DOI: http://dx.doi.org/10.22092/ijmapr.2016.106139

دوماهنامه علمی- پژوهشی تحقیقات گیاهان دارویی و معطر ایران
جلد ۳۲، شماره ۱، صفحه ۹۷-۸۳ (۱۳۹۵)

اثر نوع ریزنمونه و ترکیب‌های مختلف تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی در کالوس‌زایی و ساقه‌زایی گیاه شاهدانه (*Cannabis sativa* L.) در شرایط درون شیشه

مهدی موحدی[۱]، ولی‌اله قاسمی عمران[۲*] و سپیده ترابی[۳]

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم تحقیقات، تهران، ایران

۲*- نویسنده مسئول، استادیار، پژوهشکده ژنتیک و زیست فناوری کشاورزی طبرستان، دانشگاه کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ایران

پست الکترونیک: Ghasemiomran@yahoo.com

۳- استادیار، گروه اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم تحقیقات، تهران، ایران

تاریخ دریافت: مرداد ۱۳۹۳ تاریخ اصلاح نهایی: آذر ۱۳۹۳ تاریخ پذیرش: دی ۱۳۹۳

چکیده

شاهدانه ایرانی (*Cannabis sativa* L.) گیاهی دارویی متعلق به خانواده Cannabinaceae است که ترکیب‌های متنوعی از متابولیت‌های ثانویه را تولید می‌کند. این تحقیق به‌منظور بهینه‌سازی باززایی مستقیم و غیرمستقیم این گیاه در شرایط in vitro انجام شد. ریزنمونه‌های برگ و هیپوکوتیل از گیاهچه‌های استریل جداسازی شده و محیط کشت‌های حاوی BA (۰/۱، ۰/۲، ۰/۵، ۱، ۲، ۳ میلی‌گرم در لیتر) به تنهایی یا در ترکیب با ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر IBA و TDZ (۰/۱، ۰/۲، ۰/۵، ۱، ۲، ۳ میلی‌گرم در لیتر) به تنهایی یا در ترکیب با ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر IBA کشت شدند. عکس‌العمل ریزنمونه‌ها در همه محیط‌های کشت مورد استفاده، تولید کالوس بود. هیچگونه باززایی مستقیم در ریزنمونه‌ها مشاهده نشد و در ریزنمونه هیپوکوتیل باززایی غیرمستقیم در سطوح مختلف هورمونی BA اتفاق افتاد. بیشترین حجم کالوس تولید شده، در غلظت ۲ میلی‌گرم در لیتر TDZ به همراه ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر IBA در ریزنمونه برگ بدست آمد. بیشترین وزن تر و خشک کالوس تولید شده مربوط به ریزنمونه برگ در تیمار هورمونی ۱ میلی‌گرم در لیتر TDZ به همراه ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر IBA بود. تیمار هورمونی ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر TDZ به همراه ۰/۵ میلی‌گرم IBA در هیچ ریزنمونه‌ای کالوس تولید نکرد. البته ترکیب هورمون IBA در غلظت‌های مختلف هورمون BA، تأثیر شگرفی در بهبود حجم و وزن تر و خشک کالوس ریزنمونه‌ها داشت. با این حال افزودن هورمون IBA در غلظت‌های مختلف هورمون TDZ چندان تأثیری در بهبود حجم و وزن تر و خشک کالوس هر دو ریزنمونه نداشت.

واژه‌های کلیدی: تنظیم‌کننده‌های رشد، ریزازدیادی، ریزنمونه، شاهدانه (*Cannabis sativa* L.)، کالوس.

مقدمه

شاهدانه گیاهی از راسته Urticales است که دارای خواص دارویی متعددی می‌باشد (Yoshimatsu *et al.*, 2004). از گیاه شاهدانه تاکنون بیش از ۶۱ ماده شیمیایی معروف به کانابینویید شناسایی شده‌است. کانابینوئیدها، یک خانواده بی‌نظیر از ترکیب‌های ترپنی و فنولیک منحصراً در شاهدانه بوده و غدد اپیدرمی محل اصلی تولید این مواد می‌باشند. اصلی‌ترین متابولیت ثانویه تولید

شده در شاهدانه، کانابینویید دلتا ۹ تتراهیدروکانابینول (THC) و کانابییدول (CBD) می‌باشد (Small & Beckstead, 1973). مقدار THC در بخش‌های مختلف گیاه متفاوت است، به‌طوری که میزان آن در سرشاخه‌های گلدار گیاه در بالاترین حد و به‌ترتیب در برگ‌ها، برگ‌های تحتانی ساقه و دانه‌های گیاه کاهش می‌یابد (Kosiorek *et al*., 2004). این گیاه برای انسان از جنبه‌های مختلف مورد توجه بوده و یکی از بهترین منابع فیبر طبیعی است. روغن آن دارای اسیدهای چرب امگا ۶ و امگا ۳ بوده و می‌تواند در تغذیه انسان جایگزین روغن ماهی شود (Pinarkara *et al*., 2004). این گیاه در پزشکی برای درمان آب سیاه، کاهش درد و برای بیماری‌های مرتبط با اعصاب مانند بیماری صرع، افسردگی و اختلالات دو قطبی نیز مورد استفاده قرار می‌گیرد (Grotenhermen & Russo, 2002). البته گرایش روزافزون جوامع بشری به استفاده از داروهای دارای منشأ گیاهی سبب افزایش تقاضای مواد مؤثره گیاهان دارویی شده‌است. با وجود پیشرفت‌های زیاد در زمینه سنتز مصنوعی مواد مؤثره گیاهی، به‌دلیل ناشناخته بودن و پیچیدگی ساختمان شیمیایی اغلب آنها، تولید این ترکیب‌ها به‌صورت سنتتیک مشکل و مستلزم هزینه‌های زیاد است. در نتیجه تاکنون موفقیت چشمگیری در تولید این ترکیب‌های دارویی ارزشمند حاصل نشده‌است و هنوز هم استخراج از منابع گیاهی تنها منبع به صرفه اقتصادی دستیابی به این ترکیب‌هاست. از این‌رو برای بدست آوردن مناسبترین و بهترین مرحله رشدی برای استحصال حداکثر میزان مواد مؤثره گیاهی در واحد سطح، لازم است اطلاعات مورد نظر در مورد این ترکیب‌ها و زمان تشکیل آن مورد بررسی قرار گیرد (Davies & Schwinn, 2003؛ Allen *et al*., 2008).

