در جهت افزایش تولید متابولیت‌های ثانویه مهم و ضروری به نظر می‌رسد. همچنین برداشت بی‌رویه آن از طبیعت ممکن است موجب انقراض نسل این گیاه دارویی شود. استفاده از روش‌های بیوتکنولوژی شامل کشت بافت و ریزازدیادی منجر به تولید انبوه این گیاه با اهمیت در یک سطح محدود و جلوگیری از انقراض نسل آن می‌گردد.

ازدیاد در شرایط *in vitro* دارای قابلیت زیادی برای تولید گیاهان دارویی با کیفیت بالا می‌باشد که این مهم می‌تواند از طریق روش‌های مختلف ریزازدیادی به‌دست آید. با توجه به ارزش بالای برخی گیاهان جنس *Solanum* از نظر دارویی، مطالعاتی روی کشت درون شیشه‌ای در گونه‌های *S. nigrum* (Xu *et al.*, 2014)، *S. aethiopicum* (Gisbert *et al.*, 2006)، *S. virginum* (Borgato *et al.*, 2007)، *S. americanum* (Sánchez *et al.*, 2010)، *S. villosum* (Hussein & Aqlan, 2011) و برخی دیگر گزارش شده است. Nodertzehi Nahook (۲۰۱۴) به‌منظور القا کالوس و ریزازدیادی گیاه دارویی *Withania somnifera*، ریزنمونه برگ، ریشه و میان‌گره را بر روی محیط کشت پایه MS حاوی غلظت‌های مختلف هورمون ۲،۴-D و BA[۱] کشت و بیان کردند که در تمام محیط‌های مورد استفاده بیشترین درصد القاء کالوس (۱۰۰٪) متعلق به ریزنمونه برگ می‌باشد.

در تکثیر گیاهان دارویی، باززایی گیاه از کالوس کاربرد فراوانی دارد (Kokate, 2006). پاسخ به باززایی درون‌شیشه‌ای در گونه‌های مختلف خانواده سولاناسه از ریزنمونه‌های متنوعی از قبیل برگ (Mohammed *et al.*, 2015)، نوک ساقه (Babaei *et al*,. 2014)، گره (Sommer *et al.*, 2012)، کوتیلدون (Mulwa & Bhalla, 2006) و پروتوپلاست (Karamian, 2007) گزارش شده که در این بین، باززایی قطعات برگ به دلیل تهیه آسان مطلوبتر بوده است. همچنین بافت کالوس گیاهی علاوه بر ازدیاد گیاهان، قابلیت‌های متنوع دیگری ازجمله استفاده در انتقال ژن به گیاه و تهیه کشت‌های سوسپانسیون سلولی به‌منظور تولید متابولیت‌های ثانویه و یا ترکیبات مفید دیگر حاصل از آنها دارد (Kayser & Ouax, 2007). Chaturvedi و همکاران (۲۰۰۴) بیان کردند که محیط کشت حاوی BAP[۲]، اکسین و TDZ[۳] برای توسعه ریشه *Atropa belladonna* و *Solanum khasianum* مناسب است، ترکیب دیگری از NAA[۴] و 2,4,D برای ساقه‌زایی و همچنین جنین‌زایی *Atropa belladonna* گزارش شده است (Yun & hashimoto, 1992). Ganapathi و همکاران (۲۰۰۴) کالوس‌های توتون از خانواده سولاناسه از محیط آگار حاوی B5 +10µm NAA BA +10µm را به محیط عاری از هورمون برای شاخه‌زایی منتقل کردند که به نتایج چشمگیری هم دست یافتند. محیط MS عاری از هورمون برای تولید ریشه در دمای ۲۵ درجه سانتیگراد تحت ۱۶

