مقاله پژوهشی

نشریه علمی تحقیقات ژنتیک و اصلاح گیاهان مرتعی و جنگلی ایران شناسه دیجیتال (DOI): 110.22092/ijrfpbgr.2021.342772.1367

جلد ۲۸، شماره ۲، صفحه ۳۲۴-۳۱۲ (۱۳۹۹) شناسه دیجیتال (DOR): 98.1000/1735-0891.1399.28.312.56.2.1575.32

اثر تحریکی تیدیازورون (TDZ) و پوترسین (PUT) و نوع ریزنمونه بر اندام‌زایی غیرمستقیم گیاه همیشه‌بهار (*Calendula officinalis* L.)

صادق طاهری[۱]، محمدحسین دانشور[۲] و محمدرضا صالحی سلمی[۳*]

۱- دانش‌آموخته کارشناسی ارشد، گروه علوم باغبانی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان، ملاثانی، خوزستان

۲- استاد، گروه علوم باغبانی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان، ملاثانی، خوزستان

۳*- نویسنده مسئول مکاتبات، دانشیار، گروه علوم باغبانی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان، ملاثانی، خوزستان

پست‌الکترونیک: mrsalehisalmi@gmail.com

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۳/۱۲ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۱۰/۱۳

چکیده

گیاه همیشه‌بهار (*Calendula officinalis* L.) یکی از مهمترین گیاهان زینتی- دارویی در ایران است که در ترکیب با سایر مواد اولیه دارویی برای تولید داروهای کم خطر برای انسان مورد استفاده قرار می‌گیرد. این پژوهش به‌منظور تولید انبوه این گیاه به وسیله کشت بافت، چهار آزمایش جداگانه فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار (هر تکرار ده مشاهده) در چهار مرحله کالوس‌زایی، اندام‌زایی غیرمستقیم، ریشه‌زایی و سازگاری انجام شد. نتایج نشان داد که بیشترین میزان کالوس‌زایی در تیمار ریزنمونه برگی و در محیط کشت حاوی ۲ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D مشاهده شد. بلندترین و بیشترین شاخه‌زایی در تیمار کالوس به‌دست آمده از ریزنمونه برگی در محیط کشت حاوی ۱ میلی‌گرم در لیتر تیدیازورون (TDZ) و به همراه ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر پوترسین (PUT) در اندام‌زایی غیرمستقیم مشاهده گردید. قلمه‌های کشت بافتی در محیط کشت ۲ میلی‌گرم در لیتر NAA بهترین ریشه‌زایی را داشتند. گیاهچه‌های به‌دست آمده در گلدان‌های حاوی پرلیت سازگاری بهتری نشان دادند. با بهینه‌سازی تولید کالوس از ریزنمونه‌های همیشه بهار و تکثیر با تکنیک کشت بافت می‌تواند گامی مهم برای تولید گیاهانی با کیفیت یکسان و عاری از عوامل بیماری‌زا باشد.

واژه‌های کلیدی: باززایی شاخساره، تنظیم‌کننده رشد گیاهی، کشت بافت

مقدمه

همیشه‌بهار با نام علمی *Calendula officinalis* L. متعلق به تیره کلاهپرک‌سانان (Asteraceae) است و یکی از مناطق پراکنش آن ایران می‌باشد. با توجه به اثرهای زیان‌آور داروهای شیمیایی، رویکرد مثبتی به سمت جایگزین کردن داروهای با منشأ طبیعی، به‌جای داروهای شیمیایی ایجاد شده است، به همین دلیل این گیاه از اهمیت بسیار بالایی برخوردار می‌باشد (Adela *et al*., 2003). البته تاکنون خواص ضد اکسایشی، ضد التهابی، ضد توموری و ضد میکروبی عصاره گل گیاه همیشه‌بهار گزارش شده است. بر اساس یافته‌های محققان وجود متابولیت‌های ثانویه مانند استرول‌ها، کارتنوئیدها، پلی‌فنولها، تانن‌ها و ساپونین‌ها در بروز خصوصیات مذکور نقش کلیدی دارند (Jimenez-Medina *et al*., 2006). این گیاه علاوه بر خواص دارویی، در لوازم آرایشی و همچنین به دلیل داشتن رنگ‌دانه‌های کارتنوئیدی، به‌طور گسترده‌ای در عطرسازی و طعم‌دهنده مواد غذایی نیز مورد استفاده قرار می‌گیرد (Jegadeeswari *et al*., 2007; Gazim *et al*., 2008). در طبیعت روش تکثیر آن از طریق بذر می‌باشد (Arora *et al*., 2013)، باوجوداین بهره‌برداری نادرست و بی‌رویه، باعث به خطر افتادن منابع ژنتیکی این گیاه شده است. بنابراین روش کشت بافت به‌عنوان یک روش کارآمد و مفید برای تولید انبوه همیشه‌بهار، می‌تواند راه‌حل کارآمدی در حفظ منابع ژنتیکی این گیاه ارزشمند به‌شمار آید (Victoria *et al*., 2012).

اندام‌زایی غیرمستقیم به‌عنوان یک منبع جایگزین تنوع ژنتیکی برای بهبود سوماکلون‌ها با صفات رشدی و صنعتی جدید، از اهمیت خاصی برخوردار است (Bhatia *et al*., 2009). اندام‌زایی غیرمستقیم در همیشه‌بهار به‌ندرت گزارش شده است. نتایج تحقیق روی اندام‌زایی غیرمستقیم *Calendula arvensis* نشان داد که کالوس به‌دست‌آمده از ریزنمونه گره در محیط کشت با ۳ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D، بیشترین شاخه‌زایی را در تیمار ۲ میلی‌گرم در لیتر بنزیل آدنین پورین (BAP) داشت (Leal *et al*., 2012). آزمایش Victoria و همکاران (۲۰۱۲) با استفاده از غلظت‌های مختلف تیدیازورون (TDZ) و BAP در پرآوری مستقیم شاخساره همیشه‌بهار نشان داد که بهترین تیمار مربوط به ریزنمونه‌های گره انتهایی در محیط کشت ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر TDZ بود. همچنین در تیمارهای محیط کشت محتوای TDZ طول شاخساره بیشتر از BAP افزایش یافت. تحقیق روی گل ژربرا (*Gerbera jamesonii* H.) نشان‌دهنده بیشترین تعداد شاخسار در تیمار محیط کشت MS همراه با ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر TDZ به همراه ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BAPبوده است (Misra *et al*., 2010). Jafari و همکاران (2017) به تأثیر پوترسین (PUT) و TDZ بر اندام‌زایی درون شیشه‌ای گیاه مریم‌گلی پرداختند. در مطالعه آنان نشان داده شد که بهترین کالوس‌زایی از ریزنمونه‌های میان‌گره در محیط کشت MS حاوی ۱ میلی‌گرم در لیتر NAA و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP به‌دست آمد. همچنین نتایج نشان داد که بهترین شاخه‌زایی در کالوس‌های به‌دست‌آمده از ریزنمونه ریزنمونه‌های میان‌گره در محیط کشت MS حاوی ۵۰ میلی-گرم در لیتر PUT و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر TDZ بود. بررسی اثر نوع ریزنمونه، محیط کشت و تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی بر کالوس‌زایی و باززایی غیرمستقیم نخودشیرین (*Lathyrus odoratus* L.) نشان داد که ریزنمونه میان‌گره نسبت به ریشه، کالوس بیشتری تولید و محیط کشت MS نسبت به محیط کشت B_5 تأثیر بیشتری در کالوس‌زایی دارد و بیشترین باززایی شاخه از کالوس‌های کشت‌شده در محیط کشت MS همراه با ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر TDZ به‌دست آمد (Bazrafkan *et al*., 2019).