در تحقیقی تأثیر نوع رقم، منبع ریزنمونه و تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی در القاء کالوس و باززایی گیاه شاهدانه مورد بررسی قرار گرفت. در این تحقیق ریزنمونه‌هایی از برگ‌های جوان، دمبرگ، گره و جوانه انتخاب شدند و در محیط کشت MS حاوی هورمون‌های Kin، NAA، 2,4-D و Dicamba (نوعی هورمون اکسین است) قرار گرفتند. ترکیب‌های هورمونی و منشأ ریزنمونه‌ها نه تنها در کالوس‌دهی و نوع کالوس‌های تولید شده از نظر رنگ و ساختار نقش بسزایی داشتند بلکه در باززایی گیاه نیز مؤثر بوده‌اند. بهترین درصد باززایی مربوط به ریزنمونه دمبرگ، در هر سه رقم مربوط به محیط کشت حاوی ۲ و ۳ میلی‌گرم در لیتر هورمون Dicamba بوده‌است (Ślusarkiewicz-Jarzina *et al*., 2005). در تحقیقی Lata و همکاران (۲۰۱۰) از محیط کشت MS حاوی غلظت‌های مختلف IAA، IBA، NAA و 2,4-D در ترکیب با ۱ میکرومولار از TDZ برای باززایی گیاه شاهدانه از ریزنمونه برگ استفاده کردند. در تحقیقی دیگر Feeney و Punja (۲۰۰۳) کشت بافت گیاه شاهدانه را با استفاده از ریزنمونه‌های برگ و ساقه گرفته شده از ۴ رقم انجام دادند. در مجموع، نظر به تک‌جنسی بودن این گیاه در طبیعت و اهمیت بیشتر جنس ماده از لحاظ تولید متابولیت‌های ثانویه باارزش و با توجه به اینکه باززایی مستقیم و غیرمستقیم گیاهان به‌عنوان پیش‌نیاز اساسی در انتقال ژن، دستورزی‌های ژنتیکی و غیره می‌باشد، بنابراین بهینه‌سازی باززایی این گیاه در شرایط درون شیشه‌ای ضروری به نظر می‌رسد. گزارش‌های اندکی در مورد باززایی مستقیم و غیرمستقیم این گیاه از نظر جهانی وجود دارد و منابع مختلف بررسی شده حکایت از سرسخت بودن این گیاه برای باززایی دارد. کشور ایران دارای شرایط آب و هوایی بسیار متنوع بوده و دارای قابلیت بالقوه‌ای برای پرورش این گیاه دارویی با ارزش می‌باشد. با وجود بومی بودن این گیاه با ارزش، در مورد کشت بافت گیاه شاهدانه در ایران گزارش‌های اندکی موجود می‌باشد. از این‌رو، این تحقیق با هدف بهینه‌سازی کشت بافت این گیاه شامل کال‌زایی و باززایی گیاه شاهدانه ایرانی در شرایط درون شیشه‌ای انجام شده است.

مواد و روشها

تهیه مواد گیاهی و محیط کشت

بذرهای شاهدانه از سازمان جنگلها، مراتع و آبخیزداری کشور تهیه گردید. به‌منظور ضدعفونی کردن سطحی بذرها، آنها را پس از شستشو با آب جاری در الکل ۷۰٪ به مدت ۳۰ ثانیه قرار داده، سپس به‌وسیله آب مقطر اتوکلاو شده آبشویی شدند. در مرحله بعد توسط محلول هیپوکلرید سدیم ۲٪ به‌همراه یک قطره توین ۲۰، به مدت ۲۰ دقیقه ضدعفونی سطحی انجام شد و در نهایت ۴ بار با آب مقطر اتوکلاو شده کاملاً شستشو گردید. در گام بعدی بذرها را در محلول ۰/۰۵٪ کلرید جیوه بمدت ۵ دقیقه ضدعفونی کرده و در پایان ۵ بار با آب مقطر اتوکلاو شده شسته شدند. به‌منظور جوانه‌زنی بذرها و تولید گیاهچه‌ها برای دستیابی به ریزنمونه، بذرها در محیط کشت پایه MS بدون هورمون حاوی ۳۰ گرم در لیتر ساکارز و ۸ گرم در لیتر آگار با pH=۵/۸، در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. بدین‌ترتیب تعدادی گیاه به‌عنوان مواد اولیه برای جدا کردن ریزنمونه‌های مورد آزمایش بدست آمد.

انجام مراحل باززایی

از گیاهچه‌های استریل رشد یافته در محیط *in vitro* پس از ۳۰ روز، قطعات ریزنمونه مختلف شامل برگ و هیپوکوتیل جداسازی شده و در شرایط استریل به محیط کشت‌های حاوی هورمون‌های مختلف منتقل شدند. برای کالوس‌زایی و باززایی، همه ریزنمونه‌ها در محیط کشت MS پایه حاوی ترکیب‌های مختلف هورمونی (مطابق جدول ۱) کشت شد. پس از ۲ ماه صفاتی نظیر تعداد ساقه باززا شده، طول ساقه، تعداد ریشه و طول ریشه اندازه‌گیری و یادداشت‌برداری شد.

تجزیه و تحلیل آماری

طرح آماری مورد استفاده در این تحقیق، آزمایش فاکتوریل در قالب طرح پایه کاملاً تصادفی بوده‌است. تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SAS و مقایسه میانگین‌ها با استفاده از نرم‌افزار MSTAT-C انجام گردید و قبل از انجام آنالیز واریانس، نرمال بودن داده‌ها مورد بررسی قرار گرفت. برای انجام آزمون مقایسه میانگین‌ها از آزمون چند دامنه‌ای دانکن استفاده شد.

نتایج

بررسی فرایند کالوس‌زایی

به‌منظور باززایی گیاه شاهدانه، ریزنمونه‌های برگ و هیپوکوتیل روی محیط کشت پایه MS جامد حاوی غلظت‌های مختلفی از دو هورمون BA و TDZ به تنهایی و یا در ترکیب با هورمون IBA قرار گرفتند (شکل ۱). در این تحقیق، در مجموع از ۲۴ ترکیب هورمونی مختلف استفاده شد. غلظت هورمون‌ها طوری انتخاب شده بود که دامنه وسیعی را دربر گرفته و امکان باززایی مستقیم و غیرمستقیم وجود داشته باشد. برخلاف انتظار، تمامی غلظت‌های هورمونی مورد استفاده حتی در غلظت پایین (۰/۱ میلی‌گرم در لیتر)، به نوعی تولید کالوس کردند. اولین واکنش‌ها به تشکیل کالوس در ریزنمونه‌ها پس از ۷ روز مشاهده شد. پس از بررسی‌های آماری، نتایج نشان داد که بجز تیمار ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر TDZ به همراه ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر IBA، تمام ترکیب‌های هورمونی باعث القای کالوس‌زایی در همه ریزنمونه‌ها می‌شوند. در این تحقیق برهم‌کنش اثر غلظت تنظیم‌کننده‌های رشد و ریزنمونه معنی‌دار شد و مشخص گردید که مقدار مناسب غلظت و ترکیب تنظیم‌کننده‌های رشد با توجه به نوع ریزنمونه تغییر می‌کند و ریزنمونه‌ها نسبت به غلظت‌های مختلف و ترکیب تنظیم‌کننده‌ها واکنش متفاوتی نشان می‌دهند.

جدول ۱- ترکیب‌های هورمونی مورد استفاده برای باززایی گیاه شاهدانه

IBA	BA	IBA	TDZ
۰	۰/۱	۰	۰/۱
۰	۰/۲	۰	۰/۲
۰	۰/۵	۰	۰/۵
۰	۱	۰	۱
۰	۲	۰	۲
۰	۳	۰	۳
۰/۵	۰/۱	۰/۵	۰/۱
۰/۵	۰/۲	۰/۵	۰/۲
۰/۵	۰/۵	۰/۵	۰/۵
۰/۵	۱	۰/۵	۱
۰/۵	۲	۰/۵	۲
۰/۵	۳	۰/۵	۳

شکل ۱- مراحل بهینه سازی کالوس در شاهدانه (*Cannabis sativa*)

الف) جوانه‌دار کردن بذرها در محیط کشت MS، ب) گیاهچه بدست آمده بعد از ۳۰ روز، ج) کالوس‌زایی در ریزنمونه برگ پس از گذشت ۱۰ روز، د) کالوس‌زایی در ریزنمونه هیپوکوتیل پس از گذشت۱۰ روز، ه) کالوس‌زایی در ریزنمونه برگ در محیط کشت حاوی TDZ،