۱- Benzyl Adenine

۲- Benzyl Amino-Purine

۳- Thidiazuron

۴- Naphthalene Acetic Acid

ساعت روشنایی ثبت شد. بهینه‌سازی فرایند کشت بافت و باززایی شابیزک با استفاده از روش‌های مختلف مانند باززایی غیرمستقیم، می‌تواند برای انجام تحقیقات بنیادی و کاربردی ازجمله دست‌ورزی‌های ژنتیکی مانند تراریختی، تغییر سطوح پلوئیدی و مهندسی متابولیک مسیرهای بیوسنتزی انواع متابولیت‌های ثانویه مهم در شابیزک مفید باشد. بنابراین هدف از انجام این پژوهش دستیابی به یک دستورالعمل مناسب برای کالوس‌دهی و باززایی این گونه گیاهی در شرایط درون شیشه‌ای است.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه بذرهای شابیزک (*Atropa belladonna*) از باغ گیاه‌شناسی ملی ایران (مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع کشور) تهیه گردید. قبل از کشت بذرها استریل شدند. برای استریل، بذرهای نسبتاً ریز شابیزک ابتدا به مدت یک دقیقه در اتانول ۷۰ درصد قرار گرفته و پس از شستشوی کامل به مدت ۲۰ دقیقه در آب ژاول ۳۵ درصد (هیپوکلریت سدیم حاوی ۵ درصد کلر فعال) قرار گرفتند. در پایان سه تا چهار بار آبکشی در شرایط استریل در زیر هود با استفاده از آب مقطر استریل انجام شد. سپس بذرهای استریل شابیزک به تعداد ۱۰ تا ۱۲ عدد در شیشه‌های حاوی محیط کشتMS کشت شدند. بذرهای کشت شده در اتاق کشت با نور حدود ۱۱۰ میلی‌مول فوتون بر مترمربع در ثانیه و دوره نوری ۱۲ ساعت تاریکی و ۱۲ ساعت روشنایی و دمای ۲۴ تا ۲۶ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند (Ajmal Khan *et al.*, 2002). پس از جوانه‌زنی بذر و رشد گیاهان به مدت دو ماه، از ریزنمونه‌های ساقه و برگ در محیط کشت‌های مختلف (جدول ۱) برای تولید کالوس استفاده شد.

برای القای کالوس ریزنمونه‌های ساقه و برگ در محیط کشت MS از آزمایش فاکتوریل در قالب طرح پایه کاملا تصادفی استفاده شد. فاکتور A، هورمون Kin در ۳ غلظت (۰، ۱ و ۲ میلی‌گرم در لیتر) و فاکتور B هورمون 2,4-D در سه غلظت (۰، ۰/۵ و ۱ میلی‌گرم در لیتر) استفاده شدند. در ادامه تحقیق برای بررسی درصد باززایی کالوس‌های شابیزک از هورمون Kin در چهار سطح (۰، ۳، ۵ و ۸ میلی‌گرم در لیتر) در قالب طرح کاملا تصادفی با سه تکرار استفاده شد. درصد کالوس‌زایی با استفاده از رابطه ۱ و درصد باززایی با استفاده از رابطه ۲ محاسبه گردید.

۱۰۰×(تعداد ریزنمونه‌های کشت شده / تعداد کالوس‌های تولید شده)= درصد کالوس‌زایی(۱)

۱۰۰×(تعداد کالوس‌های منتقل شده / تعداد کالوس‌های باززایی شده)= درصد باززایی(۲)

تجزیه‌وتحلیل داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SAS نسخه ۹/۱ انجام گردید و قبل از انجام آنالیز واریانس، نرمال بودن داده‌ها بررسی شد. برای انجام آزمون مقایسه میانگین‌ها از آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال پنج درصد استفاده شد.

نتایج

بررسی اثر هورمون‌ها و نوع ریزنمونه بر میزان کالوس‌زایی

بعد از گذشت یک هفته از کشت ریزنمونه‌ها روی محیط کشت حاوی هورمون، ریزنمونه‌ها شروع به تولید کالوس کردند و بعد از گذشت حدود یک ماه کالوس‌ها به‌طور کامل رشد کرده و توسعه یافتند. تأثیر ترکیبات هورمونی متفاوت بر تولید کالوس در ریزنمونه‌های ساقه و برگ در جدول ۱ نشان داده شده است. نتایج حاصل از تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که نوع ریزنمونه و غلظت هورمون‌های استفاده شده و همچنین اثر متقابل ریزنمونه و هورمون بر تعداد کالوس‌های تولید شده در سطح احتمال یک درصد اثر معنی‌دار داشتند. این بدان مفهوم است که فاکتورهای مورد مطالعه از نظر تأثیر بر صفت مورد مطالعه به صورت مستقل از یکدیگر عمل نمی‌کنند و وابسته به یکدیگر می‌باشند.