گیاه همیشه‌بهار منبع ارزشمندی است که امروزه به فراوانی به تنهایی یا در ترکیب با سایر مواد اولیه دارویی برای تولید داروهای کم خطر برای انسان در بسیاری از کشورها به‌ویژه کشورهای پیشرفته مورد استفاده قرار می گیرد. این پروژه با هدف دستیابی به شیوه‌ای نوین برای تکثیر همیشه‌بهار با استفاده از تکنیک‌های کشت بافت اجرا شد. به‌طوری‌که ضمن تولید انبوه آن با هزینه‌های پایین، از خطر انقراض آن نیز جلوگیری گردد.

مواد و روش‌ها

تهیه مواد گیاهی: بذر گیاه همیشه‌بهار از منطقه لالی استان خوزستان، در سال ۱۳۹۲ جمع‌آوری شد. به‌منظور از بین رفتن اثرهای شرایط محیطی، بذرهای جمع‌آوری‌شده در سال بعد در مزرعه پژوهشی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان کاشته شد و در مرحله رسیدن بذر آنها برداشت گردید. در هنگام جمع‌آوری بذرها، بذرهای شکسته و با ظاهر نامطلوب حذف گردید و بذرهای سالم تا زمان انجام آزمایش در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. برای گندزدایی و از بین بردن آلودگی‌های سطحی، بذرها به مدت ۳۰ دقیقه زیر آب جاری قرار داده شد. در مرحله بعد در اتاق انتقال و زیر دستگاه لامینار ایرفلو به مدت ۵ ثانیه در الکل اتیلیک ۷۰٪ و بعد ۵ دقیقه در هیپوکلریت سدیم ۱۰٪ قرار داده شدند. برای از بین بردن اثر هیپوکلریت سدیم، بذرها ۳ مرتبه و هر بار به مدت ۵-۳ دقیقه در آب‌مقطر استریل شست‌وشو و آماده کشت گردیدند. بذرهای گندزدایی‌شده به شیشه‌های کشت (با طول ۲۰ سانتی‌متر) حاوی ۵ میلی‌متر محیط کشت موراشیگ و اسکوگ (Murashige and Skoog, 1962) با غلظت یک-دهم و در شرایط تاریکی منتقل شدند تا گیاهچه‌های استریل تولید شود. در تمامی آزمایش‌ها، محیط کشت MS به‌عنوان محیط کشت پایه استفاده شد. این محیط کشت با ۳۰ گرم ساکارز و آگار ۰/۸ ٪ با pH=۵/۸ تهیه گردید. برای تنظیم pH از هیدروکسید پتاسیم و اسیدکلریدریک ۰/۱ نرمال استفاده شد. کلیه شیشه‌های حاوی محیط کشت با استفاده از اتوکلاو در دمای ۱۲۱/۵ درجه سانتی‌گراد و فشار ۱/۵ اتمسفر به‌مدت ۱۵ دقیقه استریل شدند.

کالوس‌زایی: این آزمایش با دو فاکتور، فاکتور A نوع تنظیم‌کننده رشد در ۱۰ سطح (تیمار) و فاکتور B، نوع ریزنمونه در دو سطح (لپه یا برگ) انجام شد. تنظیم‌کننده‌های مورد استفاده شامل 2,4-D با غلظت‌های ۰/۵، ۱ و ۲ میلی-گرم در لیتر؛ NAA با غلظت‌های ۰/۵، ۱ و ۲ میلی‌گرم در لیتر؛ NAA با غلظت‌های ۰/۵، ۱ و ۲ میلی‌گرم در لیتر به همراه ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر BAP و شاهد (بدون تنظیم‌کننده) رشد بود. برای کالوس‌زایی، ریزنمونه‌ها در شرایط تاریکی (با استفاده از پلاستیک‌های غیرقابل نفوذ به نور) و دمای ۲±۲۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. پس از ۴ هفته کالوس‌های تولیدشده در شرایط کاملاً استریل وزن شدند.

اندام‌زایی غیرمستقیم: آزمایش اندام‌زایی غیرمستقیم به‌صورت فاکتوریل با ۲ فاکتور، فاکتور A نوع کالوس در دو سطح (لپه و برگ) و فاکتور B تیمار تنظیم‌کننده‌های رشد در ۹ سطح شامل BAP با غلظت‌های ۰/۱، ۰/۵ و ۱ میلی‌گرم در لیتر؛ TDZ با غلظت‌های ۰/۱، ۰/۵ و ۱ میلی‌گرم در لیتر؛ PUT با غلظت‌های ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر به همراه ۰/۱ میلی‌گرم TDZ بود. پس از ۴ هفته جوانه‌های رشد کرده، شمارش شد و به محیط کشت پرآوری انتقال یافت.

پرآوری: به‌منظور تولید شاخساره حاصل از پرآوری از ریزنمونه‌ها، از آزمایش فاکتوریل با دو فاکتور استفاده شد. فاکتور A در دو سطح (جوانه‌های انتهایی و جانبی) و فاکتور B در ۷ سطح محیط‌های کشت پرآوری شامل BAP با غلظت‌های ۰/۱، ۰/۵ و ۱ میلی‌گرم در لیتر و TDZ با غلظت‌های ۰/۱، ۰/۵ و ۱ میلی‌گرم در لیتر و بدون تنظیم کننده رشد (شاهد) بود. مدت زمان این مرحله ۴ هفته در نظر گرفته شد و پس از آن تعداد شاخساره بوجود آمده شمارش و طول آنها اندازه‌گیری شد.

ریشه‌زایی: برای ریشه‌زایی شاخساره‌های تولید شده، از آزمایش فاکتوریل با دو فاکتور استفاده شد. فاکتور A در دو سطح (لپه و برگ) و فاکتور B در ۷ محیط کشت ریشه‌زایی شامل NAA و IBA با غلظت‌های ۰/۵، ۱ و ۲ میلی‌گرم در لیتر و بدون تنظیم‌کننده رشد (شاهد) بود. برای ریشه‌زایی بهتر به محیط کشت زغال فعال به میزان ۱ درصد حجمی افزوده شد و پس از ۴ هفته تولید ریشه بررسی شد.

سازگاری: به‌منظور تهیه بستر کشت برای سازگاری از آزمایش فاکتوریل با دو فاکتور استفاده شد. فاکتور A در دو سطح (لپه و برگ) و فاکتور B در ۳ نوع بستر؛ شامل پرلایت خالص، مخلوط پرلایت و ورمی‌کولایت (به نسبت

مساوی) و ورمی‌کولایت خالص بود. از گلدان‌هایی با حجم ۲۵۰ میلی‌لیتر به‌منظور ایجاد بستر کشت استفاده شد. گلدان‌های محتوای بستر کشت درون پلاستیک نایلونی قرار داده و استریل گردید و بعد گیاهان در آن کشت شدند.