و) باززایی در ریزنمونه هیپوکوتیل در محیط کشت حاوی BA

جدول ۲- تجزیه واریانس برای صفات حجم و وزن تر کالوس در ترکیب هورمونی BA

منبع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات	
		حجم کالوس	وزن تر کالوس
BA	۵	۸/۸۱ **	۳/۳۳ **
IBA	۱	۶۹/۵۹ **	۳۸/۷۸ **
Explant	۱	۶۶/۱۵ **	۲۶/۹۶ **
BA×IBA	۵	۱۵/۹۱ **	۲/۷۸ **
BA×Explant	۵	۹/۱۹ **	۲/۱۴ **
IBA×Explant	۱	۲/۰۱ *	۲/۳۳ **
BA×IBA×Explant	۵	۱۱/۲۹ **	۳/۷۹ **
خطا (**Error**)	۴۸	۰/۳۳	۰/۱۱
کل (**Total**)	۷۱		

** و *: معنی‌دار در سطح احتمال ۱٪ و ۵٪

در بررسی اثر هورمون BA (۰/۱، ۰/۲، ۰/۵، ۱، ۲، ۳ میلی‌گرم در لیتر) به تنهایی و یا در ترکیب با هورمون IBA، همان‌گونه که در جدول ۲ آورده شده‌است، منبع ریزنمونه از نظر مقدار کالوس تولیدی، در سطح ۱٪ معنی‌دار شده و این بیانگر تفاوت قدرت کالوس‌زایی بین دو بافت برگ و هیپوکوتیل است. همچنین در بررسی اثر هورمون TDZ (۰/۱، ۰/۲، ۰/۵، ۱، ۲، ۳ میلی‌گرم در لیتر) به تنهایی و یا در ترکیب با هورمون IBA، همان‌گونه که جدول ۳ نشان می‌دهد، نیز منبع ریزنمونه از نظر مقدار کالوس تولید شده، در سطح ۱٪ معنی‌دار شده و بیانگر تفاوت قدرت کالوس‌زایی بین دو بافت برگ و هیپوکوتیل می‌باشد. در هر دو آزمایش برهم‌کنش اثر غلظت تنظیم‌کننده‌ها و ریزنمونه معنی‌دار شد و مشخص شد که مقدار مناسب غلظت و ترکیب دو تنظیم‌کننده در هر دو آزمایش (BA±IBA و TDZ±IBA) با توجه به نوع ریزنمونه تغییر می‌کند و ریزنمونه‌ها نسبت به غلظت‌های مختلف و ترکیب دو تنظیم‌کننده، واکنش‌های متفاوتی بروز می‌دهند.

اثر هورمون BA به تنهایی یا در ترکیب با هورمون IBA بر حجم، وزن تر و خشک کالوس تولیدی

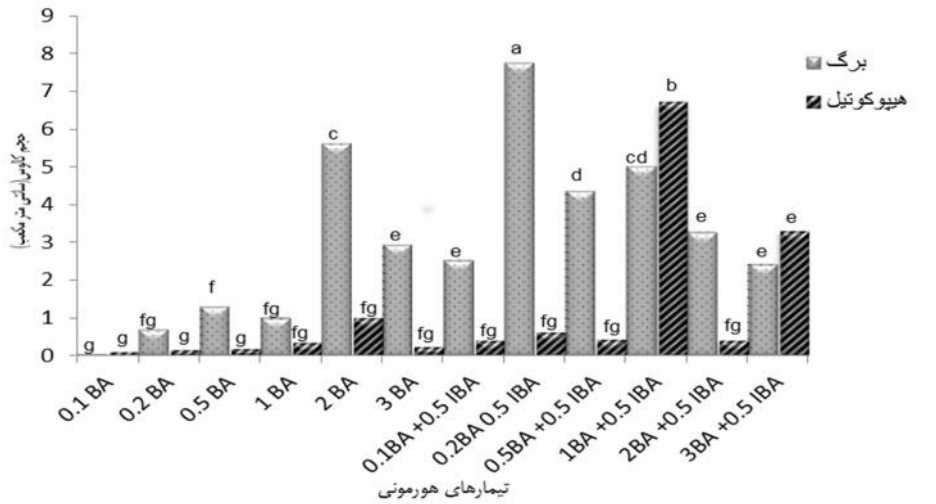
در تأثیر هورمون BA به تنهایی بر تشکیل کالوس در هر دو ریزنمونه، بیشترین مقدار کالوس از لحاظ حجم، با کشت ریزنمونه برگ بر روی محیط کشت MS حاوی ۲ میلی‌گرم در لیتر از این هورمون تولید شد. کمترین میزان حجم کالوس تولیدی نیز در همین ریزنمونه در غلظت ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر بدست آمد. بین ریزنمونه‌های مورد استفاده تفاوت معنی‌داری در سطح ۱٪ وجود داشت. در ریزنمونه برگ بیشترین حجم کالوس تولیدی به‌ترتیب در تیمار ۲ میلی‌گرم در لیتر و ۳ میلی‌گرم در لیتر از این هورمون مشاهده شد. در مورد ریزنمونه هیپوکوتیل با افزایش غلظت هورمونی BA از ۰/۱ به ۲ میلی‌گرم در لیتر، حجم کالوس تولیدی با شیب ملایمی افزایش یافته و به بیشترین مقدار خود رسید. با افزایش غلظت هورمون BA به ۳ میلی‌گرم در لیتر، حجم کالوس تولیدی کاهش یافت (شکل ۲).

جدول ۳- تجزیه واریانس برای صفات حجم و وزن تر کالوس در ترکیب هورمونی TDZ

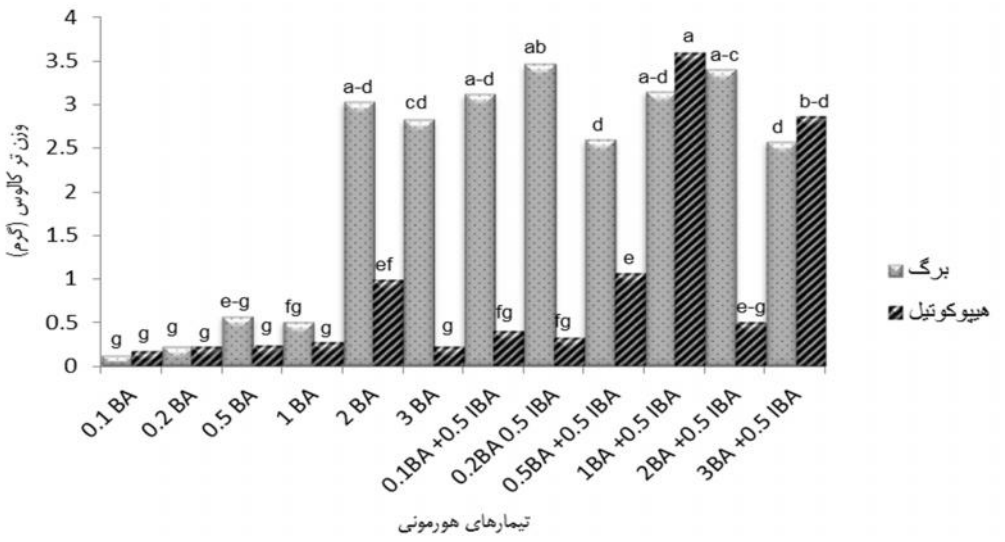
منبع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات	
		حجم کالوس	وزن تر کالوس
TDZ	۵	۲۰/۲۲ **	۴ **
IBA	۱	۱۵/۳ *	۰/۹۱ *
Explant	۱	۲۹۸/۲۵ **	۷۳ **
TDZ×IBA	۵	۷/۰۱ **	۱/۶۱ **
TDZ×Explant	۵	۱۵/۲۸ **	۲/۱۶ **
IBA×Explant	۱	۱/۶۶ ns	۰/۰۱ ns
TDZ×IBA×Explant	۵	۵/۱ *	۱/۱۲ **
خطا (**Error**)	۴۸	۱/۰۵	۰/۰۹
کل (**Total**)	۷۱		

