# بهینه‌سازی کالوس‌زایی و باززایی مستقیم گلرنگ با استفاده از قطعات ریشه، لپه و محور زیرلپه

**محمد افشارشاندیز[۱]، حسن رهنما[۲]، حسین آذرنیوند[۳*]**

**تاریخ ارسال: ۱۳۹۵/۱۰/۲۸**
**تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۱۲/۱۳**

## چکیده

*گلرنگ یکی از گیاهان روغنی و سازگاریافته به شرایط سخت ایران است. ارقام زراعی زیاد و متنوعی از این گیاه در کشور وجود دارد. ارقام گلرنگ محتوای اسید چرب امگا ۶ بالایی دارند که نشان‌دهنده وجود مسیرهای پیشرفته ساخت اسیدهای چرب غیراشباع با زنجیره نسبتا بلند در این گیاه است. به همین دلیل است که این گیاه گزینه مناسبی برای مهندسی مسیرهای مختلف سنتز اسیدهای چرب زنجیره بلند شناخته می‌شود. کشت بافت پیش نیاز انجام مهندسی ژنتیک (متابولیت) در گیاهان است. بدین منظور در این تحقیق شرایط بهینه کشت بافت رقم گلمهر گلرنگ انجام شد. برای این منظور پاسخ به ساقه‌زایی سه ریزنمونه ریشه، محور زیرلپه و لپه بر روی محیط MS غنی‌شده با غلظت‌های مختلف تیدیازورون/نفتالین استیک اسید و Zeatin/نفتالین استیک اسید بررسی شد. سپس تیمارهای پرزایی (Multiplication) و طویل‌سازی ساقه‌های بازاشده اعمال و در نهایت تیمارهای مختلف ریشه‌زایی نوساقه‌ها بررسی شد. بیشترین باززایی‌های مشاهده شده ۲۸/۸٪، ۲۵/۱۵ و ۲۴/۵۳٪ به ترتیب برای تیمارهای محور زیر لپه (تیدیازورون,0.5=نفتالین استیک اسید0=)، ریشه (تیدیازورون,0.5=نفتالین استیک اسید2=) و لپه (تیدیازورون,0.5=نفتالین استیک اسید2=) بدست آمد. همچنین تیمار هورمونی BA(0.5mg/L)+Thiamin-HCl (4mg/L) توانست باعث پرزایی در ریزنمونه-های باززا شده شود. به منظور افزایش باززایی ریزنمونه‌هایی که کالوس داده بودند، تیمار هورمونی BA(1mg/L) + نفتالین استیک اسید(1mg/L) اعمال شد که این تیمار تاثیر معنی‌داری در باززایی ریزنمونه‌های کالوس داده نداشت. در این تحقیق نیز ریشه‌دهی نوساقه‌ها با تیمارهای هورمونی مختلف با فراوانی کمتر از چهار درصد بدست آمد.*

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

## مقدمه

گلرنگ (*Carthamus tinctorius*) یکی از گیاهان دارویی با دانه‌های روغنی و یکساله است. این گیاه متعلق به خانواده کاسنی‌ها بوده و برای مناطق نیمه خشک مانند ایران به خوبی سازگار شده است (Kakaei *et al.* 2013). این گیاه در سطح

---

۱ دانشجوی دکتری بیوتکنولوژی کشاورزی و منابع طبیعی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران
۲ دانشیار پژوهشگاه بیوتکنولوژی کشاورزی ایران، سازمان تحقیقات آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران
۳ استاد گروه بیوتکنولوژی کشاورزی و منابع طبیعی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران
*(نویسنده مسئول: hazar@ut.ac.ir)

وسیعی در دنیا برای استفاده‌ی گل‌ها و بذور آن (که هر دو ارزش صنعتی دارند) کشت می‌شود. از روغن بذر این گیاه به وفور در صنایع غذایی، رنگرزی، دارویی و به عنوان روان‌کننده استفاده می‌شود. سطح لینولئیک اسید[1](با فرمول شیمیایی $C_{18}H_{32}O_2$ و 18:2 $\Delta^{9,12}$ ) در بذور گلرنگ بیشترین سطح (۷۵-۹۰٪) در میان تمام روغن‌های گیاهی است به همین دلیل است که روغن گلرنگ با دارا بودن سطوح بسیار بالای اسیدهای چرب غیراشباع و نیز مقادیر قابل توجه آلفا-توکوفرول[2](عامل کاهنده‌ی میزان کلسترول خون و تاخیر در پیری) می‌تواند ارزش تغذیه‌ای بسیار بالایی در رژیم غذایی انسان داشته باشد (Yang *et al*. 2009). گیاه گلرنگ علاوه بر کاربردهای سنتی امروزه به عنوان بستری برای تولید متابولیت‌های ثانویه و محصولات تراریخته‌ای مانند گاما لینولنیک[3]اسید، انسولین انسانی، آپولیپوپروتئین[4] هورمون‌های رشدی و ... معرفی شده است (Huang *et al*. 2015).

رائو و جورج (Rao & George, 1989) اولین محققینی بودند که بر روی کشت بافت گلرنگ کار کردند. از آن زمان تا کنون کشت بافت و روش‌های باززایی ساقه برای ارقام هندی، آمریکایی، ترکی، چینی، استرالیایی و ایرانی گزارش شده است (Fan & Guo, 2013). باززایی گلرنگ از طریق باززایی مستقیم جوانه ساقه یا باززایی جوانه ساقه با واسطه‌ی کالوس بدست آمده است.