تجزیه‌وتحلیل داده‌ها: تمامی آزمایش‌ها به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۳ تکرار (هر تکرار ۱۰ مشاهده) انجام گردید. تجزیه‌وتحلیل آماری این آزمایش با استفاده از نرم‌افزار SAS و مقایسه میانگین داده‌ها با آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ۵ درصد انجام شد.

نتایج و بحث

براساس نتایج به‌دست آمده از جدول تجریه واریانس مشخص گردید که اثر ریزنمونه، اثر نوع محیط کشت و برهم کنش آنها بر وزن کالوس در سطح یک درصد معنی‌دار بود (جدول ۱).

همچنین اثر نوع ریزنمونه و نوع محیط کشت در سطح یک درصد بر طول و تعداد شاخساره تأثیر معنی‌دار داشت. برهم‌کنش نوع ریزنمونه و محیط کشت بر طول شاخساره در سطح پنج درصد و بر تعداد شاخساره در سطح یک درصد معنی‌دار بود (جدول ۱).

وزن تر کالوس: نتایج اثر برهم‌کنش تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی و نوع ریزنمونه بر وزن کالوس پس از ۴ هفته نشان داد که تیمار ریزنمونه برگ در محیط کشت حاوی ۲ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D با میانگین وزن ۴/۸۶ گرم برای هر ریزنمونه، بهترین تیمار در کالوس‌زایی بود که از لحاظ آماری با سایر تیمارها تفاوت معنی‌داری داشت (شکل ۱). کمترین وزن کالوس در تیمارهای ریزنمونه برگ و لپه در محیط کشت‌های حاوی ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA و بدون تنظیم‌کننده رشد گیاهی با میانگین وزنی ۰/۱۶ گرم برای هر ریزنمونه مشاهده شد (شکل ۱).

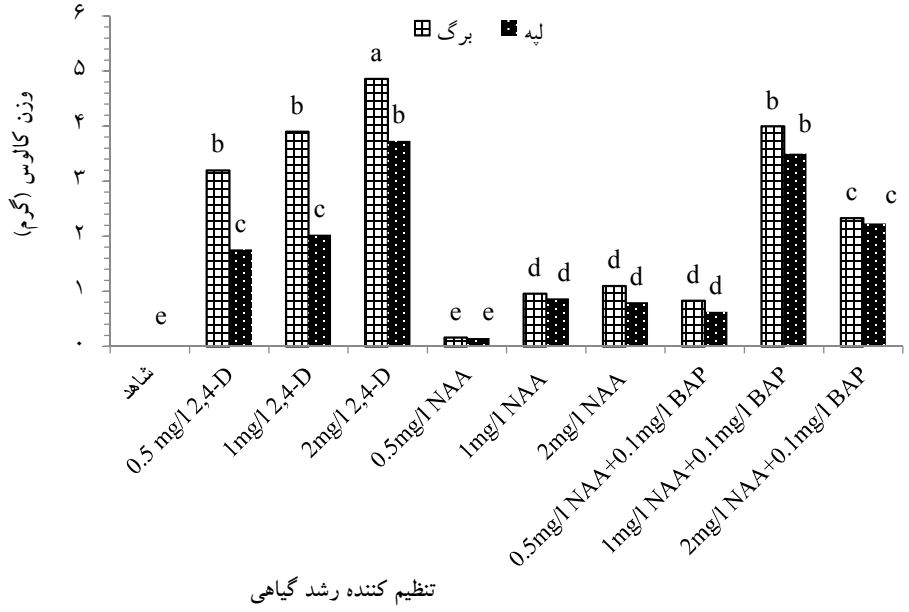
مهمترین عوامل در کیفیت و تولید کالوس، به ترکیب، مقدار غلظت، نسبت هورمونی محیط کشت و نوع ریزنمونه بستگی دارد. در این زمینه اکسین‌ها و غلظت‌های مختلف آن بیشترین نقش را دارند (George *et al*., 2007). نتایج Legha و همکاران (۲۰۱۲) روی گیاه همیشه‌بهار نشان داد که تولید کالوس از هر دو ریزنمونه برگ و گلچه به‌دست آمد، ولی بهترین تیمار مربوط به ریزنمونه گلچه در ۲ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D مشاهده شد. تولید کالوس در ریزنمونه‌های گلچه می‌تواند به علت جوان‌تر بودن بیولوژیکی آن، نسبت به ریزنمونه برگ باشد. در این تحقیق بیشترین مقدار کالوس پس از ۴ هفته از ریزنمونه‌های برگ به‌دست آمد که علت آن عدم تفاوت سن بیولوژیکی بین ریزنمونه‌های برگ و لپه می‌باشد.

جدول ۱- تجزیه واریانس اثر محیط کشت و نوع ریزنمونه بر وزن کالوس در آزمایش کالوس‌زایی، تعداد و طول شاخساره در آزمایش شاخه‌زایی

منابع تغییرات	درجه آزادی	MS کالوس‌زایی	درجه آزادی	MS شاخه‌زایی	
		وزن کالوس		تعداد شاخساره	طول شاخساره
ریزنمونه	۱	۲۵/۷۹**	۱	۷۸۵/۴۵**	۶۷/۳۵**
محیط کشت	۹	۱۰/۳۵**	۸	۴۵/۹۴**	۵/۴۸**
ریزنمونه×محیط کشت	۹	۲/۰۱**	۸	۱۰/۶۲*	۶/۹۸**
خطا	۴۰	۰/۱۴	۳۶	۵/۱۵	۲/۹۳
ضریب تغییرات (درصد)		۲۲/۹۱		۲۳/۴۲	۱۹/۵۶

**، * و ns: به‌ترتیب تفاوت معنی‌دار در سطح ۱٪ و ۵٪ و عدم وجود تفاوت معنی‌دار

نتایج نشان داد که از لحاظ محیط کشت بهترین تیمار مربوط به تیمار ۲ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D بود که با نتایج Leal و همکاران (۲۰۱۲) مطابقت دارد. گزارش مارکز نشان داد که کالوس‌زایی در گونه *Calendula arvensis* با استفاده از غلظت‌های مختلف 2,4-D پس از ۴ هفته انجام شد که دلیل آن می‌تواند تجمع اکسین‌ها در سلول‌های در حال تکثیر انتهای بریده‌شده ریزنمونه‌ها باشد (Marks and Simpson, 1994)، همچنین مشاهده شد که کالوس‌های حاصل از برگ نسبت به لپه تردتر، شفاف‌تر و بزرگ‌تر بودند و کیفیت بالاتری داشتند. در این رابطه Razdan (۲۰۰۳) گزارش کرد که نوع بافت و رنگ کالوس از عوامل مؤثر در باززایی غیرمستقیم است.