** و *: معنی‌دار در سطح احتمال ۱٪ و ۵٪

بیشترین مقدار وزن تر کالوس با کشت ریزنمونه برگ بر روی محیط کشت MS حاوی ۲ میلی‌گرم در لیتر هورمون BA و کمترین میزان وزن تر کالوس تولیدی در غلظت هورمونی ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر BA در همین ریزنمونه بدست آمد. تفاوت معنی‌داری بین ریزنمونه‌های مورد استفاده در این آزمایش در سطح ۱٪ وجود داشت. تحت تأثیر این تیمار هورمونی، در هر دو ریزنمونه برگ و هیپوکوتیل بیشترین وزن تر کالوس در غلظت ۲ میلی‌گرم در لیتر و کمترین وزن تر کالوس در غلظت ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر هورمون BA مشاهده شد (شکل ۳).



شکل ۲- بررسی تأثیر ترکیب‌های مختلف هورمون BA بر میزان تشکیل کالوس



شکل ۳- بررسی تأثیر ترکیب‌های مختلف هورمون BA بر میزان وزن تر کالوس

ترکیب هورمون IBA در غلظت‌های مختلف هورمون BA، تأثیر شگرفی در بهبود حجم کالوس هر دو ریزنمونه داشت. به‌طوری که در بیشتر غلظت‌های هورمون BA، بجز دو غلظت ۲ و ۳ میلی‌گرم در لیتر در ریزنمونه برگ و ۲ میلی‌گرم در لیتر در ریزنمونه هیپوکوتیل، افزودن IBA حجم کالوس را به‌طور قابل ملاحظه‌ای افزایش داد. با اعمال تیمار IBA، در بین ریزنمونه‌های مورد استفاده در این تحقیق به‌ترتیب بیشترین حجم کالوس مربوط به ریزنمونه برگ، در غلظت هورمونی ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر BA به همراه ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر IBA بود و کمترین حجم کالوس مربوط به ریزنمونه هیپوکوتیل، در غلظت‌های هورمونی ۰/۱ و ۲ میلی‌گرم در لیتر BA به همراه ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر IBA بود (شکل ۲).

به‌طور مشابهی افزودن تیمار هورمونی IBA به محیط کشت حاوی هورمون BA تأثیر قابل‌توجهی در افزایش وزن تر کالوس‌های تولیدی در هر دو ریزنمونه داشت، به‌طوری که در ریزنمونه برگ افزودن IBA به محیط کشت سبب افزایش معنی‌داری در تمامی غلظت‌های هورمونی BA گردید و در ریزنمونه هیپوکوتیل نیز تنها در غلظت‌های ۱ و ۳ میلی‌گرم در لیتر BA به همراه ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر IBA اختلاف معنی‌داری مشاهده شده‌است. در مجموع، بیشترین وزن تر کالوس و کمترین وزن تر کالوس در تیمارهای ۱ میلی‌گرم در لیتر هورمون BA به همراه ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر IBA و ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر هورمون BA به همراه ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر IBA، در ریزنمونه هیپوکوتیل مشاهده شده‌است (شکل ۳). در مورد وزن خشک کالوس‌های تولیدی از ریزنمونه‌ها، در ریزنمونه برگ، بیشترین وزن خشک کالوس مربوط به تیمار هورمونی ۲ میلی‌گرم در لیتر هورمون BA به همراه ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر هورمون IBA و کمترین میزان وزن خشک کالوس در تیمارهای هورمونی ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر و ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر هورمون BA بدست آمده‌است. در ریزنمونه هیپوکوتیل نیز بیشترین وزن خشک کالوس در تیمار هورمونی ۱ میلی‌گرم در لیتر هورمون BA به همراه IBA و کمترین میزان وزن خشک کالوس در تیمارهای ۰/۱، ۰/۲، ۲ و ۳ میلی‌گرم در لیتر هورمون BA مشاهده شده‌است.

جدول ۴– نتایج حاصل از کشت قطعات گیاه شاهدانه در محیط **MS** حاوی غلظت‌های هورمون **BA**

نوع تیمار و غلظت‌های هورمونی	نوع جدا کشت	بافت کالوس	رنگ کالوس	حجم کالوس (cm^3)	وزن تر کالوس (**gr**)	تعداد ریشه
۰/۱ BA	برگ	سخت متراکم	قهوه‌ای	۰/۰۱ g	۰/۱۳ g	–
	هیپوکوتیل	نرم متراکم	کرم	۰/۱۳ g	۰/۱۸ g	–
۰/۲ BA	برگ	نرم متراکم	کرم قهوه‌ای	۰/۶۸ fg	۰/۲۴ g	–
	هیپوکوتیل	نرم متراکم	کرم قهوه‌ای	۰/۱۵ g	۰/۲۴ g	–
۰/۵ BA	برگ	سخت	قهوه‌ای	۱/۲۹ f	۰/۵۸ e-g	–
	هیپوکوتیل	نرم متراکم	کرم قهوه‌ای	۰/۱۷ g	۰/۲۵ g	–
۱ BA	برگ	نرم متراکم	کرم قهوه‌ای	۱ fg	۰/۵۲ f-g	–
	هیپوکوتیل	نرم آبدار	کرم	۰/۳۴ fg	۰/۲۹ g	–
۲ BA	برگ	نرم متراکم	قهوه‌ای سبز	۵/۶۳ c	۳/۰۳ a-d	–
	هیپوکوتیل	نرم آبدار	کرم	۱ fg	۱ ef	–
۳ BA	برگ	نرم متراکم	کرم سبز	۲/۹۳ e	۲/۸۴ cd	–
	هیپوکوتیل	نرم متراکم	کرم سبز	۰/۲۳ fg	۰/۲۴ g	–
۰/۱ BA+۰/۵ IBA	برگ	نرم آبدار	کرم سبز	۲/۵۳ e	۳/۱۲ a-d	–
	هیپوکوتیل	نرم متراکم	کرم قهوه‌ای	۰/۴ fg	۰/۴۱ fg	۴ bc
۰/۲ BA+۰/۵ IBA	برگ	نرم متراکم	سبز روشن	۷/۷۵ a	۳/۴۶ ab	۱۳/۳ a
	هیپوکوتیل	نرم متراکم	کرم سبز	۰/۶۲ fg	۰/۳۴ fg	۱/۷ cd
۰/۵ BA+۰/۵ IBA	برگ	نرم متراکم	کرم سبز	۴/۳۵ d	۲/۶ d	۵ b
	هیپوکوتیل	نرم متراکم	کرم قهوه‌ای	۰/۴۲ fg	۱/۰۷ e	۰/۷ de
۱ BA+۰/۵ IBA	برگ	نرم متراکم	کرم سبز	۵ cd	۳/۱۵ a-d	۳/۷ bc
	هیپوکوتیل	نرم متراکم	کرم سبز	۶/۷ b	۳/۵۹ a	–
۲ BA+۰/۵ IBA	برگ	نرم متراکم	کرم سبز	۳/۲۷ e	۳/۴ a-c	–
	هیپوکوتیل	نرم متراکم	کرم	۰/۳۷ fg	۰/۵۱ e-g	–
۳ BA+۰/۵ IBA	برگ	نرم متراکم	سبز کرم	۲/۴۲ e	۲/۵۸ d	۰/۷ de
	هیپوکوتیل	نرم آبدار	کرم	۳/۳ e	۲/۹ b-d	–