منابع ریزنمونه‌های گزارش شده شامل لپه‌های بریده شده، محور زیر لپه، برگ، ریشه، ساقه، بساک، اندوسپرم و محور جنینی بذور جوانه‌زده با یک لپه حذف شده می‌باشد پائین‌بودن نرخ باززایی گیاه گلرنگ در کشت بافت و عدم وجود دستورالعمل باززایی کارآمد برای اکثر ارقام آن، در اغلب موارد مهندسی ژنتیک این گیاه را با مشکل مواجه کرده است (Huang *et al*. 2015). برای حل این مشکلات، محققان ارزیابی‌های زیادی در رابطه با عوامل مختلف آزمایش مثل انتخاب نوع ریزنمونه، تغییر در وضعیت محیط کشت و تنظیم شرایط کشت انجام داده‌اند. از طرف دیگر ریشه‌دار کردن نوساقه‌ها نیز یکی از مسائل چالش برانگیز برای محققین بوده است (Kumar *et al*. 2015).

با توجه به نیاز بهینه‌سازی شرایط کشت بافت قبل از هرگونه انتقال ژن، در این تحقیق اثر پنج سطح هورمونی نفتالین استیک اسید[5]با سه سطح از سیتوکین‌های تیدیازورون[6]تیدیازورونو زآتین[7]بر روی درصد کالوس‌دهی و باززایی سه ریزنمونه‌ی ریشه، محور زیر لپه و لپه رقم گلمهر گلرنگ بررسی شد. همچنین اثر تیمارهای هورمونی مختلف بر رشد ساقه و ریشه‌زایی نیز بررسی شد.

[1] Linoleic Acid
[2] Alpha tocopherol
[3] Gama linolenic acid
[4] Apo-Lipoprotein
[5] Naphtalen acetic acid=NAA
[6] Tidiazoron
[7] Zeatin

## مواد و روش‌ها

تهیه گیاهچه‌های سترون: در این پژوهش از رقم پاییزه گلمهرگلرنگ استفاده شد. بذرهای مورد نیاز از مرکز تحقیقات اصلاح بذر و نهال تهیه شد. به منظور ضدعفونی بذور، ابتدا بذرهای گلرنگ در اتانول ۷۰٪ به مدت ۵۰ ثانیه قرار گرفته و سه مرتبه با آب مقطر سترون شستشو شدند. سپس این بذرها به مدت ۸ دقیقه در محلول کلرید جیوه ($HgCl_2$) با غلظت ۰/۱٪ وزنی به حجمی در حالی‌که به آرامی تکان داده می‌شدند، غوطه‌ور بودند و در نهایت بذرها ۳ الی ۴ مرتبه با آب مقطر سترون شستشو شدند و پس از خشک شدن بر روی کاغذ صافی سترون، بر روی محیط جامد 1/2MS (Murashig and Skoog, 1962) بدون هورمون قرار گرفتند. تمامی مراحل ضدعفونی و کشت در زیر هود سترون انجام شد.

تیمارهای هورمونی: محیط‌های کشت بعد از افزودن هورمون‌های گیاهی طبق جدول ۱ در شرایط استاندارد اتوکلاو شده و سپس در پتری‌های ۱۰سانتی متری توزیع شدند. بذرهای سترون گلرنگ در اتاقک رشد برای جوانه زنی تحت شرایط نوری ۳۵ $\mu molm^{-2}s^{-1}$ و فتوپریود ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی قرار گرفته و در فاصله زمانی ۷-۸ روز گیاهچه‌هایی به طول ۳-۶ سانتی‌متر بدست آمد. این گیاهچه‌ها به زیر هود لامینار منتقل شده و ریزنمونه‌های ریشه (به همراه ریشه‌چه) و محور زیرلپه با طول ۰/۵-۱ سانتی‌متری و لپه‌های با ابعاد حدودی ۱ سانتی‌مترمربع بریده شده و از سمت پشت بر روی محیط هورمونی با ۳۰ گرم ساکارز در لیتر قرار گرفتند. تمامی تیمارها پس از دو هفته در محیط مشابه واکشت شدند تا بتوانند حداکثر استفاده را از محیط مغذی داشته باشند. نمونه‌های مورد آزمایش تا زمان تشکیل نوساقه‌ها هر ۱۴ روز یکبار به محیط مشابه منتقل و فراوانی باززایی نوساقه با شمارش تعداد نوساقه تولید شده به تعداد ریزنمونه کشت شده در هر پتری‌دیش محاسبه شده و به طور متناوب تحت شرایط سترون به محیط کشت MS طبق جدول ۱ (محیط طویل شدن ساقه) منتقل شدند تا به حداکثر رشد خود برسند. همچنین تحریک به باززایی کالوس‌هایی که بازانشده بودند نیز طبق جدول ۱ انجام شد. در نهایت ریشه‌زایی نوساقه‌ها طبق جدول ۱ بررسی شد.

تجزیه داده‌های آماری: نرمال‌بودن داده‌ها و تجزیه و تحلیل داده‌های آزمایش با استفاده از نرم افزارSAS 9.1 portable و در سطح معنی‌داری ۵٪ بررسی گردید. این آزمایش در قالب آزمایش فاکتوریل با طرح پایه کاملا تصادفی در ۳ تکرار بررسی شد.

**جدول۱: اجزای محیط کشت و شرایط مختلف آزمون شده برای باززایی از ریزنمونه‌های مختلف ژنوتیپ گلمهرگلرنگ**

| محیط کشت | اجزای محیط کشت |
|---|---|
| باززایی مستقیم ساقه | 1-MS + TDZ (0.2,0.5,1mg/L) + NAA (0,0.2,0.5,1,2mg/L) + Sucrose (3%) + Agar (7%)<br>2-MS + Zeatin (0.2,0.5,1mg/L) + NAA (0,0.2,0.5,1,2mg/L) + Sucrose (3%) + Agar (7%) |
| القای کالوس‌ها به باززایی | MS+BA (1mg/L)+ NAA (1mg/L) |
| پرزایی در ریزنمونه‌های باززاشده | MS+BA(0.5mg/L)+Thiamin-HCl (4mg/L) Sucrose (3%) + Agar (7%)<br>MS+control* |
| طویل‌سازی ساقه | MS+Kin (0.5mg/L)+Sucrose (3%) + Agar (7%) |
| ریشه‌زایی | 1- 1/2MS+ NAA (1mg/L)+ Sucrose (3% , 1.5%) + Agar (7%)<br>2- 1/2MS+ NAA (0.5mg/L)+ Sucrose (3% , 1.5%) + Agar (7%)<br>3- 1/2MS+NAA (2mg/L)+ Zeatin (0.2mg/L)+ Sucrose (1.5%) + Agar (7%)<br>4- 1/2MS+ IBA (0.2, 0.5, 1, 2, 2.5mg/L)+ Sucrose (3%, 1.5%) + Agar (7%) |

*ترکیب هورمونی این محیط مشابه ترکیب هورمونی استفاده شده جهت باززایی ساقه بود.