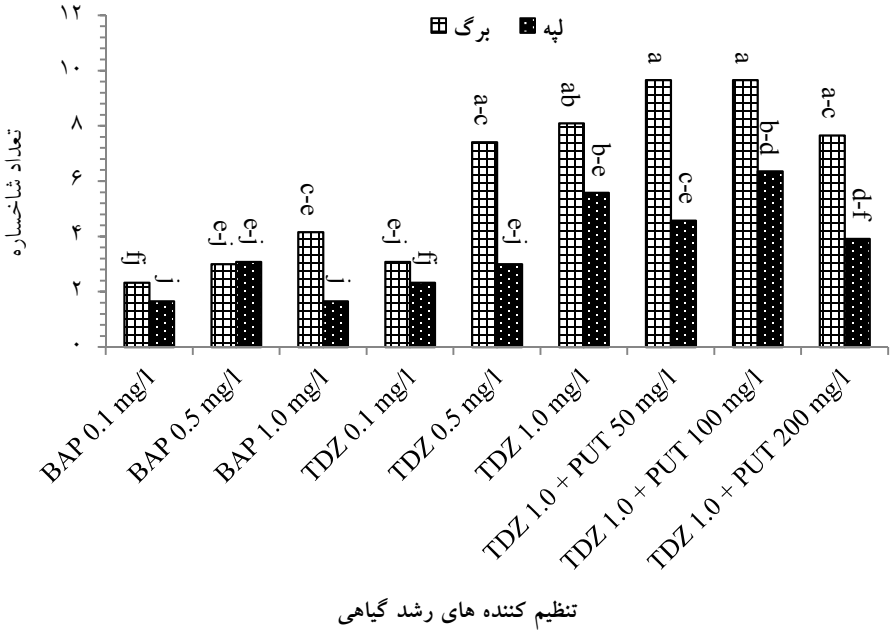
شکل ۱- برهم‌کنش نوع ریزنمونه و تنظیم‌کننده‌های رشدی مختلف بر وزن تر کالوس همیشه‌بهار در محیط کشت MS
ستون‌های با حروف مشابه در سطح ۵٪ آزمون چند دامنه‌ای دانکن تفاوت معنی‌داری با هم ندارند.

تعداد و طول شاخساره: نتایج مقایسه میانگین برهم‌کنش نوع کالوس و تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی بر تعداد شاخساره نشان داد که در اندام‌زایی غیرمستقیم از برگ، بالاترین میانگین تعداد شاخساره (۹/۶۶ عدد برای هر ریزنمونه) در تیمار محیط کشت حاوی ۱ میلی‌گرم در لیتر TDZ به همراه ۵۰ و یا ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر PUT مشاهده شد که با ریزنمونه کالوس برگ در محیط‌کشت‌های حاوی ۱ میلی‌گرم در لیتر TDZ به همراه ۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر PUT و تیمارهای ۰/۵ و ۱ میلی‌گرم در لیتر TDZ تفاوت معنی‌داری نداشت. به‌طوری‌که کمترین تعداد شاخساره با میانگین ۱/۶۶ عدد در تیمار ریزنمونه کالوس لپه در محیط‌های کشت حاوی ۰/۱ و ۱ میلی‌گرم در لیتر BAP مشاهده گردید (شکل ۲).

نتایج مقایسه میانگین اثر متقابل نوع ریزنمونه و تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی بر طول شاخساره نشان داد که بیشترین میانگین طول شاخساره (۴/۷۵ سانتی‌متر) مربوط به تیمار ریزنمونه کالوس برگ کشت شده در محیط کشت حاوی ۱ میلی‌گرم در لیتر TDZ به همراه ۵۰ میلی‌گرم در لیتر PUT بود و با تیمار ریزنمونه کالوس برگ در محیط کشت‌های حاوی ۱ میلی‌گرم در لیتر TDZ به‌تنهایی و یا همراه با ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر PUT تفاوت معنی‌داری نداشت. به‌نحوی‌که کمترین میانگین طول شاخساره (۱/۶۲

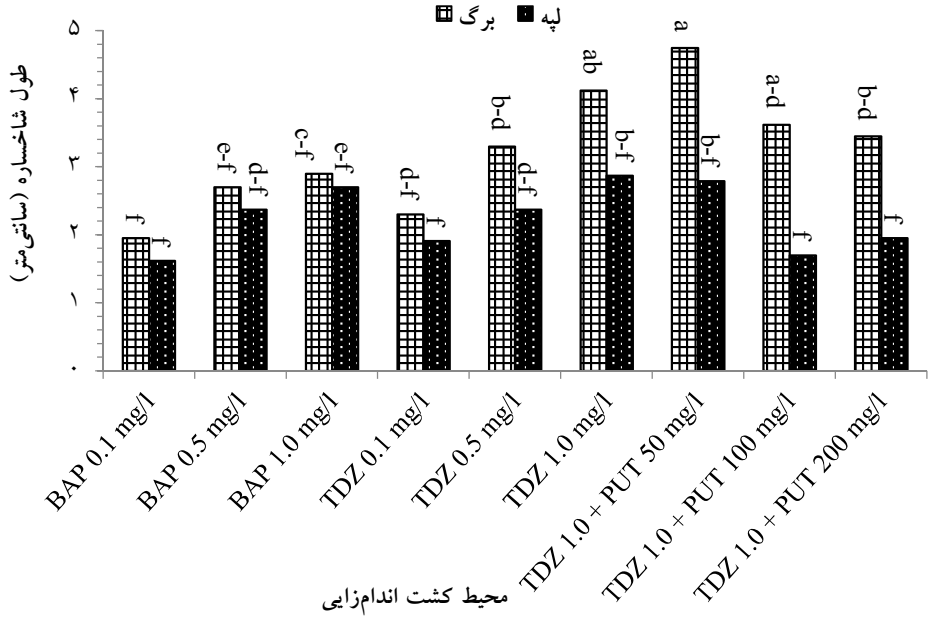
سانتی‌متر) در تیمار ریزنمونه کالوس لپه کشت‌شده در محیط کشت حاوی ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر BAP مشاهده شد که با تیمارهای ریزنمونه لپه در تمامی محیط کشت‌ها تفاوت آماری نداشت (شکل ۳).