در مقایسه اثر متقابل دو هورمون Kin و 2,4-D بر کالوس‌زایی گیاه شابیزک نشان داد که بیشترین تعداد کالوس

در ریزنمونه ساقه با ترکیب MS+2mg/l Kin +1mg/l 2,4,D با متوسط ۸۰/۳۳ درصد و MS+1mg/l Kin +1mg/l 2,4,D با متوسط ۷۸ درصد بدست آمد و کمترین درصد کالوس در ساقه از نمونه شاهد (فاقد هورمون) بدست آمد که بدون اختلاف معنی‌دار با ترکیب‌های MS+0.5 mg/l 2,4,D، MS+1 mg/l 2,4,D، MS+2 mg/l Kin و MS+1mg/l Kin +0.5mg/l 2,4,D بود و از نظر آماری در یک گروه قرار گرفتند.

در ریزنمونه برگ بیشترین درصد کالوس‌دهی در ترکیب‌های MS+2mg/l Kin +1mg/l 2,4,D و MS+2mg/l Kin +0.5mg/l 2,4,D با متوسط ۵۹ و ۵۴/۳۳ درصد و ترکیب MS+0.5 mg/l 2,4,D با متوسط ۱۷/۶۶ درصد کمترین درصد کالوس‌دهی مشاهده شد. در مجموع کالوس‌زایی در ریزنمونه ساقه همراه با برتری نسبی Kin به 2,4,D باعث حداکثر کالوس‌زایی شد و در شرایط عدم حضور Kin یا 2,4,D و یا افزایش نسبت 2,4,D به Kin میزان کالوس‌زایی کاهش یافت. کالوس‌های تولید شده از ریزنمونه ساقه در مقادیر ۲ میلی‌گرم بر لیتر Kin و ۱ میلی‌گرم بر لیتر 2,4,D کالوس‌های سبز رنگ و با ساختار کروی و سفت بودند (شکل ۲). البته کالوس‌های تولید شده در این محیط نسبت به کالوس‌های تولید شده در سایر ترکیبات هورمونی از مقدار بیشتری برخوردار بودند.

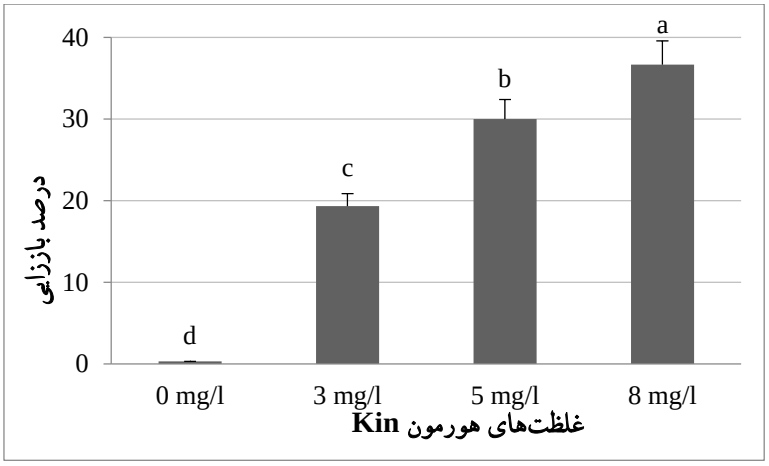
جدول ۱- اثر محیط کشت MS همراه با غلظت‌های متفاوت هورمون‌های 2,4-D و Kin بر القای تولید کالوس از ریزنمونه‌های ساقه و برگ گیاه *Atropa belladonna*

ردیف	ترکیبات محیط کشت	درصد کالوس‌دهی	
		ساقه	برگ
۱	MS فاقد هورمون	۲۴/۴±۳۳/۰۴ d	۶/۱±۳۳/۵۲d
۲	MS+0.5 mg/l 2,4,D	±۰۰/۳۵ ۵/۰۰cd	۱۷/۲±۶۶/۵۱c
۳	MS+1 mg/l 2,4,D	۴۴/۴±۳۳/۰۴ c	۲۲/۲±۳۳/۵۱c
۴	MS+1 mg/l Kin	۶۳/۸±۶۶/۰۸ b	۲۲/۲±۶۶/۵۱c
۵	MS+2 mg/l Kin	۴۷/۲±۶۶/۵۱c	۳۴/۳±۰۰/۶۰b
۶	MS+1mg/l Kin +0.5mg/l 2,4,D	۳۴/۴±۳۳/۰۴cd	۳۲/۲±۶۶/۰۸b
۷	MS+2mg/l Kin +0.5mg/l 2,4,D	۷۴/۶±۳۳/۰۲ab	۵۴/۴±۳۳/۰۴a
۸	MS+1mg/l Kin +1mg/l 2,4,D	۷۸/۸±۰۰/۱۸a	۳۲/۲±۰۰/۶۴b
۹	MS+2mg/l Kin +1mg/l 2,4,D	۸۰/۵±۳۰/۵۰ a	۵۹/۳±۰۰/۶۰a