## نتایج و بحث

نتایج نشان داد که بیشترین کالوس (جنین زا و غیر جنین زا) پس از ۲۱ روز تشکیل شد. فراوانی کالوس‌زایی با شمارش تعداد ریزنمونه‌های کالوس داده به تعداد کل ریزنمونه‌های کشت شده به دست آمد. در ریزنمونه‌های مختلف فرآیند باززایی نوساقه‌ها پس از ۲-۴ هفته پس از کشت مشاهده شد. اولین ریزنمونه‌های بازاشده مربوط به ریزنمونه‌های محور زیر لپه بودند که فرآیند باززایی در آن‌ها در بازه زمانی حدودا ۲۰ روزه (از ۱۲-۳۲ روز پس از کشت) مشاهده شد. دیرترین نوساقه‌ها در ریزنمونه ریشه و در بازه زمانی حدود ۱۰روز (از ۲۵-۳۵ روز پس از کشت) مشاهده شدند.

با توجه به جدول ۲ در ریزنمونه محور زیر لپه بیشترین میزان باززایی در تیمار تیدیازورون0.5mg/L= با ۲۸/۸٪ مشاهده شد. همچنین کمترین میزان باززایی در تیمار تیدیازورون1mg/L= ونفتالین استیک اسید2mg/L= مشاهده شد. گزارش شده است که هورمون تیدیازورون0.5mg/L= باعث ۹۸/۵٪ باززایی مستقیم می‌شود (Radhika *et al.* 2006). اگرچه این غلظت در تحقیق ما باعث باززایی بیش از ۹۸٪ در هیچ یک از ریزنمونه‌ها نشد اما باعث حصول بیشترین درصد باززایی در بین سایر تیمارها گردید. درصد کالوس‌زایی در کلیه تیمارهای تیدیازورون/نفتالین استیک اسیدبیش از ۹۵٪ بود که این امر نشان دهنده تاثیر مناسب این سیتوکینین بر کالزایی ریزنمونه محور زیر لپه است. اگرچه درصد کالوس‌زایی در ریزنمونه محور زیر لپه بسیار بالا بود اما میزان باززایی هیچ‌گونه ارتباطی با میزان کالوس‌زایی نداشت. همانطور که در شکل ۱ مشاهده می‌شود میزان باززایی از محل پریموردیای برگی[1] در ریزنمونه‌های محور زیر لپه‌ای بیشتر است. جدیدترین نتایج نیز نشان می‌دهد که پریموردیای برگی

[1] Leaf primordia

می‌تواند با فراوانی بالایی سبب باززایی ژنوتیپ‌های مختلف گلرنگ شوند. همچنین آنالیزهای هیستولوژیکی نشان دادندکه منشا این پریموردیای برگی در گلرنگ، نواحی جانبی کورتکس ریزنمونه است (Patial *et al.* 2016).

**جدول ۲: تاثیر تنظیم کننده‌های رشدی بر درصد کالوس‌زایی و باززایی ریزنمونه محور زیرلپه‌ای گلرنگ (میانگین ±انحراف معیار)**

| NAA | TDZ | کالوس‌زایی | باززایی | NAA | ZEATIN | کالوس‌زایی | باززایی |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 0 | 0.2 | $95\pm2.27^{c}$ | $15.71\pm0.83^{b}$ | 0 | 0.2 | $70\pm8.22^{ab}$ | $7.06\pm1.14^{a}$ |
| 0 | 0.5 | $100\pm00^{a}$ | $28.8\pm2.28^{a}$ | 0 | 0.5 | $53\pm5.22^{de}$ | $0^{a}$ |
| 0 | 1 | $100\pm00^{a}$ | $6.76\pm3.12^{def}$ | 0 | 1 | $62\pm6.78^{abcde}$ | $0^{a}$ |
| 0.2 | 0.2 | $96\pm1.72^{bc}$ | $16.59\pm2^{b}$ | 0.2 | 0.2 | $57\pm9.25^{bcde}$ | $0^{a}$ |
| 0.2 | 0.5 | $100\pm00^{a}$ | $1.09\pm0.99^{f}$ | 0.2 | 0.5 | $65\pm9.7^{abcd}$ | $0^{a}$ |
| 0.2 | 1 | $100\pm00^{a}$ | $10.87\pm3.07^{c}$ | 0.2 | 1 | $64\pm6.27^{abcd}$ | $0^{a}$ |
| 0.5 | 0.2 | $97\pm1.34^{b}$ | $6.49\pm2.07^{def}$ | 0.5 | 0.2 | $48\pm10.71^{e}$ | $0^{a}$ |
| 0.5 | 0.5 | $100\pm00^{a}$ | $3.37\pm0.86^{fg}$ | 0.5 | 0.5 | $60\pm7.22^{abcde}$ | $0^{a}$ |
| 0.5 | 1 | $100\pm00^{a}$ | $14.81\pm4.49^{b}$ | 0.5 | 1 | $56\pm10.45^{bcde}$ | $0^{a}$ |
| 1 | 0.2 | $100\pm00^{a}$ | $9.9\pm1.25^{cd}$ | 1 | 0.2 | $67\pm9.94^{abcd}$ | $0^{a}$ |
| 1 | 0.5 | $100\pm00^{a}$ | $8.55\pm1.68^{cde}$ | 1 | 0.5 | $60\pm7.22^{abcde}$ | $0^{a}$ |
| 1 | 1 | $100\pm00^{a}$ | $1.29\pm1.1^{f}$ | 1 | 1 | $55\pm5.29^{bcde}$ | $0^{a}$ |
| 2 | 0.2 | $100\pm00^{a}$ | $5.29\pm1.24^{ef}$ | 2 | 0.2 | $69\pm3.77^{abc}$ | $0^{a}$ |
| 2 | 0.5 | $98\pm1.15^{ab}$ | $6.12\pm0.85^{def}$ | 2 | 0.5 | $73\pm8.11^{a}$ | $0^{a}$ |
| 2 | 1 | $100\pm00^{a}$ | $0.91\pm1.58^{f}$ | 2 | 1 | $54\pm5.20^{cde}$ | $0^{a}$ |