افزایش تدریجی غلظت سیتوکینین‌ها (BAP, TDZ و تلفیق PUT و TDZ) از ۰/۱ تا ۱ میلی‌گرم در لیتر سبب افزایش تدریجی در تعداد شاخساره گردید (شکل ۲). نتایج مشابهی از سایر پژوهشگران گزارش شده است که از غلظت‌های مختلف BAP در اندام‌زایی غیرمستقیم *Calendula arvensis*، بیشترین تعداد شاخساره در تیمار ۲ میلی‌گرم در لیتر BAP بدست آمد (Leal *et al*., 2012). گزارش Misra و همکاران (۲۰۱۰) روی گل ژربرا نشان داد که تیمار حاوی TDZ در ترکیب با سیتوکینین‌های دیگر (BAP) در مقایسه با تیمار غلظت TDZ به‌تنهایی عملکرد بهتری در شاخه‌زایی داشت که با نتایج این پژوهش مطابقت دارد. بیشترین درصد باززایی با ۳۲/۵ و ۳۱/۵ درصد به ترتیب در تیمار ۰/۴ میلی‌گرم در لیتر BAP بدون استفاده از اکسین در کالوس‌های به‌دست‌آمده از ریزنمونه‌های هیپوکوتیل و کوتیلدون سرخارگل مشاهده گردید (Zebarjadi *et al*., 2013). لازم به ذکر است که سازوکار فعالیت تنظیم‌کننده رشد TDZ هنوز به‌طور دقیق شناخته نشده است، اما این فرضیه وجود دارد که این تنظیم‌کننده رشد به‌طور مستقیم با تحریک بافت موجب افزایش شاخه‌زایی در گیاهان می‌گردد. همچنین TDZ با تحریک سیتوکینین‌های درون‌زای گیاه سبب تحریک و افزایش شاخه‌زایی در گیاه می‌گردد (Huetteman, and Preece, 1993). در این پژوهش نشان داده شد، با افزایش غلظت PUT هیچ‌گونه تغییری در تعداد و طول شاخساره حاصل نشد. پلی‌آمین‌ها ترکیبات فعال زیستی هستند که در گیاهان، جانوران و میکروارگانیسم‌ها یافت می‌شوند و PUT جزء پیش‌سازهای اصلی پلی‌آمین‌ها در گیاهان می‌باشد. PUT در غلظت‌های مناسب در فرایندهای مختلف مانند تکثیر سلول، تقسیم سلولی، رشد، تمایز و ریخت‌زایی در گیاهان مختلف نقش دارد. PUT در غلظت‌های مناسب بر محتوای پروتئین گیاه و رشد و تمایز سلول اثر می‌گذارد ولی با افزایش آن تأثیری بر رشد و تمایز آن ایجاد نمی‌کند (Ali *et al*., 2009).



شکل ۲- برهم‌کنش نوع کالوس و تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی بر شاخه‌زایی غیرمستقیم همیشه‌بهار در محیط کشت MS

ستون‌های با حروف مشابه در سطح ۵٪ آزمون چند دامنه‌ای دانکن تفاوت معنی‌داری با هم ندارند.



شکل ۳- برهم‌کنش نوع کالوس و تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی بر طول شاخساره در اندام‌زایی غیرمستقیم همیشه‌بهار در محیط کشت **MS**
ستون‌های با حروف مشابه در سطح ۵٪ آزمون چند دامنه‌ای دانکن تفاوت معنی‌داری با هم ندارند.

براساس نتایج جدول تجریه واریانس مشخص گردید که اثر نوع ریزنمونه و برهم‌کنش نوع ریزنمونه و نوع محیط کشت بر تعداد شاخساره در آزمایش پرآوری معنی‌دار نبود، ولی اثر نوع محیط کشت بر این ویژگی در سطح پنج درصد معنی‌دار بود (جدول ۲).

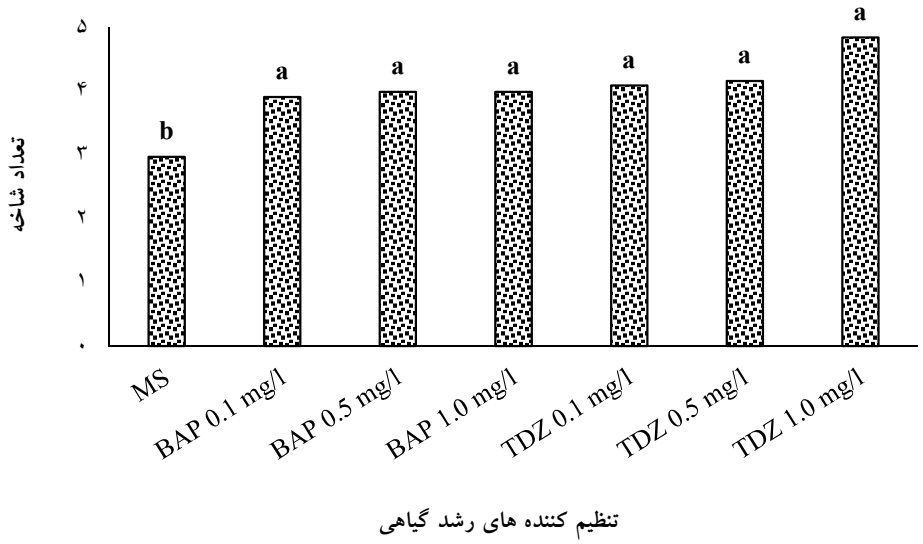
همچنین نتایج تجریه واریانس نشان داد که اثر نوع ریزنمونه، نوع محیط کشت و برهم‌کنش آنها روی ویژگی‌های تعداد و طول ریشه در سطح یک درصد معنی‌دار بود.

جدول ۲- تجزیه واریانس اثر محیط کشت و نوع ریزنمونه بر تعداد شاخساره در آزمایش پرآوری، تعداد و طول ریشه در آزمایش ریشه‌زایی

منابع تغییرات	درجه آزادی	MS پرآوری	MS شاخه‌زایی	
		تعداد شاخساره	تعداد ریشه	طول ریشه
ریزنمونه	۱	۰/۳۸ ns	۱/۸۸**	۴/۴۶**
محیط کشت	۶	۰/۴۴*	۳۶/۳۲**	۴۲۴/۵۲**
ریزنمونه×محیط کشت	۶	۰/۵۳ ns	۰/۲۶**	۰/۶۵**
خطا	۲۸	۰/۰۸	۰/۱۰	۰/۰۴
ضریب تغییرات (درصد)		۲۲/۹۷	۴/۳۶	۱/۹۸

**، * و ns: به‌ترتیب تفاوت معنی‌دار در سطح ۱٪، تفاوت معنی‌دار در سطح ۵٪ و عدم وجود تفاوت معنی‌دار

تعداد شاخساره در آزمایش پرآوری: بررسی اثر تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی بر تعداد شاخساره حاصل از پرآوری پس از ۴ هفته نشان داد که بیشترین تعداد شاخساره با (۴/۸۵ عدد شاخه برای هر ریزنمونه) مربوط به تیمار اندام‌زایی ۱ میلی‌گرم در لیتر TDZ بود، باوجوداین تفاوت معنی‌داری با سایر تیمارهای حاوی تنظیم‌کننده رشد گیاهی وجود نداشت (شکل ۴). کمترین تعداد شاخساره (۲/۹۷ عدد شاخه برای هر ریزنمونه) در محیط کشت MS پایه بدون استفاده از تنظیم‌کننده‌های رشد مشاهده گردید (شکل ۴). نتایج بررسی Victoria و همکاران (۲۰۱۲) نشان داد که بهترین تیمار به‌منظور پرآوری گل همیشه‌بهار، تیمار ریزنمونه گره انتهایی در محیط کشت ۰/۲ تا ۰/۸ میلی‌گرم در لیتر TDZ بعد از ۴۵ روز بود. نتایج نشان داد که بین محیط‌های کشت حاوی تنظیم‌کننده رشد، برای پرآوری شاخساره‌ها تفاوت معنی‌داری وجود نداشت و برای اقتصادی بودن این آزمایش از محیط کشت MS همراه با غلظت پایین سیتوکینین‌های با (۰/۱ و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر) توصیه می‌گردد.