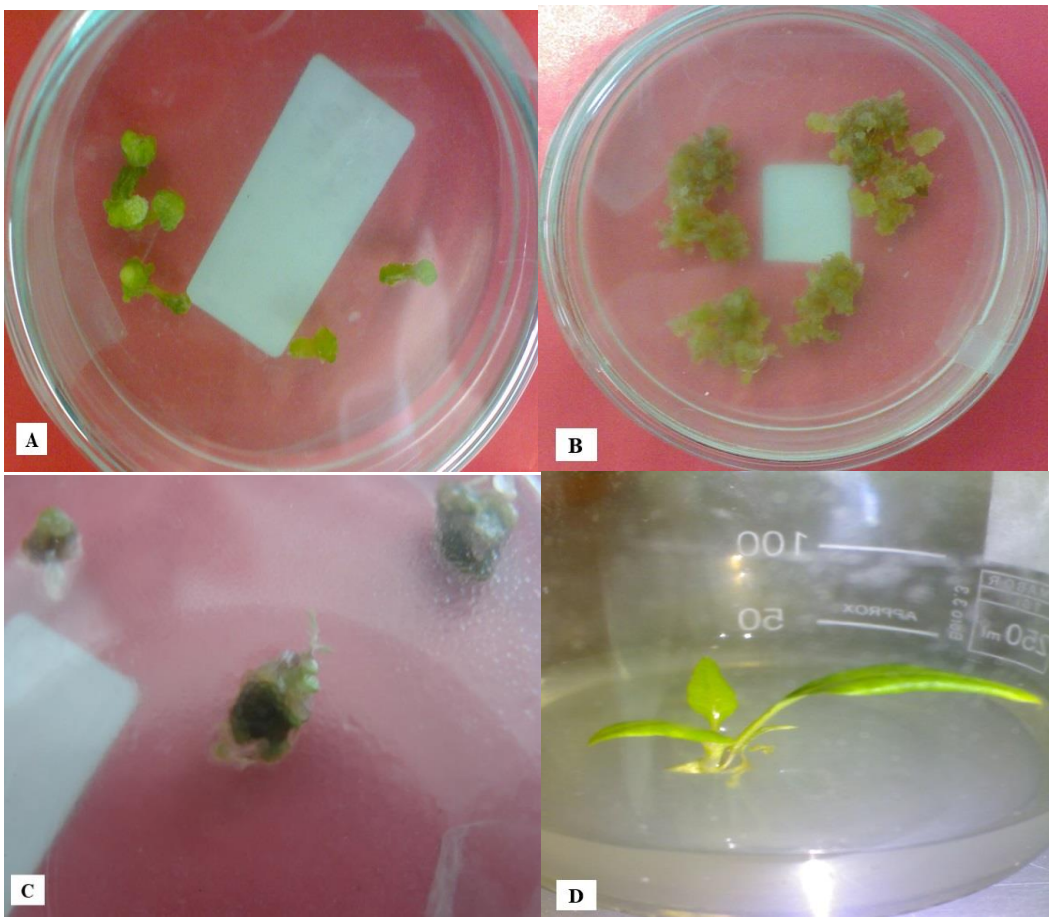
میانگین‌های دارای حروف مشترک تفاوت آماری معنی‌داری باهم ندارند.