طبق مشاهدات ما که در جدول ۳ آمده است، بهترین تیمار برای باززایی ساقه از ریزنمونه ریشه زمانی بود که تیمار تیدیازورون0.5mg/L= و نفتالین استیک اسید2mg/L اعمال شد. ۲۵٪ ریزنمونه‌های ریشه تحت تیمار فوق توانستند سبب باززایی نوساقه‌ها گردند. ریزنمونه ریشه در برخی ار ژنوتیپ‌های گلرنگ به خوبی توانسته است سبب باززایی نوساقه گردد ( Radhika *et al.* 2006). در ریزنمونه ریشه نیز علی رغم اینکه درصد کالوس‌زایی در هر دو سری تیماری تیدیازورون/نفتالین استیک اسید و Zeatin/نفتالین استیک اسید بالا بود اما نتایج بسیار متفاوتی بدست آمد به طوری‌که تنها در یک تیمار Zeatin/نفتالین استیک اسید باززایی مشاهده شد حال آنکه در تیمارهای تیدیازورون/نفتالین استیک اسید در چهارده تیمار از پانزده تیمار باززایی مشاهده نشد. نتایج نشان داد که غلظت مناسب هورمون در تنها تیمار باززا شده Zeatin/نفتالین استیک اسید و بهترین تیمار تیدیازورون/نفتالین استیک اسید مشابه بوده و در نسبت سیتوکین/اکسین ۴/۱ بیشترین حالت باززایی را داشت.

**جدول ۳: تاثیر تنظیم کننده‌های رشدی بر درصد کالوس‌زایی و باززایی ریزنمونه ریشه گلرنگ (میانگین ±انحراف معیار)**

| NAA | TDZ | درصد کالوس‌زایی | باززایی | NAA | ZEA | کالوس‌زایی | باززایی |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 0 | 0.2 | 100±00$^{a}$ | 0.62±1.08$^{f}$ | 0 | 0.2 | 68±3.58$^{a}$ | 0$^{a}$ |
| 0 | 0.5 | 100±00$^{a}$ | 9.63±2.36$^{d}$ | 0 | 0.5 | 71±3.09$^{a}$ | 0$^{a}$ |
| 0 | 1 | 100±00$^{a}$ | 11.56±2.07$^{cd}$ | 0 | 1 | 64±8.40$^{abc}$ | 0$^{a}$ |
| 0.2 | 0.2 | 100±00$^{a}$ | 2.28±0.73$^{f}$ | 0.2 | 0.2 | 52±10.01$^{bc}$ | 0$^{a}$ |
| 0.2 | 0.5 | 100±00$^{a}$ | 14.09±2.67$^{c}$ | 0.2 | 0.5 | 59±5.41$^{abc}$ | 0$^{a}$ |
| 0.2 | 1 | 100±00$^{a}$ | 11.1±1.77$^{cd}$ | 0.2 | 1 | 62±10.55$^{ab}$ | 0$^{a}$ |
| 0.5 | 0.2 | 100±00$^{a}$ | 2.03±0.12$^{f}$ | 0.5 | 0.2 | 54±4.92$^{bc}$ | 0$^{a}$ |
| 0.5 | 0.5 | 100±00$^{a}$ | 8.59±1.82$^{d}$ | 0.5 | 0.5 | 51±6.98$^{c}$ | 0$^{a}$ |
| 0.5 | 1 | 87.66±3.65$^{c}$ | 1.25±1.17$^{f}$ | 0.5 | 1 | 66±11.91$^{c}$ | 0$^{a}$ |
| 1 | 0.2 | 100±00$^{a}$ | 2.4±0.91$^{f}$ | 1 | 0.2 | 48±8.64$^{c}$ | 0$^{a}$ |
| 1 | 0.5 | 93.61±10.27$^{b}$ | 18.7±2.23$^{b}$ | 1 | 0.5 | 49±7.02$^{c}$ | 0$^{a}$ |
| 1 | 1 | 100±00$^{a}$ | 11.64±3.25$^{cd}$ | 1 | 1 | 53±6.83$^{bc}$ | 0$^{a}$ |
| 2 | 0.2 | 100±00$^{a}$ | 0$^{f}$ | 2 | 0.2 | 70±5.47$^{a}$ | 0$^{a}$ |
| 2 | 0.5 | 100±00$^{a}$ | 25.15±1.67$^{a}$ | 2 | 0.5 | 61±4.88$^{abc}$ | 3.3±1.1$^{a}$ |
| 2 | 1 | 100±00$^{a}$ | 5.45±0.71$^{e}$ | 2 | 1 | 57±9.11$^{abc}$ | 0$^{a}$ |

اعمال تیمار تیدیازورون0.5mg/L=و نفتالین استیک اسید2mg/L= باعث کسب بیشترین فراوانی باززایی در ریزنمونه لپه گردید (جدول ۴). تیمار با /Zeatinنفتالین استیک اسید در این ریزنمونه نیز مشابه ریشه و محور زیر لپه نتوانست سبب باززایی بالایی در ریزنمونه‌ها شود اما به هرحال در ریزنمونه لپه بیشترین تیمار پاسخ دهنده به باززایی (چهار تیمار هورمونی از پانزده تیمار هورمونی (/Zeatinنفتالین استیک اسید) مشاهده گردید. در ریزنمونه لپه نیز مشابه ریشه و محور زیر لپه درصد بالایی از ریزنمونه‌ها کالوس دادند اما ارتباط واضحی بین درصد کالوس‌زایی و باززایی مشاهده نشد.