اثر هورمون TDZ به تنهایی یا در ترکیب با هورمون IBA بر حجم، وزن تر و خشک کالوس تولیدی

در تأثیر هورمون TDZ به تنهایی بر تشکیل کالوس در هر دو ریزنمونه، بیشترین مقدار کالوس با کشت ریزنمونه برگ بر روی محیط کشت MS حاوی ۲ میلی گرم در لیتر از این هورمون تولید شد. کمترین میزان حجم کالوس تولیدی نیز در ریزنمونه هیپوکوتیل در غلظت ۰/۱ میلی گرم در لیتر مشاهده شد. در ریزنمونه

برگ با افزایش غلظت هورمونی از ۰/۱ به ۳ میلی‌گرم در لیتر روند نامنظم در حجم کالوس تولیدی دیده شد. به‌طوری که بیشترین و کمترین میزان حجم کالوس به ترتیب در تیمار ۲ میلی گرم در لیتر و ۰/۵ میلی گرم در لیتر از این هورمون در کل ریزنمونه‌های تولیدی مشاهده شد. اما در مورد ریزنمونه هیپوکوتیل اختلاف چشمگیری در سطوح مختلف هورمونی در میزان حجم کالوس تولیدی مشاهده نشد، به‌طوری که بیشترین حجم کالوس تولید شده در تیمار ۰/۵ میلی گرم در لیتر و کمترین آن در تیمار ۰/۱ میلی گرم در لیتر مشاهده شده‌است (شکل ۴).

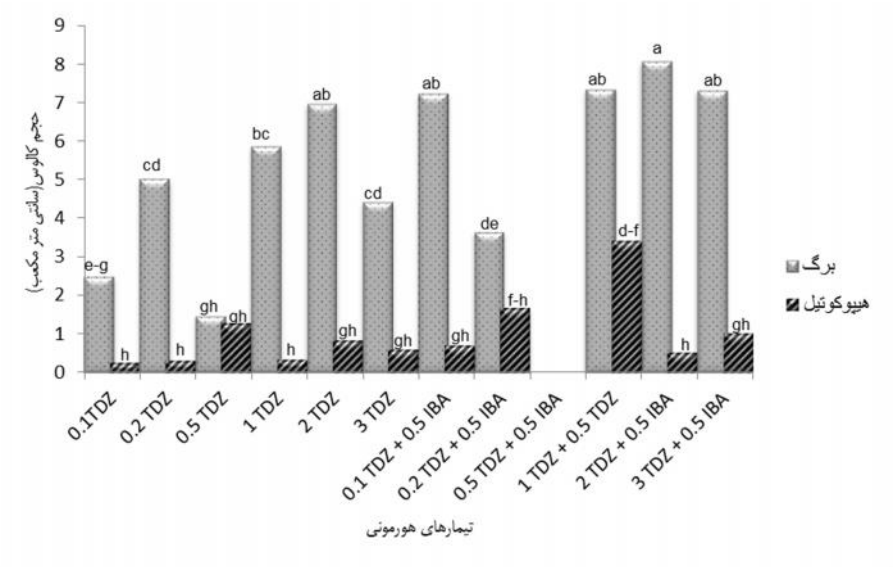
در مورد تأثیر هورمون TDZ بر وزن تر کالوس نیز، نتایج حاصل از جدول آنالیز واریانس، اثر ریزنمونه‌ها روی وزن تر کالوس‌های بدست آمده نشان داد که وزن تر کالوس‌های حاصل نسبت به هم از نظر آماری اختلاف معنی داری دارند (p<۰/۰۱) (جدول ۲). در محیط کشت MS حاوی هورمون TDZ به تنهایی، بیشترین مقدار وزن تر کالوس در غلظت هورمونی ۱ میلی‌گرم در لیتر هورمون TDZ، در ریزنمونه برگ و کمترین میزان وزن تر کالوس تولیدی در غلظت هورمونی ۰/۲ میلی گرم در لیتر TDZ در ریزنمونه هیپوکوتیل بدست آمده است. در مورد ریزنمونه برگ، بیشترین وزن تر کالوس در تیمار هورمونی ۱ میلی‌گرم در لیتر TDZ به همراه ۰/۵ میلی گرم در لیتر IBA بود و کمترین وزن تر کالوس در تیمار هورمونی ۰/۵ میلی گرم در لیتر هورمون TDZ مشاهده شد. در مورد ریزنمونه هیپوکوتیل نیز بیشترین وزن تر کالوس در تیمار هورمونی ۱ میلی گرم در لیتر TDZ به همراه ۰/۵ میلی گرم در لیتر IBA بود و کمترین وزن تر کالوس در تیمار هورمونی ۰/۲ میلی گرم در لیتر هورمون TDZ مشاهده شد (شکل ۵).

در این آزمایش نیز با قرار دادن مقدار ثابتی از IBA در کنار سطوح مختلف BA، بر میزان حجم کالوس تولیدی در هر دو ریزنمونه افزوده شد. بیشترین حجم کالوس مربوط به ریزنمونه برگ، در غلظت هورمونی ۲ میلی‌گرم در لیتر TDZ به همراه ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر IBA بود و کمترین حجم کالوس مربوط به ریزنمونه هیپوکوتیل، در غلظت هورمونی ۲ میلی گرم در لیتر TDZ به همراه ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر IBA بود. لازم به‌ذکر است که تیمار هورمونی ۰/۵ میلی گرم در لیتر TDZ به همراه IBA در هر دو ریزنمونه کالوسی تولید نکرد (شکل ۴).

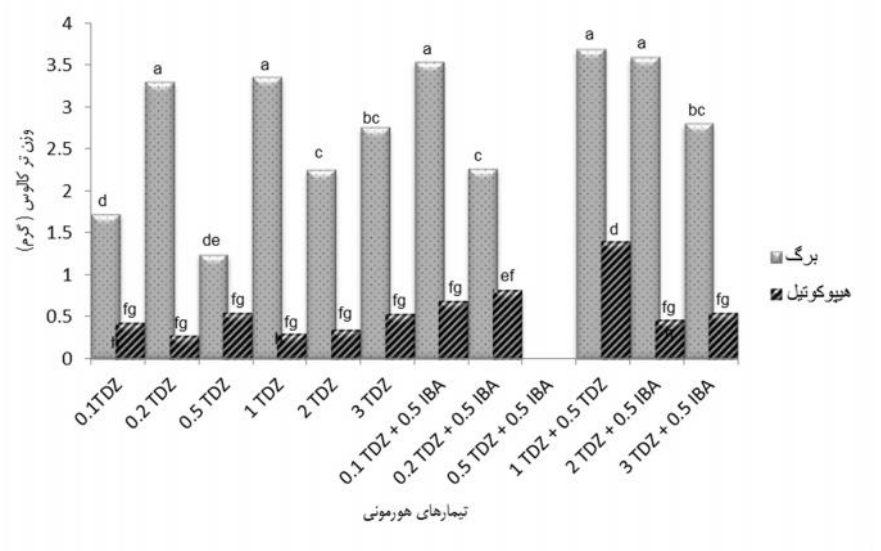
بنابراین با افزودن تیمار هورمونی IBA به محیط کشت حاوی هورمون TDZ اختلاف معنی‌داری در افزایش وزن تر کالوس‌های تولیدی در کل ریزنمونه‌ها مشاهده نشده‌است، به‌طوری که بیشترین وزن تر کالوس و کمترین وزن تر کالوس به ترتیب در تیمارهای ۱ میلی گرم در لیتر هورمون TDZ به همراه ۰/۵ میلی گرم در لیتر IBA، در ریزنمونه برگ و ۲ میلی گرم در لیتر هورمون TDZ به همراه ۰/۵ میلی گرم در لیتر IBA، در ریزنمونه هیپوکوتیل مشاهده شده‌است (شکل ۵).