بررسی اثر هورمون Kin بر باززایی

کالوس‌های بدست‌آمده از برترین ترکیبات هورمونی دارای یکنواختی، رنگ ظاهری و تراکم مطلوب برای باززایی انتخاب شدند (شکل ۲). برای باززایی از کالوس‌ها از محیط پایه MS با سطوح متفاوتی از هورمون Kin بر ریزنمونه ساقه استفاده شد. تجزیه واریانس اثر غلظت هورمون Kin بر باززایی گیاه شابیزک در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بود. به‌طوری‌که با افزایش غلظت هورمون Kin از محیط MS بدون Kin تا غلظت ۸ میلی‌گرم در لیتر افزایش معنی‌دار بود و بیشترین میزان باززایی در غلظت ۸ میلی‌گرم در لیتر با میانگین درصد باززایی ۳۶/۶۶ دیده شد (شکل ۱).



شکل ۱- مقایسه درصد باززایی گیاه شابیزک در غلظت‌های مختلف (۰، ۳، ۵ و ۸ میلی‌گرم در لیتر) هورمون Kin



شکل ۲- مراحل کشت بافت گیاه شابیزک: A) کالوس‌دهی اولیه ریزنمونه‌های ساقه، B) کالوس‌دهی کامل ریزنمونه‌های ساقه، C) القا و باززایی کالوس‌های ساقه، D) باززایی کامل از کالوس‌های ساقه

بحث

یکی از مراحل اساسی در استفاده موفق از روش‌های مدرن در اصلاح ژنتیکی محصولات، تولید کالوس‌های با کیفیت (کالوس‌های سبز رنگ با ساختار کروی و سفت) و

باززایی مناسب گیاهان می‌باشد (Hoseinpanah *et al.*, 2016). نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که بهترین محیط کشت در القا تولید کالوس برای ریزنمونه ساقه و برگ محیط کشت MS+2mg/l Kin +1mg/l 2,4,D و MS+1mg/l Kin +1mg/l 2,4,D برای ریزنمونه ساقه بود (جدول ۱). این تحقیق روش ساده‌ای را برای القاء کالوس توسط هورمونهای گیاهی قابل دسترس ارائه می‌دهد. با وجود اینکه در محیط کشت عاری از هورمون کالوس تولید شد اما مقدار آنها با کالوس‌های تولید شده در محیط کشت‌های دارای هورمون‌های گیاهی متفاوت بودند (جدول ۱). میزان تولید کالوس بستگی به ترکیب هورمون‌های به‌کاررفته در محیط کشت دارد و تعادل بین هورمون‌های اکسین و سیتوکنین یک فاکتور مورفولوژیکی تعیین‌کننده و مهم به‌شمار می‌رود (Abbasi et al., 2007). البته بین اثرات متقابل هورمون‌های Kin و 2,4,D در کالوس‌زایی اثر متقابل افزایشی وجود داشت، به‌طوری‌که در بالاترین غلظت هورمون 2,4,D (۱ میلی‌گرم در لیتر) و با افزایش غلظت Kin (۱ و ۲ میلی‌گرم در لیتر) بیشترین درصد کالوس‌زایی در ریزنمونه‌های ساقه و برگ شابیزک مشاهده شد. نقش اکسین‌ها، سیتوکینین‌ها و اثرات متقابل بین آنها در فرایندهای مورفوژنز در طی تمایز اندام‌ها به خوبی اثبات شده است (Hosseini-Nasr & Rashid, 2002). به‌علاوه گزارش شده است که غلظت‌های خیلی زیاد هورمون 2,4-D ممکن است برای بیان ژن‌های درگیر در تقسیم سلولی و تمایززدایی بافته مهارکننده باشد (Mahmood *et al.*, 2012) که با نتیجه بدست‌آمده از این تحقیق مطابقت دارد و با افزایش نسبت 2,4,D به Kin میزان کالوس‌زایی کاهش یافت. هورمون Kin نقش اصلی را در کالوس‌زایی داشت و 2,4,D در عدم حضور Kin یک بازدارنده بود که این موضوع با نتایج سایر محققان نیز مطابقت دارد (Neves *et al.*, 2001; Tamas & Savatti, 2006). Roy و همکاران (۲۰۰۸) بیان کردند که معمولا محیط کشت حاوی 2,4,D به تنهایی برای تولید کالوس مؤثر نیست و بهترین کالوس‌زایی در محیط کشت با ترکیب 2,4,D و Kin (۱mg/L:۱ mg/L–۵) مشاهده شده است و تشکیل کالوس ترد و تازه در دوره زمانی کوتاه ۲۰ تا ۲۵ روز انجام می‌شود.