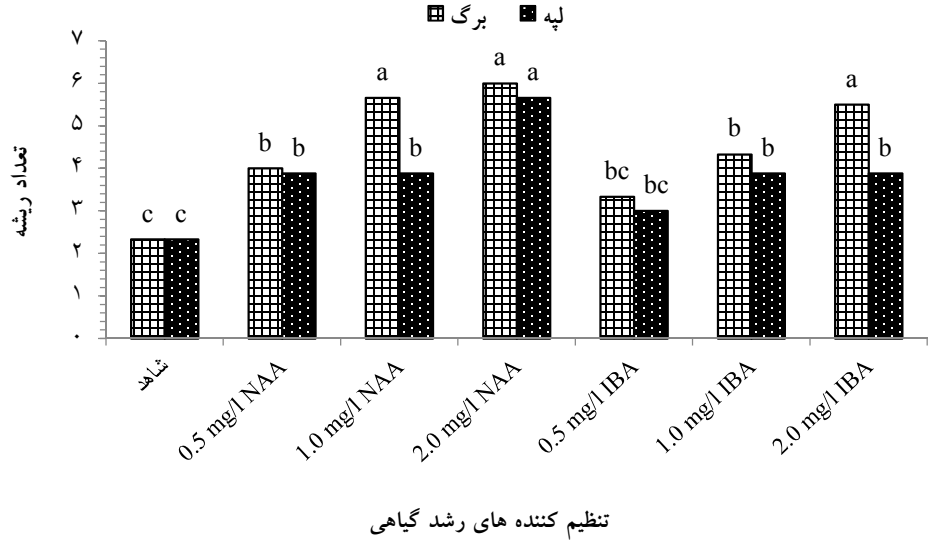
شکل ۴- اثر تنظیم‌کننده رشد گیاهی بر تعداد شاخساره در آزمایش پرآوری همیشه‌بهار در محیط کشت MS

ستون‌های با حروف مشابه در سطح ۵٪ آزمون چند دامنه‌ای دانکن تفاوت معنی‌داری با هم ندارند.

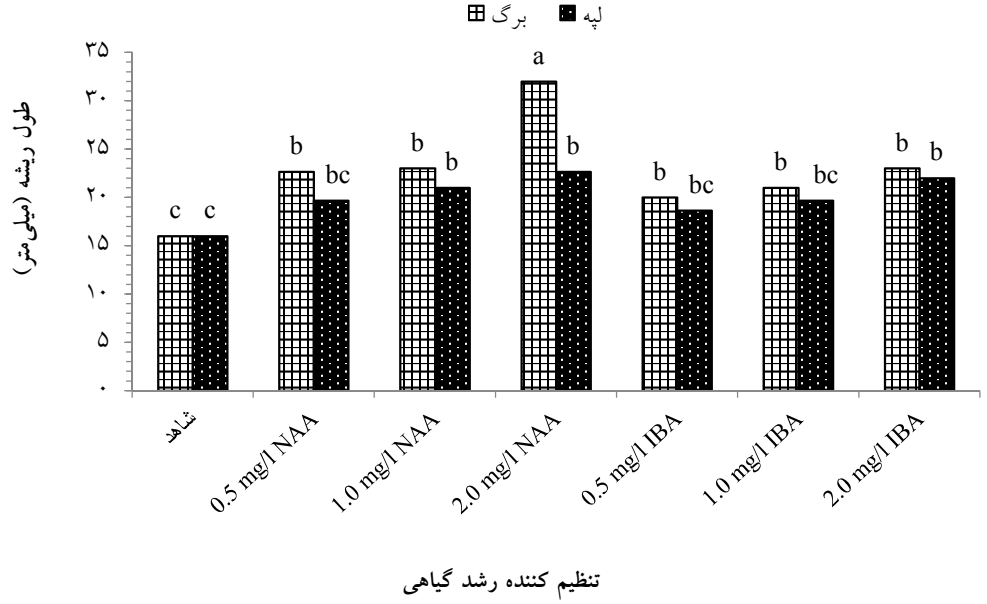
تعداد و طول ریشه: نتایج اثر برهم‌کنش نوع ریزنمونه و تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی بر ریشه‌زایی پس از ۴ هفته نشان داد که بیشترین تعداد ریشه با میانگین ۶ عدد برای هر قلمه شاخه مربوط به تیمار شاخه حاصل از ریزنمونه برگ کشت‌شده در محیطی با ۲ میلی‌گرم در لیتر NAA مشاهده گردید، باوجوداین با تیمارهای شاخساره حاصل از ریزنمونه برگ کشت‌شده در محیط کشت حاوی ۱ میلی‌گرم در لیتر NAA و یا ۲ میلی‌گرم در لیتر IBA و تیمار شاخساره حاصل از ریزنمونه لپه کشت‌شده در محیط شامل ۲ میلی‌گرم در لیتر NAA تفاوت معنی‌داری نداشت. به‌طوری‌که کمترین تعداد ریشه با میانگین ۲/۳۳ عدد مربوط به تیمارهای شاخساره حاصل از ریزنمونه برگ و لپه در محیط کشت MS بدون استفاده از تنظیم‌کننده‌های رشد بود (شکل ۵).

نتایج ریشه‌زایی نشان داد، بیشترین طول ریشه با میانگین ۳۲ میلی‌متر در تیمار شاخساره حاصل از ریزنمونه برگ کشت شده در محیط کشت ریشه‌زایی ۲ میلی‌گرم در لیتر NAA مشاهده گردید. به‌طوری‌که کمترین طول ریشه نیز با میانگین ۱۶ میلی‌متر مربوط به تیمارهای ریزنمونه جوانه جانبی و انتهایی در محیط کشت MS پایه بدون استفاده از تنظیم‌کننده‌های رشد بود (شکل ۶). ریشه و تشکیل آن عامل مهمی در جذب آب و مواد غذایی

است که در رشد بعدی گیاهک‌ها و سازگاری بیشتر آنها با شرایط گلخانه بسیار مؤثر است. Victoria و همکاران (۲۰۱۲) با استفاده از تنظیم‌کننده‌های رشد IAA، IBA و NAA به ریشه‌زایی *Calendula officinalis* پرداختند. نتایج آنان نشان داد که بیشترین درصد ریشه‌زایی پس از ۱۵ روز در تیمار ۱ میلی‌گرم در لیتر IAA مشاهده شد. همچنین نتایج آنان نشان داد، با افزایش غلظت تنظیم‌کننده‌های رشد IAA و NAA درصد ریشه‌زایی به‌طور قابل‌توجهی افزایش یافت که با این نتایج مطابقت دارد. همچنین در پژوهش Shailaja (۲۰۰۲) گزارش شد که تیمار ۲ میلی‌گرم در لیتر NAA با ۱۰۰ درصد ریشه‌زایی بهترین تیمار در گل ژربرا (*Gerbera jamesonii* H.) می‌باشد که با این نتایج مطابقت دارد.