در مجموع، در بین ریزنمونه‌های مختلف و تیمارهای هورمونی مورد استفاده در آزمایش دوم، بیشترین حجم کالوس تولیدی در غلظت هورمونی ۲ میلی گرم در لیتر هورمون TDZ به همراه ۰/۵ میلی گرم در لیتر IBA، در ریزنمونه برگ مشاهده شد و کمترین میزان حجم کالوس تولیدی در ریزنمونه ۰/۱ میلی گرم در لیتر هورمون TDZ، در ریزنمونه برگ مشاهده شد (شکل ۴).

در مورد وزن خشک کالوس‌های تولیدی از ریزنمونه‌ها، در ریزنمونه برگ، بیشترین وزن خشک کالوس مربوط به تیمار هورمونی ۲ میلی گرم در لیتر هورمون TDZ به همراه ۰/۵ میلی گرم در لیتر هورمون IBA بود و کمترین میزان وزن خشک کالوس در تیمارهای هورمونی ۰/۵ میلی گرم در لیتر هورمون TDZ بدست آمده‌است. در ریزنمونه هیپوکوتیل نیز بیشترین وزن خشک کالوس در تیمار هورمونی ۱ میلی‌گرم در لیتر هورمون TDZ به همراه IBA و کمترین میزان وزن خشک کالوس در تیمارهای ۰/۲ و ۱ میلی گرم در لیتر هورمون TDZ مشاهده شده است.



شکل ۴- بررسی تأثیر ترکیب‌های مختلف هورمون TDZ بر میزان تشکیل کالوس



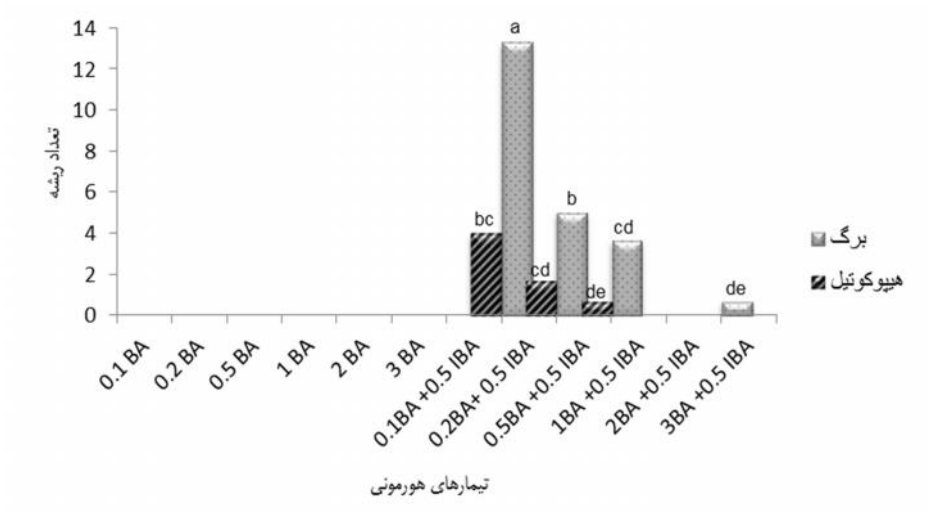
شکل ۵- بررسی تأثیر ترکیب‌های مختلف هورمون TDZ بر میزان وزن تر کالوس

جدول ۵- نتایج حاصل از کشت قطعات گیاه شاهدانه در محیط MS حاوی غلظت‌های هورمون TDZ

نوع تیمار و غلظت‌های هورمونی	نوع جدا کشت	بافت کالوس	رنگ کالوس	حجم کالوس (cm3)	وزن کالوس (gr)	تعداد ریشه
۰/۱ TDZ	برگ	نرم متراکم	کرم سبز	۲/۵۱ e-g	۱/۷۳ d	–
	هیپوکوتیل	نرم آبدار	کرم	۰/۳ h	۰/۴۴ fg	–
۰/۲ TDZ	برگ	نرم متراکم	کرم سبز	۵/۰۳ cd	۳/۳۱ a	–
	هیپوکوتیل	نرم متراکم	کرم سبز	۰/۳۳ h	۰/۲۸ fg	–
۰/۵ TDZ	برگ	نرم متراکم	کرم سبز	۱/۴۸ gh	۱/۲۵ de	–
	هیپوکوتیل	نرم متراکم	کرم سبز	۱/۳ gh	۰/۵۶ fg	–
۱ TDZ	برگ	نرم متراکم	کرم سبز	۵/۸۸ bc	۳/۳۷ a	–
	هیپوکوتیل	نرم آبدار	کرم	۰/۳۶ h	۰/۳۱ fg	–
۲ TDZ	برگ	نرم متراکم	قهوه‌ای سبز	۷ ab	۲/۲۶ c	–
	هیپوکوتیل	نرم متراکم	سبز کرم	۰/۸۵ gh	۰/۳۶ fg	–
۳ TDZ	برگ	نرم متراکم	کرم سبز	۴/۴۴ cd	۲/۲۶ bc	–
	هیپوکوتیل	نرم متراکم	کرم سبز	۰/۶ gh	۰/۳۶ fg	–
۰/۱ TDZ +۰/۵ IBA	برگ	نرم متراکم	سبز کرم	۷/۲۵ ab	۳/۵۴ a	–
	هیپوکوتیل	نرم آبدار	کرم	۰/۷۳ gh	۰/۷ f	–
۰/۲ TDZ +۰/۵ IBA	برگ	نرم متراکم	سبز کرم	۳/۷ de	۲/۲۷ c	–
	هیپوکوتیل	نرم متراکم	کرم سبز	۱/۷ f-h	۰/۸۲ ef	–
۰/۵ TDZ +۰/۵ IBA	برگ	–	–	۰ h	۰ g	–
	هیپوکوتیل	–	–	۰ h	۰ g	–
۱ TDZ +۰/۵ IBA	برگ	نرم متراکم	کرم سبز	۷/۳۶ ab	۳/۷۰ a	–
	هیپوکوتیل	نرم متراکم	کرم سبز	۳/۴۳ d-f	۱/۴ d	–
۲ TDZ +۰/۵ IBA	برگ	نرم متراکم	سبز کرم	۸/۱ a	۳/۶ a	–
	هیپوکوتیل	نرم متراکم	قهوه‌ای	۰/۵۴ h	۰/۴۷ fg	–
۳ TDZ +۰/۵ IBA	برگ	نرم متراکم	سبز کرم	۷/۳۲ ab	۲/۸۱ b	–
	هیپوکوتیل	نرم متراکم	قهوه‌ای	۱/۰۲ gh	۰/۵۵ fg	–