نتایج بررسی میانگین کالوس‌زایی در ریزنمونه‌های مختلف گیاه شابیزک نشان داد که ریزنمونه‌های ساقه بیشترین میزان کالوس‌زایی را نسبت به ریزنمونه برگ دارد. موفقیت در کشت بافت این گیاه، با انتخاب ریزنمونه مناسب وابسته است. البته پیچیدگی مورفولوژیکی یک ریزنمونه به همراه انتخاب تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی مناسب تأثیر چشمگیری بر القا کالوس و باززایی نوساقه‌ها دارد (Khawar *et al.*, 2005).

در این تحقیق از کالوس‌های حاصل از ریزنمونه ساقه برای باززایی استفاده شد. نتایج نشان داد که گیاه شابیزک قابلیت باززایی غیرمستقیم و تولید کالوس قابل توجهی را در محیط کشت بافت دارد که با نتایج Rani و Prassad (۲۰۱۳) مطابقت داشت. اگرچه باززایی از طریق کالوس در تولید 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 (Debnath *et al.*, 2006). ولی با اینحال بافت کالوس گیاهی در انتقال ژن به گیاه، در تهیه کشت‌های سوسپانسیون سلولی به‌منظور تولید متابولیت‌های ثانویه و ... کاربرد دارد.

سیتوکینین‌ها به‌عنوان مهمترین فاکتور مؤثر در باززایی ساقه به اثبات رسیده‌اند و اثرهای چشمگیر آنها شاید با تغییرات بافت‌شناسی در بافت‌های القا شده مرتبط باشد (Neibaur *et al.*, 2008). در این تحقیق از Kin به‌عنوان سیتوکنین در محیط کشت باززایی کالوس‌های شابیزک استفاده شد که با افزایش غلظت Kin تا ۸ میلی‌گرم در لیتر درصد باززایی افزایش معنی‌داری داشت (شکل ۱). در گیاه *Taxus wallichiana* گزارش شده است که با افزایش سیتوکنین و کاهش اکسین، باززایی افزایش می‌یابد (Datta & Jha, 2004). همچنین نوع و غلظت سیتوکنین به‌کاررفته به‌طور چشمگیری باززایی ساقه را تحت تأثیر قرار می‌دهد (Magyar-Tabori *et al.*, 2010).

نتیجه‌گیری

با توجه به ارزش بالای گیاه شابیزک در زمینه پزشکی و داروسازی می‌توان از کشت بافت برای تولید بیشتر این گیاه بهره برد. به‌طورکلی مقایسه نتایج این مطالعه با تحقیقات دیگر نشان می‌دهد که درصد کالوس‌دهی به نوع ریزنمونه و محیط کشت بستگی دارد. محیط کشت MS+2mg/l Kin +1mg/l 2,4,D و MS+1mg/l Kin +1mg/l 2,4,D بهترین محیط‌ها برای القای کالوس بودند. ریزنمونه ساقه نیز برای تولید کالوس بهترین ریزنمونه شناخته شد. افزایش غلظت هورمون Kin در محیط MS با افزایش درصد باززایی ارتباط مستقیم داشت و در غلظت ۸ میلی‌گرم در لیتر بیشترین باززایی از کالوس‌ها بدست آمد که می‌تواند برای تکثیر و تراریخت‌سازی این گیاه دارویی مهم مورد استفاده قرار گرفته و امکان تکثیر سریع کلون‌های انتخابی و افزایش تولید ترکیبات دارویی را با روش‌های مهندسی ژنتیک فراهم نماید.

منابع مورد استفاده

– Abbasi, B., Saxena, P.K., Murch, S.J. and Liu, C.Z., 2007. Echinacea biotechnology: Challenges and opportunities. In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant, 43: 481-492.

– Ajmal Khan, M., Gul, B. and Weber, D.J, 2002. Seed germination in the Great Basin halophyte *Salsola iberica*. Canadian Journal of Botany, 80: 650–655.

– Babaei, N., Abdullah N. A., Saleh, G. and Abdullah, T. L. 2014. An efficient *in vitro* plantlet regeneration from shoot tip cultures of *Curculigo latifolia*, a medicinal plant. Scientific World Journal, 26: 275028.