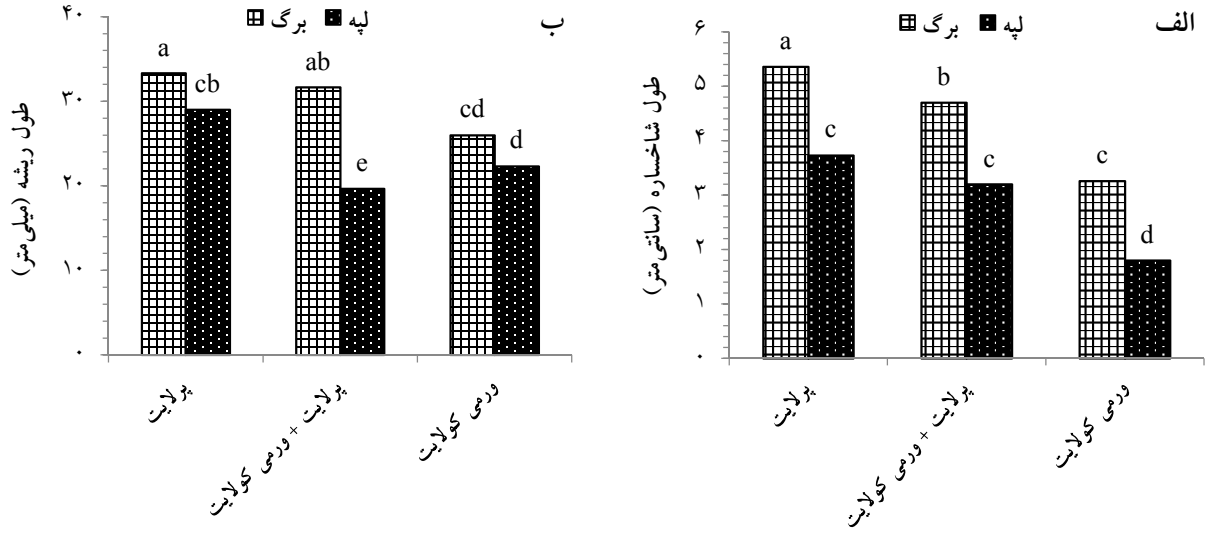
شکل ۵- برهم‌کنش نوع ریزنمونه و تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی بر تعداد ریشه همیشه‌بهار در محیط کشت MS در آزمایش ریشه‌زایی ستون‌های با حروف مشابه در سطح ۵٪ آزمون چند دامنه‌ای دانکن تفاوت معنی‌داری با هم ندارند.



شکل ۶- برهم‌کنش نوع ریزنمونه و تنظیم‌کننده رشد گیاهی بر طول ریشه همیشه‌بهار در محیط کشت MS در آزمایش ریشه‌زایی ستون‌های با حروف مشابه در سطح ۵٪ آزمون چند دامنه‌ای دانکن تفاوت معنی‌داری با هم ندارند.

سازگاری: در بخش سازگاری، نتایج اثر برهم‌کنش نوع ریزنمونه و بستر کشت بر طول شاخساره نشان داد که بیشترین طول شاخساره (۵/۳۶ سانتی‌متر) مربوط به گیاهک‌های کشت‌شده در بستر پرلایت با منشأ ریزنمونه برگی بودند و کمترین طول شاخساره نیز با میانگین ۱/۸۰ سانتی‌متر در گیاهک‌های کشت‌شده در بستر ورمی‌کولایت با منشأ ریزنمونه لپه مشاهده شد (شکل ۷- الف). همچنین نتایج این آزمایش نشان داد، بیشترین طول ریشه با میانگین ۳۳/۳۳ میلی‌متر مربوط به تیمار گیاهک حاصل از ریزنمونه برگ کشت‌شده در بستر پرلایت بود، باوجوداین با تیمار گیاهک حاصل از ریزنمونه برگ کشت‌شده در بستر کشت پرلایت + ورمی‌کولایت (۳۱/۶۶ میلی‌متر) تفاوت معنی-داری نداشت. به‌نحوی‌که کمترین طول ریشه (۱۹/۶۶ میلی‌متر) نیز در تیمار گیاهک حاصل از ریزنمونه لپه کشت‌شده در بستر کشت پرلایت + ورمی‌کولایت مشاهده شد (شکل ۷- ب).

Taha و همکاران (۲۰۱۰) با استفاده از ۳ بستر کشت ورمی‌کولایت، خاک باغچه و مخلوط کوکوپیت، خاک قرمز و ماسه (به نسبت ۳:۱:۱) به سازگاری گیاهک‌های ریشه‌دار شده ژربرا (*Gerbera jamesonii* H.) در شرایط درون شیشه‌ای پرداختند. آنان بیان کردند در تیمار مخلوط کوکوپیت، خاک قرمز و ماسه، ۹۵٪ گیاهک‌های ریشه‌دار شده زنده ماندند و مناسب‌ترین بستر کشت ژربرا معرفی گردید. همچنین Son (۲۰۰۷) درصد زنده‌مانی گیاهک‌های ریشه‌دار شده ژربرا در بستر کشت ورمی‌کولایت در ۳ رقم توبیا، آریانا و رقم بونای را به‌ترتیب ۶۰، ۶۶ و ۷۴ درصد گزارش کرد. ولی در بستر کشت ترکیبی شن و کوکوپیت به نسبت ۱:۱ نتایج خوبی حاصل نشد و تنها ۲۷٪ گیاهک‌های ریشه‌دار شده زنده ماندند. Paradiso و De Pascale (۲۰۰۸) گزارش کردند که با افزودن فیبر نارگیل به پرلایت سبب افزایش سطح برگ در گیاهک‌های ژربرا سازگار شده در شرایط گلخانه گردید. با توجه به نتایج این آزمایش و پژوهشگران دیگر، مشخص شد که برای سازگاری اولیه همیشه‌بهار باید از بستر کشتی استفاده شود که سبک بوده و تبادل هوا در آن به‌راحتی انجام می‌شود و از سویی از نظر حفظ رطوبت نیز مناسب است.



شکل ۷- برهم‌کنش ریزنمونه و بستر کشت بر طول شاخساره (نمودار راست) و طول ریشه همیشه‌بهار در آزمایش سازگاری
ستون‌های با حروف مشابه در سطح ۵٪ آزمون چند دامنه‌ای دانکن تفاوت معنی‌داری با هم ندارند.

در این تکنیک با بررسی تنظیم‌کننده‌های رشدی جدید، تیدیازورون (TDZ) و پوترسین (PUT) در باززایی همیشه‌بهار و مقایسه آن با تنظیم‌کننده‌های دیگر، بهترین ترکیب هورمونی برای باززایی غیرمستقیم مشخص شد و با بهینه‌سازی تولید کالوس از ریزنمونه‌های همیشه‌بهار، می‌توان از آن در برنامه‌هایی مانند انتقال ژن و کشت پروتوپلاست استفاده کرد. ازاین‌رو استفاده از تکنیک‌های مختلف کشت بافت در جهت تکثیر می‌تواند گامی مهم برای تولید گیاهانی با کیفیت بالا و عاری از عوامل بیماری‌زا باشد.