به طور کلی در تمامی تیمارهای تیدیازورون/نفتالین استیک اسید باززایی هر چند با مقادیر اندک انجام شد اما در مورد تیمارهای /Zeatinنفتالین استیک اسید در اکثر تیمارها هیچ‌گونه باززایی رخ نداد و در بهترین تیمار نفتالین استیک اسید0= و Zeatin=0.2 در ریزنمونه محور زیر لپه تنها ۷درصد باززایی مشاهده شد. زآتین همچنین در باززایی سه رقم-Th-10 black, NP 9 black , Partialhull black نیز ناموفق بود (George and Rao 1982). احتمالا هورمون رشد زآتین نمی‌تواند به عنوان یک سیتوکینین مناسب برای باززایی گلرنگ مورد استفاده قرار گیرد. فراوانی جنین‌زایی به علاوه‌ی تعداد جنین‌های سوماتیکی بسته به نوع اکسین و غلظت آن در گلرنگ متفاوت بوده است. اما در اکثر آن‌ها نسبت اکسین به سیتوکینین بیشتر از یک، نرخ رشد کالوس را افزایش داده است. در برخی ریزنمونه‌ها اکسین IBA (Kumar *et al.*2008b) و در برخی دیگر نفتالین استیک اسید (Mandal *et al.* 2003) به تنهایی توانست باعث باززایی نوساقه‌ها گردد ولی در اکثر تحقیقات انجام شده اکسین نفتالین استیک اسید در ترکیب با BA (Ghasempour *et al.* 2014; Huang *et al*. 2015; Patial *et al.* 2016) یا تیدیازورون (Basalma *et al.* 2008; Nikhil *et al.* 2014) توانسته است که به خوبی سبب القای باززایی ساقه شود.

**جدول ۴: تاثیر تنظیم‌کننده‌های رشدی بر درصد کالوس‌زایی و باززایی ریزنمونه لپه گلرنگ (میانگین ± انحراف معیار)**

| NAA | TDZ | کالوس‌زایی | درصد باززایی | NAA | ZEA | کالوس‌زایی | باززایی |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 0 | 0.2 | $85.49\pm7.93^{e}$ | $0^{f}$ | 0 | 0.2 | $53\pm7.01^{cd}$ | $0^{a}$ |
| 0 | 0.5 | $95.72\pm2.18^{bcd}$ | $9.07\pm1.73^{b}$ | 0 | 0.5 | $59.33\pm8.34^{abcd}$ | $0^{a}$ |
| 0 | 1 | $87.15\pm6.76^{e}$ | $7.74\pm2.9^{bc}$ | 0 | 1 | $69\pm6.58^{ab}$ | $2.04\pm0.1^{a}$ |
| 0.2 | 0.2 | $98.35\pm0.96^{ab}$ | $4.25\pm0.86^{de}$ | 0.2 | 0.2 | $63\pm7.05^{abcd}$ | $0^{a}$ |
| 0.2 | 0.5 | $88.40\pm6.19^{e}$ | $0.66\pm1.15^{f}$ | 0.2 | 0.5 | $71\pm4.98^{a}$ | $0^{a}$ |
| 0.2 | 1 | $100\pm00^{a}$ | $0.7\pm1.25^{f}$ | 0.2 | 1 | $57\pm9.11^{abcd}$ | $0^{a}$ |
| 0.5 | 0.2 | $100\pm00^{a}$ | $0.33\pm0.57^{f}$ | 0.5 | 0.2 | $53\pm8.18^{cd}$ | $0^{a}$ |
| 0.5 | 0.5 | $97.85\pm1.25^{ab}$ | $3.73\pm0.72^{de}$ | 0.5 | 0.5 | $58\pm5.71^{abcd}$ | $0.66\pm0.11^{a}$ |
| 0.5 | 1 | $96.84\pm1.86^{abc}$ | $6.26\pm0.39^{cd}$ | 0.5 | 1 | $61\pm10.04^{abcd}$ | $0^{a}$ |
| 1 | 0.2 | $92.61\pm3.87^{d}$ | $2.04\pm0.56^{ef}$ | 1 | 0.2 | $50\pm3.74^{d}$ | $0^{a}$ |
| 1 | 0.5 | $100\pm00^{a}$ | $9.9\pm3.52^{b}$ | 1 | 0.5 | $55\pm4.13^{bcd}$ | $4.54\pm0.8^{a}$ |
| 1 | 1 | $96.84\pm1.86^{abc}$ | $4.78\pm1.66^{d}$ | 1 | 1 | $60\pm9.29^{abcd}$ | $0^{a}$ |
| 2 | 0.2 | $94.25\pm2.94^{cd}$ | $0.37\pm0.64^{f}$ | 2 | 0.2 | $61\pm9.38^{abcd}$ | $0^{a}$ |
| 2 | 0.5 | $100\pm00^{a}$ | $24.53\pm0.87^{a}$ | 2 | 0.5 | $56\pm7.52^{bcd}$ | $0^{a}$ |
| 2 | 1 | $87.77\pm6.60^{e}$ | $0^{f}$ | 2 | 1 | $65\pm5.37^{abc}$ | $1.33\pm0.57^{a}$ |