– Borgato, L., Pisani, F. and Furini, A, 2007. Plant regeneration from leaf protoplasts of *Solanum virginianum* L. (Solanaceae). Plant Cell, Tissue and Organ Culture 88:247–252.

– Chaturvedi, H. C., Sharma, M., Sharma, A.K., Jain, M., Agha, B.Q. and Gupta, P., 2004. In vitro germplasm preservation through regenerative excised root culture for conservation of phytodiversity. Indian journal on Biotechnology, 3(2): 305-311.

– Datta, M.M. and Jha, S., 2004. Embryo culture of *Taxus wallichiana* (Zucc.). Journal of Plant Biotechnology, 6(4): 213-219.

– Debnath, M., Malik, C.P. and Bisen, P.S., 2006. Micropropagation: a tool for the production of high quality plant–based medicines. Current Pharmaceutical Biotechnology, 7: 33-49.

– Ganapathi, T. R., Suprasanna, P., Rao, P.S. and Bapat, V. A. 2004. Tobacco (*Nicotiana tabacum* L.)-A model system for tissue culture interventions and genetic engineering. Indian Journal of Biotechnology 3: 171-184.

– Gisbert, C., Prohens, J. and Nuez, F. 2006. Efficient regeneration in two potential new crops for subtropical climates, the scarlet (*Solanum aethiopicum*) and gboma (*S. macrocarpon*) eggplants. New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science, 34:55-62.

– Hosseini-Nasr, M. and Rashid, A., 2002. Thidiazuron induced shoot-bud formation on root segments of *Albizzia julibrissin* is an apex-controlled, light independent and calcium-mediated response. Plant Growth Regulation, 36: 81–85.

– Hoseinpanah, S., Majidi, M. and Mirzaghaderi, Gh., 2016. Effects of growth regulators on *in vitro* callogenesis and regeneration of black cumin (*Nigella sativa*). Iranian Journal of Rangelands and Forests Plant Breeding and Genetic Research, 24(2): 233-242. (In Persian).

– Hussein, E.A. and Aqlan, E.M., 2011. Regeneration of *Solanum villosum* Mill. via Direct Organogenesis *in vitro* : A Novel Study. International Journal of Botany, 7: 177-182.

– Karamian, R., 2007. Somatic embryogenesis and plant regeneration from protoplast culture of *Crocus pallasii* subsp. *haussknechtii*. Pakistan Journal of Biological Sciences, 10(4):659-663.

– Kayser, O. and Quax, W.J., 2007. Medicinal Plant Biotechnology, Wiley-Vch Verlag GmbH & Co.

– Khawar, K.M., Sarýhan, E., Sevimay, C. and Cocu, S., 2005. Adventitious shoot regeneration and micro propagation of *Plantago lanceolata* L. Periodicum Biologorum, 107: 113-116.

– Kokate, C.K., 2006. Practical Pharmacognosy, 4th ed. Delhi, India: Vallabh Prakashan, p. 26, 115-21.

– Magyar-Tabori, K., Dobranszki, J., Teixeira, D.A., Silva, J.A., 2010. The role of cytokinins in shoot organogenesis in apple. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 101: 251-267.