منابع مورد استفاده

– Adela, P., Constantin, B., Sanda, A. and Carmen, S., 2003. HPLC analysis of carotenoids in four varieties of *Calendula officinalis* L. flowers. Acta Biological, 47: 37-40.
– Ali, R. M., Abbas, H. M. and Kamal, R. K., 2009. The effect of treatment with polyamines on dry matter and some metabolites in salinity stressed chamomile and sweet majoram seedling. Plant and soil environment, 11: 477-483.
– Arora, D., Rani, A. and Sharma, A., 2013. A review on phytochemistry and ethnopharma-cological aspects of genus Calendula. Pharmacognosy Reviews, 7: 179-187.
– Bazrafkan, M., Daneshvar, M. H. and Salehi Salmi, M. R. 2019. Effects of explant type, culture media and growth regulators on callus induction and plant regeneration of sweet pea (*Lathyrus odoratus* L.). Iranian Journal of Rangelands and Forests Pant Breeding and Genetics Research, 27: 98-107. (In Persian).
– Bhatia, R., Singh, K. P., Jhang, T. and Sharma, T. R., 2009. Assessment of clonal fidelity of micropropagated gerbera plants by ISSR markers. Scientia Horticulturae , 119: 208-211.
– Gazim, Z. C., Rezende, C. M., Fraga, S. R., Svidzinski, T. I. E. and Cortez, D. A. G., 2008. Antifungal activity of the essential oil from *Calendula officinalis* L. (Asteraceae) growing in Brazil. Brazilian Journal Microbiological, 39: 61-63.
– Huetteman, A. and Preece, J., 1993. Thidiazuron a potent cytokinin for wood plant tissue culture. Plant cell, tissue and organ culture, 37:105-119.
– Jafari, S., Daneshvar, M. H., Salehi Salmi, M. R. and Lotfi, A. 2017. Influence of putrescine and thidiazuron on in vitro organogenesis in *Salvia officinalis* L. Iranian Journal of Rangelands and Forests Pant Breeding and Genetics Research, 25: 201-211. (In Persian).
– Jegadeeswari, V., Indurani, C. and Kalaiselvi, T., 2007. Calendula: The poor man´s Saffron. Science Technology. Entrepreneur. Tamil Nadu Agricultural University, Coimbatore. Pharmaceutical Bulletin, 49: 863-870.
– Leal, F., Matos, M., Coelho, A. C. and Pinto-Carnide, O., 2012. *In vitro* Multiplication of Aromatic and Medicinal plant and Fungicide activity. Journal of Agricultural and Biological Science, 6: 119- 138.
– Legha, M. R., Prasad, V., Singh, S. K., Kaur, C., Arora, A. and Kumar, S., 2012. Induction of carotenoid pigments in callus cultures of *Calendula officinalis* L. In response to nitrogen and sucrose levels. *In Vitro* Cellular & Developmental Biology-Plant, 48: 99-106.
– Marks, T. R. and Simpson, S. E., 1994. Factors affecting shoot development in apically dominant Acer cultivars *in vitro*. Journal of Horticultural Science, 69: 543-551.
– Misra, P., Purshottam, D. K., Siddiqui, S., Jain, M. B. and Toppo, D. B. A., 2010. A comparative study of *in vitro* regeneration of shoots in different cultivars of *Gerbera jamesonii* H. Bollus ex Hookf. Propagation of Ornamental Plants, 10: 156-162.
– Murashige, T. and Skoog, F., 1962. A revised medium for rapid growth and bioassay with tissue culture. Physiologia Plantarum, 15: 473-476.
– Paradiso, R. and De Pascale, S. 2008. Effects of coco fiber addition to perlite on growth and yield of cut gerbera. Acta Horticulture, 779: 529-534.
– Razdan, M. K., 2003. Introduction to plant tissue culture. Oxford of IB publish. Dehli. India, 23: 256-261.
– Shailaja, V. P., 2002. Studies on *in vitro* propagation of *Gerbera jamesonii* “Bolus”. Dharwad (India): M. Sc. Thesis of the University of Agricultural Sciences. Dharwad. India.
– Son, N. V. 2007. Response of gerbera (*Gerbera jamesonii* “Bolus”) varieties to micropropogation. Dharwad (India): M. Sc. Thesis of the University of Agricultural Sciences. Dharwad. India.
– Taha, R. M., Hasbullah. N. A., Abdul Aziz, A. H. and Awal, A., 2010. Establishment of *in vitro* plantlets and acclimatization of *Gerbera jamesonii* Bolus ex. Hook f. Acta Horticulture, 865: 401-404.
– Victoria, C. P., Lage, C. L. S. and Sato, A., 2012. Tissue culture techniques in the proliferation of shoots and roots of *Calendula officinalis*. Revista Ciencia Agronomica, 43: 539-545.
– Zebarjadi, A. R., Motamedi, M. J., Taravat, E. and Ismaili, A. 2013. Micropropagation of medicinal purple coneflower (*Echinacea purpurea* L.) using

cotyledon and hypocotyl segments. Journal of Plant Research, 26: 311-319.

- Jimenez-Medina, E., Garcia-Lora, A., Paco, L., Algarra, I., Collado, A. and Garridoet, F., 2006, A new extract of the plant *Calendula officinalis* produces a dual *in vitro* effect: Cytotoxic anti-tumor activity and lymphocyte activation. BMC Cancer, 119: 1-14.

Stimulatory effects of Thidiazuron, Putrescine, and explant type on indirect regeneration of *Calendula officinalis* L.

S. Taheri[1], M.H. Daneshvar[2] and M. Salehi Salmi[3*]

[1]-M.Sc. graduated, Department of Horticulture Science, Khuzestan Agricultural Sciences and Natural Resources University, Mola-Sani, Khuzestan, I.R.Iran.

[2]- Prof., Department of Horticulture Science, Khuzestan Agricultural Sciences and Natural Resources University, Mola-Sani, Khuzestan, I.R.Iran.

[3]*- Corresponding author, Assoc. Prof., Department of Horticulture Science, Khuzestan Agricultural Sciences and Natural Resources University, Mola-Sani, Khuzestan, II.R. Iran, Email: mrsalehisalmi@gmail.com

Received: 01.06.2020 Accepted: 02.01.2021

Abstract

Pot marigold (*Calendula officinalis* L.) is an important ornamental-medicinal plant in Iran, that is widely used alone or in combination with other medicinal to produce low-risk drugs for human. In order to mass-production of this plant by tissue culture, four separate factorial experiments were conducted using completely randomized design with three replications (10 samples) at four stages of callus induction, indirect organogenesis, rooting, and acclimatization The results showed that the highest callus weight was observed in the interaction of leaf explant and medium supplemented with 2,4-D (2.0 mg/l). The tallest and highest branching number was related to the callus obtained from leaf explant in medium containing thidiazuron (1.0 mg/l TDZ) and putrescine (100 mg/l PUT), in indirect organogenesis. Tissue culture cuttings had the best rooting in 2.0 mg/l NAA medium. The obtained seedlings planted in pots containing perlite showed better acclimatization. By optimizing callus production from *Calendula officinalis* explants and propagation by tissue culture method can be an important step towards producing plants with the same quality and free of pathogens.

Keywords: Shoot regeneration, Plant growth regulator, Tissue culture.