همچنین نتایج بدست آمده در سه جدول ۲ و ۳ و ۴ نشان می‌دهد که در هر سه ریزنمونه پرتوانی[1]بالایی برای تبدیل ریزنمونه‌های گیاهچه‌های ۸-۹ روزه به سمت کالوس‌دهی وجود دارد. به همین دلیل می‌توان ادعا کرد که احتمالا تفاوت فراوانی باززایی ریزنمونه‌های مختلف رقم گلمهر گلرنگ متاثر از تفاوت در میزان هورمون‌های درون‌زاد باشد تا اثر پرتوانی بافت‌های مختلف. این درحالی است که Patial و همکاران (۲۰۱۶) اعتقاد دارند که تفاوت فراوانی باززایی در ریزنمونه‌های مختلف یک ژنوتیپ گلرنگ احتمالا بدلیل تفاوت در پرتوانی بافت‌های مختلف آن است.

به منظور القای ساقه‌زایی کالوس‌ها و با توجه به اینکه درصد زیادی از ریزنمونه‌ها کالوس داده بوند، تیمار BA (1mg/L)+ نفتالین استیک اسید(1mg/L) در کنار واکشت متوالی کالوس‌ها بر روی محیط کشت اولیه حاوی تیدیازورون/نفتالین استیک اسید و /Zeatinنفتالین استیک اسید اعمال شد. گزارش‌های قبلی نشان دادند که تیمار BA (1mg/L)+نفتالین استیک اسید (1mg/L) معمولا در ارقام مختلف سبب القای ساقه‌زایی می‌شود (Radhika et al.2006). به همین دلیل در این تحقیق نیز پاسخ ساقه‌زائی کالوس‌های بدست آمده از رقم گلمهر با استفاده از این تیمار هورمونی مورد بررسی قرار گرفت. نتایج حاصل نشان داد که از بین ۷۳۶ کالوس کشت شده در ترکیب هورمونی فوق تنها ۱۶ نوساقه تشکیل شد. این در حالی بود که در واکشت متوالی کالوس‌ها بر روی محیط کشت کالوس‌زایی (به عنوان شاهد) تعداد ۱۳ نوساقه از مجموع ۷۸۰ کالوس بدست آمد.

تقریبا در تمامی تیمارهای زآتین، کالوس‌هایی که باززا نشده بودند به سمت ریشه‌زایی رفتند. به همین منظور تیمار نفتالین استیک اسید(0.2mg/L) Zeatin +(2mg/L) که بیشترین ریشه‌زایی مستقیم از کالوس را داشت نیز به عنوان تیمار

[1] Totipotency

ریشه‌زایی نوساقه‌ها مورد استفاده قرار گرفت اما این تیمار منجر به هیچ‌گونه ریشه‌زایی نشد. از آنجایی که مقدار و نسبت هورمون‌های درون‌زا در بافت‌های گیاهی تاثیر قابل ملاحظه‌ای بر فرایند اندام‌زایی گیاهان در شرایط درون شیشه‌ای دارند (Jimenenz and Bangerth, 2001) بنابراین احتمال می‌رود هورمون‌های درون‌زای موجود در نوساقه‌های حاصل از تیمار فوق، تعادل هورمونی را به گونه‌ای تغییر می‌دهد که فرایند ریشه‌زایی رخ ندهد.

در تیمارهای هورمونی نفتالین استیک اسید و IBA که به منظور القای ریشه‌زایی نوساقه‌ها استفاده گردید تنها ۳٪ ریشه‌زایی در تیمار نفتالین استیک اسید1 mg/L= مشاهده شد. همین پاسخ اندک نوساقه‌های گلرنگ سبب شد محققان بدنبال استفاده از روش‌های جایگزین مانند ریزپیوندی باشند (Belide *et al.* 2011; Huang *et al.* 2015). در این تحقیق برای اولین بار از قلمه‌زنی نوساقه‌های بازاشده برای ریشه‌دهی استفاده شد اما هیچ‌کدام از قلمه‌ها چه با تیمار IBA و چه بدون تیمار با IBA ریشه‌دار نشدند. به طور کلی فرآیند ریشه‌زایی یکی از مراحل محدود کننده کشت بافت گلرنگ است (Nikhil *et al.* 2014). با توجه به میزان متفاوت ریشه‌زایی در ارقام مختلف گلرنگ، می‌توان نتیجه گرفت که ریشه‌زایی نوساقه‌ها در گلرنگ به مقدار زیادی تحت تاثیر ژنوتیپ است (Ligiao & Meili 2013).

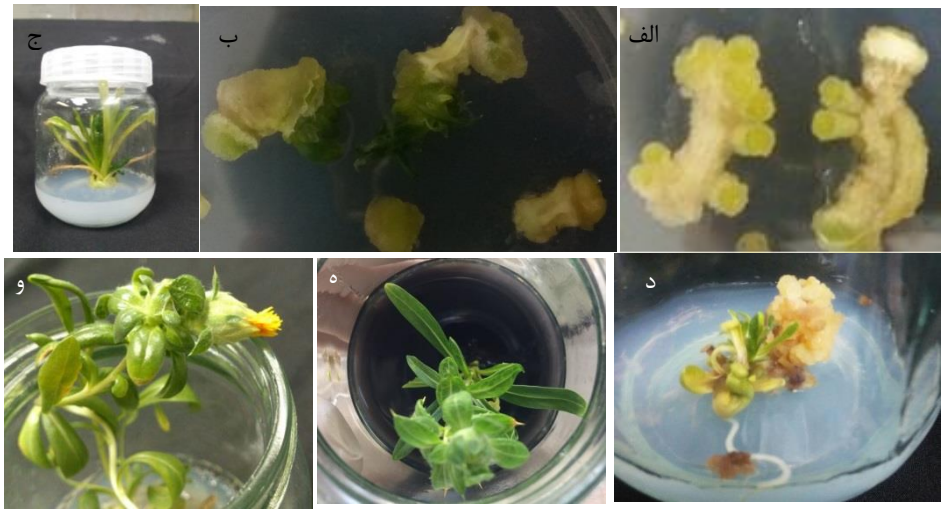
از ویژگی‌های کشت بافت گلرنگ، القای کاپیتولوم در شرایط درون شیشه است و تا کنون تلاش‌های متعددی به منظور القای جوانه‌های گل برای غلبه بر مشکل عدم همزمانی گلدهی در گلرنگ انجام شده است (Sujatha & Dineshkumar, 2007). در مطالعه حاضر نیز بدون اینکه ریشه‌زایی در برخی از نوساقه‌ها در شرایط درون شیشه القا شود، تشکیل پریموردیای گل در آن‌ها مشاهده شده و برخی از آن‌ها وارد مرحله گلدهی شدند (شکل ۱). گل‌هایی که در شرایط درون شیشه تشکیل شدند فاقد توانایی تشکیل بذر بوده و عقیم بودند.