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

– Mohammed, A., Chiruvella, K.K., Namsa, N.D. and

– Rani, A. and Prassad, M. P., 2013. Studies on the Organogenesis of *Atropa Belladonna* in *In-vitro* Conditions. International Journal of Biotechnology and Bioengineering Research, 4(5):457-464.
– Rothe, G. and Drager, B., 2002. Tropane alkaloids-metabolic response to carbohydrate signal in root cultures of Atropa belladonna. Plant Science, 163:979-985.
– Roy, A., Ghosh, S., Chaudhuri, M. and Saha, P.K., 2008. Effect of different plant hormones on callus induction in *Gymnema sylvestris* R.BR. (Asclepiadaceae). African Journal of Biotechnology, 7(13): 2209-2211.
– Sommer, T., Buettner, M., Bruns, F., Breves, G., Hadamitzky, C. and Pabst, R., 2012. Improved regeneration of autologous transplanted lymph node fragments by VEGF-C treatment. The Anatomical Record (Hoboken), 295(5):786-791.
– Tamas, E. and Savatti, M., 2006. *In vitro* micro propagation of sainfoin (*Onobrychis viclifolia* Scop.) Agricultura, 1 (2): 57- 58.
– Xu, K., Chang, Y.X., Liu, K., Wang, F.G., Liu, Z.Y., Zhang, T., Li, T. and Yi, Z., 2014. Regeneration of *Solanum nigrum* by somatic embryogenesis, involving frog egg-like body, a novel structure. Plos One 9: e98672.
– Yun, Dae-Jin., and Hashimoto, Takashi., 1992. Metabolic engineering of medicinal plants: Transgenic *Atropa belladonna* with an improved alkaloid composition. Applied Biological Sciences, 89; 11799-11803.
– Zargari, A., 1996. Medical Plant. University of Tehran Press. 1345-1352 (in Persian).
Ghanta, R.G., 2015. An efficient *in vitro* shoot regeneration from leaf petiolar explants and *ex vitro* rooting of *Bixa Orellana* L. A dye yielding plant. Physiological and Molecular Plant Pathology, 21:417-424.
– Mulwa, R.M. and Bhalla, P.L., 2006. *In vitro* plant regeneration from immature cotyledon explants of macadamia (*Macadamia tetraphylla* L. *Johnson*). Plant Cell Reports, 25:1281-1286.
– Neibaur, I., Gallo, M. and 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.
– Neves, L.O., Tomaz, L. and Fevereiro, M.P.S., 2001. Micropropagation of *Medicago truncatula* Gaertn. Cv. Jemalong and *Medicago truncatula* ssp. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 67(1): 81-84.
– Nodertzehi Nahook, A., 2014. Tissue and culture of the medicinal plant Sleepy cheese (*Withania somnifera*), MS.C thesis, Department of Basic Sciences, Payam Noor University, Tehran, 80. (In Persian).
– O'Connor-Sánchez, A., Domínguez-May, Á.V., Keb-Llanes, M.A., González-Estrada, T.A. and Peña Ramírez, Y.J., 2010. Efficient plant regeneration from leaf explants of *Solanum americanum*. African Journal of Biotechnology, 9:5830-5835.
– Omidbaigi, R., 2006. Production and processing of medicinal plants. Astan ghods Razavi Press. 438 pages (in Persian).

Effect of Growth Regulators on *In Vitro* Callogenesis and Regeneration of *Atropa Belladonna*

B. Zarei[1], Z. Taghipour[2*], D. Kahrizi[3]

1. Ph.D. Agronomy and Plant Breeding Department, College of Agriculture, Ilam University. Ilam. I.R. Iran.
2*-Corresponding Author, Ph.D. student, Agronomy and Plant Breeding Department, College of Agriculture, Ilam University. Ilam. I.R. Iran Email: Zahrataghipour928@gmail.com
3. Associ. Prof., College of Agriculture, Razi University, Kermanshah, I.R. Iran.

Received: 19.04.2018 Accepted: 08.12.2019

Abstract

Belladonna *(Atropa belladonna*), from Solanaceae, is an annual plant and has an important tropane alkaloids called hyoscyamine. Considering the pharmacological and economic importance of *A. belladonna* and priority in its domestication and cultivation, advances in its tissue culture and regeneration methods of this plant under *in vitro* conditions is important to facilitate methods of gene transfer to this medicinal herb. So, in this research, optimization of cultivation conditions for callogenesis and regeneration of *Atropa belladonna* was investigated. For callogenesis, belladonna sterilized seeds were initially sown in MS medium. After seed germination and seedlings growth for two months, stem and leaf explants were cultured in MS medium including a combination of different hormonal concentrations of 2.4-D (0, 0.5 and 1 mg/l) and Kin (0, 1 and 2 mg/l).To evaluate the regeneration percentage of callus from shoot explants, Kin hormone was used in four levels (0, 3, 5 and 8 mg/l) using completely randomized design with three replications. These experiments indicated that, shoot explants had the highest callogenesis in terms of explant type. In terms of hormonal concentrations, combination of two hormones at concentrations of 2.4-D 1 mg/l + Kin 2 mg/l+MS and also, 2.4-D 1mg/l +Kin 1mg/l +MS showed the highest rate of callogenesis. Increase in the concentration of Kin hormone in MS medium was directly correlated with increase in regeneration percentage and the highest regeneration rate of 36.66% was observed at 8 mg/l.

Key words: Regeneration, Callogenesis, 2,4,D, Kin, *Atropa belladonna*,