بررسی تأثیر هورمون‌های مختلف در ساقه‌زایی و ریشه‌زایی

قطعات ریزنمونه برگ و هیپوکوتیل بعد از قرار گرفتن در محیط‌های هورمونی ذکر شده (مطابق جدول ۱) پس از تشکیل کالوس، در همان محیط‌های کشت شروع به اندام‌زایی (ساقه و ریشه) کردند. تحت تأثیر سطوح مختلف تیمار هورمونی BA و IBA در غلظت‌های ۲ میلی گرم در لیتر به تنهایی، ۰/۱ میلی گرم در لیتر به همراه ۰/۵ میلی گرم در لیتر IBA و ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر به همراه ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر IBA بازززایی غیرمستقیم در ریزنمونه هیپوکوتیل انجام شد. میزان باززایی ساقه در غلظت ۰/۲ میلی گرم BA به همراه ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر IBA نسبت به سایر غلظت‌های هورمونی بهتر بوده‌است. بالاترین میزان طول ساقه‌های باززا شده نیز در غلظت ۰/۲ میلی‌گرم BA به همراه ۰/۵ میلی گرم در لیتر IBA بدست آمد. تحت تیمار هورمونی TDZ در هیچ یک از ریزنمونه‌ها فرایند ساقه‌زایی مشاهده نشده است. ریشه‌زایی نیز در کالوس های تولید شده تحت همان تیمارهای هورمونی ایجاد شد. به‌طوری که، بیشترین میزان ریشه‌زایی کالوس متعلق به تیمار ۰/۲ میلی گرم در لیتر BA به همراه ۰/۵ میلی گرم در لیتر به همراه IBA در ریزنمونه برگ بوده‌است. ریزنمونه‌ها در محیط کشت حاوی هورمون BA به تنهایی هیچگونه ریشه‌ای تولید نکرده‌اند اما با اضافه شدن مقدار ثابتی از هورمون IBA به تمام غلظت های هورمون BA ریشه‌زایی در ریزنمونه ها مشاهده شده‌است، به‌طوری که با افزایش غلظت هورمون BA از میزان ریشه‌زایی کالوس در هر دو ریزنمونه کاسته شده‌است (شکل ۶). لازم به‌ذکر است که در تمام سطوح تیمار هورمونی TDZ، در هر دو ریزنمونه ریشه‌زایی مشاهده نشده‌است.



شکل ۶- بررسی تأثیر ترکیب‌های مختلف هورمون BA بر میزان ریشه‌زایی کالوس

در مجموع، در این تحقیق بین ریزنمونه‌های مختلف و تیمارهای هورمونی مورد استفاده در هر دو آزمایش، بیشترین حجم کالوس تولیدی در هر دو ریزنمونه، در غلظت هورمونی ۲ میلی‌گرم در لیتر هورمون TDZ به همراه ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر IBA، در ریزنمونه برگ و کمترین میزان حجم کالوس تولیدی در غلظت هورمونی ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر هورمون BA، در ریزنمونه برگ مشاهده شد. بهترین و با کیفیت‌ترین کالوس‌ها در محیط کشت MS حاوی تیمار هورمونی TDZ تولید شد (جدول ۴). بیشترین وزن تر کالوس مربوط به غلظت هورمونی ۱ میلی‌گرم در لیتر

هورمون TDZ به همراه ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر IBA، در ریزنمونه برگ بود و کمترین میزان حجم کالوس تولیدی در غلظت هورمونی ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر هورمون BA، در ریزنمونه برگ مشاهده شد (جدول ۵).

بحث

در این پژوهش، بذرهای شاهدانه با استفاده از هیپوکلریت سدیم به همراه توئین ۲۰ و اتانول ۷۰٪ و کلرید جیوه ۰/۰۵٪ ضدعفونی شد. Ślusarkiewicz-Jarzina و همکاران (۲۰۰۵) مدت زمان ۱۵ دقیقه در هیپوکلرید سدیم ۵٪ را به‌عنوان بهترین روش ضدعفونی گزارش کردند. Wang و همکاران (۲۰۰۹) مدت زمان استریل بذرهای شاهدانه را ۲۰ دقیقه در هیپو کلرید سدیم ۰/۱٪ و ۱۵–۱۰ دقیقه در کلرید جیوه ۰/۱٪ گزارش کردند و در نهایت ۸ بار با آب مقطر شستشو دادند. در تحقیق حاضر اثر هورمون‌های گیاهی و ریزنمونه‌های برگ و هیپوکوتیل بر باززایی این گیاه طی دو آزمایش جداگانه بررسی و مطالعه شده‌است. در هر دو آزمایش هیچ‌یک از ریزنمونه‌ها واکنشی نسبت به باززایی از خود نشان نداده و تنها تولید کالوس نمودند و کالوس‌های تولیدی به‌راحتی ریشه‌زایی کردند اما باززایی در آنها انجام نشده‌است. در تحقیقی که Ślusarkewicz-Jarzina و همکاران (۲۰۰۵) روی ارقام مختلف از شاهدانه کردند، بیشترین کالوس‌زایی و ریشه‌زایی کالوس را در ریزنمونه برگ بدست آوردند، اما هیچ باززایی از ریزنمونه‌شان انجام نشده است که با نتایج بدست آمده در این تحقیق مطابقت داشت. همچنین به‌طور مشابه Feeney و Punja (۲۰۰۳)، تنها ریشه‌زایی از ریزنمونه برگ را گزارش کردند و هیچ ساقه‌زایی مشاهده نکردند. همچنین گزارش کردند که کالوس‌های شاهدانه به‌راحتی ریشه تولید می‌کنند اما پاسخی برای تشکیل ساقه نمی‌دهند، که کاملاً با نتایج ما مطابقت دارد. این محققان برای باززایی گیاهچه‌های شاهدانه به‌طور مستقیم و یا غیرمستقیم از کالوس و کشت‌های سوسپانسیون با شکست مواجه شدند. در آزمایش اول (تحت غلظت‌های مختلف BA±IBA) بیشترین مقدار کالوس از لحاظ حجم، با کشت ریزنمونه برگ بر روی محیط کشت MS حاوی ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر BA به همراه ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر IBA تولید شد. کمترین میزان حجم کالوس تولیدی نیز در همین ریزنمونه در غلظت ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر BA مشاهده شد. بیشترین مقدار وزن تر کالوس نیز در بافت هیپوکوتیل و در غلظت هورمونی ۱ میلی‌گرم در لیتر BA به همراه ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر IBA و کمترین میزان وزن تر در غلظت ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر BA، در ریزنمونه برگ مشاهده شده است. در تحقیقی Christopher و Rajam (۱۹۹۴)، با استفاده از تیمار هورمونی BA در غلظت ۱۰ میلی‌گرم در لیتر، بهترین باززایی را از ریزنمونه نوک ساقه در گیاه فلفل بدست آوردند. طی پژوهشی، Echeverrigaray و همکاران (۲۰۱۰) در گونه گیاهی *S. guaranitica*، از میان هورمون‌های سیتوکنین، بیشترین باززایی را از نظر افزایش تعداد ساقه به‌ازای هر ریزنمونه در محیط‌های حاوی هورمون BA مشاهده کردند. در آزمایش دوم (تحت غلظت‌های مختلف TDZ±IBA) بیشترین مقدار کالوس با کشت ریزنمونه برگ بر روی محیط کشت MS حاوی ۱ میلی‌گرم در لیتر TDZ به همراه ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر IBA تولید شد. کمترین میزان حجم کالوس تولیدی نیز در ریزنمونه هیپوکوتیل در غلظت ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر TDZ مشاهده شد. در تحقیقی که Lata و همکاران (۲۰۰۹) روی شاهدانه انجام دادند، از قطعات گره به‌عنوان ریزنمونه استفاده کردند و بهترین تیمار برای القاء ساقه را هورمون TDZ پیشنهاد دادند. این محققان بهترین شاخه‌زایی را روی ریزنمونه گره در غلظت هورمونی ۵ و ۲ میکرو مولار TDZ بدست آوردند. در صورتی که در تحقیق ما هیچگونه باززایی تحت این تیمار هورمونی انجام‌نشده است، شاید بتوان این اختلاف را در نوع ریزنمونه و یا غلظت هورمونی بکار رفته دانست. در مجموع دو آزمایش ریزنمونه برگ در سطوح مختلف هورمون TDZ بهترین کالوس را تولید کرد. در تحقیقی که Ghadiri Sardrood و همکاران (۲۰۱۲) روی اکالیپتوس انجام دادند، در مجموع تمام ریزنمونه‌های مورد بررسی، بهترین کالوس‌زایی تحت تیمار TDZ به‌همراه

2,4-D بدست آمد و با کیفیت‌ترین کالوس‌ها از محیط‌های کشت حاوی هورمون TDZ و 2,4-D بدست آمد. همچنین Assareh (۱۹۹۸) در مورد *Eucalyptus camaldulensis* بیشترین میزان کالوس‌زایی را در محیط کشت حاوی ۰/۲۵ میلی‌گرم در لیتر TDZ به همراه ۴ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D بدست آورد.