ریشه‌زایی نوساقه‌ها یکی از مشکلات اساسی است که از اولین تلاش‌ها برای کشت بافت گلرنگ تا کنون وجود داشته است. نرخ ریشه‌زایی با استفاده از اکسین‌های مختلف در ارقام مختلف بسیار متفاوت بوده است به طوری‌که این نرخ از ۴٪ (Patial *et al.* 2016) تا ۷۰٪ (Shilpa *et al.* 2010) متغیر بوده است. در بیشتر تحقیقات بدلیل ریشه‌زایی بسیار پایین، نرخ ریشه‌زایی ذکر نشده است (Fan & Guo 2013; Fan and Guo 2014). در این تحقیق نیز نرخ ریشه‌زایی با اعمال تیمارهای هورمونی مختلف نتیجه بخش نبود و تنها کمتر از ۴٪ نوساقه‌ها ریشه‌دار شدند.

چندین تحقیق در مورد اثر محیط‌های پایه کشت مختلف از جمله MS, LS, N6, B5, Chaleff's انجام شده که در تمام تحقیقات مشاهده شد که محیط MS از سایر محیط‌ها برای ساقه‌زایی ارقام مختلف مناسب‌تر بوده است (Prasad *et al.* 1991; Nikam *et al.*1999). به همین دلیل در این پژوهش از محیط کشت MS جهت اعمال تیمارهای هورمونی استفاده شد.

بطور کلی، فاکتورهایی مانند ژنوتیپ، سن گیاهچه، نوع ریزنمونه، اجزای محیط کشت، تنظیم‌کننده‌های رشدی (سیتوکینین، اکسین، اتیلن و...)، منبع کربن و دیگر ترکیبات فعال بیشترین تاثیرات را بر روی کشت بافت گلرنگ و تعیین

موفقیت یا شکست در آزمایش‌های باززایی داشته‌اند. همچنین، pH محیط، پیش تیمار ریزنمونه (خراش، تیمار سرما یا گرما و...) و شرایط کشت (دما، رطوبت، روشنایی و...) نیز در کشت بافت گلرنگ مهم هستند. هنگامی‌که ریزنمونه از گیاهچه‌های ۵-۷روزه گرفته می‌شوند، فراوانی باززایی به طور معنی‌داری افزایش می‌یابد این مسئله احتمالا به‌دلیل این است که بافت‌های جوان فعالیت مریستمی بیشتری نسبت به بافت‌های بالغ‌تر دارند (Shilpa *et al.* 2013; Fan & Guo 2014). به طورکلی محیط کشت پایه‌ی MS (Prasad *et al.* 1991; Nikam *et al.*1999) و منبع کربن ساکارز (Nikam *et al.*1999) برای کشت بافت گلرنگ بهینه‌ترین شرایط است. pH محیط ۵/۸ و نگهداری کشت‌ها در دمای $25\pm30\ ^{\circ}C$ و طول دوره روشنایی ۱۶ ساعت با شدت تابش $30\mu mol.m^{-2}.S^{-1}$ (لامپ فلورسنت سفید سرد) نیز از شرایط مناسب برای کشت بافت این گیاه است (Fan & Guo 2014).




**شکل۱- مراحل مختلف باززایی مستقیم رقم گلمهر گلرنگ. الف) تشکیل کالوس‌های بازاشونده از محل قطع شدگی ریشه-چه‌ها از ریشه‌ی اصلی ده روز پس از کشت ب) نوساقه‌های بازاشده از ریزنمونه‌ی محور زیر لپه ج) محیط طویل سازی ریشه د) ریشه‌دهی نوساقه‌ی بازاشده ه) شروع تشکیل پریموردیای گل در شرایط درون شیشه و) گلدهی در شرایط درون شیشه نتایج حاصل نشان داد که از بین ریزنمونه‌های مورد استفاده بیشترین باززایی مشاهده شده ۲۸/۸٪ مربوط به محور زیر لپه و در ترکیب هورمونی (تیدیازورون ,0.5=نفتالین استیک اسید0=) است. لذا از این تیمار هورمونی می‌توان در مهندسی ژنتیک این گیاه بهره برد. بنابراین، براساس نتایج حاصل تیمار هورمونی فوق و استفاده از محور زیر لپه بیشترین میزان باززایی را داشته و می‌تواند برای اهداف مهندسی ژنتیک گیاه گلرنگ مورد استفاده قرار گیرد.**

## منابع

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 (8):960-966.

Belide, S., Hac, L., Singh, SP., Green, AG., Wood, C. (2011). Agrobacterium-mediated transformation of safflower and the efficient recovery of transgenic plants via grafting. Plant Methods, 7:12.

Fan, LJ., Guo, M. (2013). Progress of safflower (*Carthamus tinctorius* L.) regeneration through tissue culture. Journal of Medical Colleges of PLA, 28 (5):289-301.Fan, LJ., Guo, M. (2014). Regeneration of *Carthamus tinctorius* from jimsar. Chinese Herbal Medicine, 6 (3):237-241.

George, L., Rao, PS. (1982). In vitro multiplication of safflower (*Carthamus tinctorius* L.) through tissue culture. Proc Indian Natn Sci Acad, 48:791-794.

Ghasempour, H., Soheilikhah, Z., Zebarjadi, AR., Ghasempour, S., Karimi, N. (2014). In vitro micro propagation, callus induction and shoot regeneration in safflower L. Cv. Leaf. Iranian Journal of Plant Physiology, 4 (2):999-1004.

Huang, J., Yang, J., Guan, L., Yi, S., Du, L., Tian, H., Guo, Y., Zhai, F., Lu, Z., Li, H., Li, X., Jiang, C. (2015). Expression of bioactive recombinant human fibroblast growth factor 10 in *Carthamus tinctorius* L. Seeds. Protein Expression and purification, http://dx.doi.org/10.1016/j.pep.2015.09.016.

Jimenez, VM., Bangerth, F. (2001). Endogenous hormone levels in explants and in embryogenic and non-embryogenic cultures of carrot. Physiol. Plant, 111: 389-395.

Kakaei, M., Mansouri, M., Abdollahi, MR., Moradi, F. (2013). Effect of NaCl induced osmotic stress on callus growth parameters of two safflower (*Carthamus tinctorius L.*) cultivars. International Journal of Agriculture and crop sciences, 6 (3):127-132.

Kumar, JV., Kumari, BR., Castano, E. (2008). Cyclic somatic embryogenesis and efficient plant regeneration from callus of safflower. Biologia Plantarum, 52 (3):429-436.

Kumar, S., Pandey, RK., Kumar, U. (2015). in-vitro callus induction from two different explants stem and leaf in *Carthamus tinctorius* Linn. European Journal of Experimental Biology, 5(2):1-4.

Mandal, AKA., Gupta, SD. (2003). Somatic embryogenesis of safflower: influence of auxin and ontogeny of somatic embryos. Plant Cell, Tissue Organ Culture, 72 (1):27-31.

Motamedi, J., Zebarjadi, A., Kahrizi, D., Salmanian, AH. (2011). In vitro propagation and Agrobacterium-mediated transformation of safflower (*Carthamus tinctorius* L.) using a bacterial mutated *aro*A gene. Australian Journal of Crop Science, 5 (4):479-486.

Murashige, T., Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissue cultures. Physiologia Plantarum, 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, 55 (1):15-22.

Nikhil, M., Dudhare, MS., Jadhav, PV., Moharil, MP., Deshmukh, AG. (2014). In vitro shoot regeneration plantlet development in safflower (*Carthamus tinctorius*). The bioscan, 9 (2):551-555.

Patial, V., Krishna, R., Arya, G., singh, VK., Agrawal, M., Goel, S., Jagannath, A., Kumar, A. (2016). Development of an effecient, genotype independent plant regeneration and transformation protocol using cotyledonary nodes in safflower (*Carthamus tinctorius*). Journal of Plant Biocemistry and Biotechnology, 25 (4):421-432.

Prasad, BR., Khadeer, MA., Seeta, P., Anwar, SY. (1991). In vitro induction of androgenic haploids in safflower (*Carthamus tinctorius* L.). Plant Cell Report, 10 (1):48-51.

Radhika, K., Sujatha, M., Rao, T N. (2006). Thidiazuron stimulates adventitious shoot regeneration in different safflower explants. Biologia Plantarum, 50 (2):174-179.

Shilpa, KS., Kumar, VD., Sujatha, M. (2010). Agrobacterium mediated genetic transformation of safflower (*Carthamus tinctorius* L.). Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 103 (3):387-401.

Yang, J., Xiong, L., Li, T. (2009). The Effect of Phytohormones on safllower regeneration plant. Journal of Traditional Chinese Medecine, 32 (9):1335-1338.

# Callugenesis and direct regeneration optimization for root, cotyledon and hypocotyle explants of safflower

**Mohammad Afsharshandiz**[1], **Hassan Rahnama**[2], **Hossein Azarnivand**[3*]

**Received:**
**Accepted:**

## Abstract

Safflower (*Carthamus tinctorius*) is one of the oil crops which well adapted to Iran's semi-hard land. High content of omega-6 fatty acids in safflower oils representing an advanced semi-long chain poly unsaturated fatty acid (SLC-PUFA) pathway in the plant, and make this plant as a suitable candidate for SLC-PUFA pathway engeeniring. Tissue culture optimization and plant regeneration is a prerequisite for any genetic engineering procedure. In this research, the optimisation of tissue culture of Golmehr cultivar was performed For this, regeneration of three explants include root, hypocotyle and cotyledon on MS riched by different concentration of TDZ/NAA and Zeatin/NAA was investigated. Shoot propagation, shoot elongation and root induction studied in the present work. Shoot regenerations were obtained in TDZ=0.5mg/L with 28.8%, TDZ=0.5mg/L+NAA=2mg/L with 25.15% and TDZ=0.5mg/L+NAA=2mg/L with 24.53% was obtained in hypocotyle, root and cotyledon explant respectively. The highest propagation was observed in BA=0.5mg/L+Thiamin-HCl=4mg/L treatment for regenerated explants. However, BA=1mg/L+NAA=1mg/L treatment have no significant effects on the regeneration of callus inducing explants. In this research, we obtain less than 4% rooting in shoots by hormonal treatment.

**Key words: regeneration, callugenesis, tissue culture, safflower**

1-Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran (ABRII), Agricultural Research Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran
2- Faculty of Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran.
3-Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran (ABRII), Agricultural Research Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran
*(corresponding auther: )