در جمع‌بندی نهایی می‌توان گفت که با افزودن اکسین IBA به هورمون TDZ، کال‌زایی افزایش یافته است. به‌طوری‌که ریزنمونه برگ نیز نسبت به ریزنمونه هیپوکوتیل میزان کالوس بیشتری تحت ترکیب‌های هورمونی مختلف تولید کرده‌است. البته فرایند القاء ساقه در هیچیک از ریزنمونه‌ها مشاهده نشد.

سپاسگزاری

بدین‌وسیله از مسئولان محترم پژوهشکده ژنتیک و زیست‌فناوری کشاورزی طبرستان، به‌ویژه ریاست محترم آن در فراهم کردن بستری مناسب برای انجام آزمایش‌ها و سرکار خانم مهندس سیده زهرا حسینی برای مشاوره آنالیزهای آماری کمال تشکر و قدردانی را داریم.

منابع مورد استفاده

- Allen, R.S., Mille, J.A.C., Chitty, J.A., Fist, A.J., Gerlach, W.L. and Larkin, P.J., 2008. Metabolic engineering of morphinan alkaloids by over expression and RNAi suppression of salutarinol 7-O-acetyltransferase opium poppy. Plant Biotechnology Journal, 6: 22-30.
- Christopher, T. and Rajam, M.V., 1994. In vitro clonal propagation of *Capsicum* spp. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 38: 25-29.
- Davies, K.M. and Schwinn, K.E., 2003. Transcriptional regulation of secondary metabolism. Functional Plant Biology, 30(9): 913-925
- Echeverrigaray, S., Carrer, R.P. and Andrade, L.B., 2010. Micropropagation of *Salvia guaranitica* Benth through axillary shoot proliferation. Brazilian Archives of Biology and Technology, 53(4): 883-888.
- Feeney, M. and Punja, Z.K., 2003. Tissue culture and *Agrobacterium*-mediated transformation of hemp (*Cannabis sativa* L.). In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant, 39(6): 578-585.
- Ghadiri Sardrood, S., Ghamari Zare, A., Assareh, M.H., Shahrzad, Sh. and Bakhshi Khaniki, Gh., 2012. Effects of TDZ and 2,4-D growth regulators on callus production and organogenesis in *Eucalyptus rubida*. Iranian Journal of Rangelands and Forests Plant Breeding and Genetic Research, 20(2): 304-313.
- Grotenhermen, F. and Russo, E., 2002. Cannabis and Cannabinoids: Pharmacology, Toxicology, and Therapeutic Potential New York. An Imprint of the Haworth Press, 439p.
- Kosiorek, P., Hryniewicz, A., Bialuk, L., Zawadzka, A. and Winnicka, M.M., 2004. Cannabinoids alter recognition memory in rat. Polish Journal of Pharmacology, 55(5): 903-910.
- Lata, H., Chandra, S., Khan, A. and Elsohly, M., 2010. High frequency plant regeneration from leaf derived callus of high Δ9-tetrahydrocannabinol yielding *Cannabis sativa* L. Planta Medica, 76(14): 1629-1633.
- Lata, H., Chandra, S., Khan, A. and Elsohly, M., 2009. Propagation through alginate encapsulation of axillary buds of *Cannabis sativa* L. an important medicinal plant. Physiology and Molecular Biology of Plants, 15(1): 79-86.
- Pinarkara, E., Kayis, A.S., Hakki, E. and Sag, A., 2004. RAPD analysis of seized marijuana (*Cannabis sativa* L.) in Turkey. Electronic Journal of Biotechnology, 12: 1-13.
- Ślusarkiewicz-Jarzina, A., Ponitka, A. and Kaczmarek, Z., 2005. Influence of cultivar, explant source and plant growth regulator on callus induction and plant regeneration of *Cannabis sativa* L. Acta Biologica-Cracoviensia, 47(2): 145-151.
- Small, E. and Beckstead, H.D., 1973. Common cannabinoid phenotypes in 350 stocks of *Cannabis*. Lloydia Journal, 36(2): 144-165.
- Wang, R., He, L.S., Xia, B., Tong, J.F., Li, N. and Peng, F., 2009. A micropropagation system for cloning of hemp (*Cannabis sativa* L.) by shoot tip culture. Pakistan Journal of Botany, 41(2): 603-608.
- Yoshimatsu, K., Iicla, O. and Kitazawa, T., 2004. Growth characteristics of *Cannabis sativa* cultivated in a phytotron and in the field. Kokuritsu Iyakuhin Shokuhin Eisei Kenkyusho Hokoku, 122: 16-20.

Effect of explants type and plant growth regulators on *in vitro* callus induction and shoot regeneration of *Cannabis sativa* L.

M. Movahedi[1], V. Ghasemiomran[2*] and S. Torabi[3]

1- MSc. Student, Department of Plant Breeding, Faculty of Agriculture, Islamic Azad University, Science and Research Branch, Tehran, Iran
2*- Correspoundig author, Institute of Genetics and Agricultural Biotechnology Tabarestan, Agriculture and Natural Resources University of Sari, Sari, Iran, E-mail: Ghasemiomran@yahoo.com
3- Department of Plant Breeding, Faculty of Agriculture, Islamic Azad University, Science and Research Branch, Tehran, Iran

Received: August 2014 Revised: November 2014 Accepted: December 2014

Abstract

Cannabis sativa L., belonging to cannabinaceae family, is a medicinal plant that produces a diverse array of secondary metabolites. The present study aimed to optimize *in vitro* direct and indirect regeneration in this valuable plant. For this reason, leaf and hypocotyl explants from *in vitro* grown plantlets were excised and cultured on MS media containing different concentrations of BA (0.1, 0.2, 0.5, 1, 2 and 3mg/l) and TDZ (0.1, 0.2, 0.5, 1, 2 and 3mg/l) alone or in combination with 0.5 mg/l IBA. The explants reaction in all media led to formation of calli. Direct shoot regeneration from explants was not observed but shoot induction from callus was seen on MS media containing different concentrations of BA in hypocotyl explants. The highest volume of callus was formed on MS medium containing 2 mg/l TDZ+ 0.5mg/l IBA using leaf as explant. The highest wet and dry weight of callus belonged to leaf explant cultured on MS medium containing 1 mg/l TDZ+ 0.5 mg/l IBA. MS medium containing 0.5 mg/l TDZ+ 0.5 mg/l IBA produced no callus in both explants. The addition of IBA in different concentration of BA had significant effects on volume, wet and dry weight of calli in both explants whereas it had no significant effects in different concentrations of TDZ.

Keywords: Growth regulators, micropropagation explants, *Cannabis sativa* L., callus.