Plant Prod., 43(2) (2020) 255-266 ISSN (P): 2588-543X
DOI: 10.22055/ppd.2019.27548.1670 ISSN (E): 2588-5979

Effect of Different Plant Growth Regulators, Explant Types and Light on Callogenesis Traits of Medicinal Plant Nettle (*Urtica dioica* L.)

Abdolkarim Zarei[1]*, Fatemeh Salajeghe[2] and Mojahed Kamalizadeh[3]

1- ***Corresponding Author:** Associate Professor, Department of Plant Production and Genetic (Biotechnology), Faculty of Agriculture, Jahrom University, Jahrom, Iran (zarei@jahromu.ac.ir)
2- M.Sc. Graduate of Biotechnology, Faculty of Agriculture, Jahrom University, Jahrom, Iran
3- Assistant Professor, Department of Plant Production and Genetic (Biotechnology), Faculty of Agriculture, Jahrom University, Jahrom, Iran

Received: 7 November, 2018 Accepted: 6 March, 2019

Abstract

Background and Objectives

Nettle (*Urtica dioica* L.) is considered a valuable plant with high level of various beneficial phytochemical, which has been used centuries in traditional medicine. Since it contains various secondary metabolites and shows noticeable activity against different Gram-positive and Gram-negative bacteria, nettle has been identified as an appropriate choice for wider applications in the food and pharmaceutical industries in the recent years. This plant is native to Asia, Europe, Africa and North America and grows naturally in different regions of Iran. Although nettle is an important medicinal plant worldwide, there is no information about optimization of its tissue culture conditions. This study was carried out to investigate the effects of different plant growth regulators, explant types and light condition on the callogenesis properties of nettle plant under *in vitro* condition.

Materials and Methods

A factorial experiment was carried out on the base of completely randomized design with three replicates. Different explants including young leaves, old leaves, nodes and seeds of nettle plant were cultured in the solid MS medium supplemented with 30 g l^{-1} sucrose and different concentrations of plant growth regulators of 2,4-D (1, 2 and 3 mg l^{-1}) and BA (0.1, 0.5 and 1 mg l^{-1}). Callus-related characteristics, including time of callus induction, callogenesis percentage, and their color and texture were analyzed. Analysis of variance was carried out by SAS software ver. 9.3.1 and mean comparison was conducted using Duncan multiple range test.

Results

According to the results, callus induction was significantly influenced by explant type. The highest callus induction was attained from young leaves, nodes and old leaves, respectively. The results also showed that callus induction and its properties were significantly influenced by light condition. Preservation of cultures in dark condition resulted in higher callus induction than light condition. In addition, the effect of plant growth regulators was significant on callus induction and its properties. The highest percentage of callus induction was obtained from young leaf explants in the medium containing 1 mg l^{-1} 2,4-D and 1 mg l^{-1} BA in dark condition followed by node explants in the same plant growth regulator treatment. However, medium supplemented

with 1 mg l^{-1} 2,4-D and 0.1 mg l^{-1} BA showed to be more effective for old leaf explants. Based on the results of this research, young leaf explants in the MS medium containing 1 mg l^{-1} 2,4-D and 1 mg l^{-1} BA in dark condition are suggested for callus induction from nettle plant.

Discussion

Type, color and amount of produced callus in different plant species are highly dependent on the genotypes, compositions of tissue culture media as well as the levels of both endogenous and exogenous plant growth regulators. Auxin and cytokinin are two main plant growth regulators playing important roles in callogenesis of different plant species. There is an interaction between the level of plant growth regulators and color of produced callus. Based on the results of present study, it seems that in the nettle plant, node explants endure a higher level of plant growth regulators and hence produce a brighter callus than the leaf segment explants when they are treated with high concentrations of these chemicals.

Keywords: 6-Benzyladenine, Callogenesis, Culture media, Factorial experiment, 2, 4-D

اثر تیمارهای مختلف تنظیم‌کننده‌های رشد، نوع ریزنمونه و روشنایی بر تولید کالوس گیاه داروئی گزنه (*Urtica dioica* L.)

عبدالکریم زارعی[1]*، فاطمه سلاجقه[2] و مجاهد کمالی‌زاده[3]

۱-***نویسنده مسئول:** دانشیار، گروه تولید و ژنتیک گیاهی (بیوتکنولوژی)، دانشکده کشاورزی، دانشگاه جهرم، جهرم، ایران (zarei@jahromu.ac.ir)

۲- دانشجوی سابق کارشناسی، گروه بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه جهرم، جهرم، ایران

۳- استادیار، گروه تولید و ژنتیک گیاهی (بیوتکنولوژی)، دانشکده کشاورزی، دانشگاه جهرم، جهرم، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۰۸/۱۶ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۱۲/۱۵

چکیده

گیاه گزنه به‌عنوان یکی از گیاهان با ارزش داروئی بوده که به علت دارا بودن ترکیبات فیتوشیمیایی با ارزش، اخیراً توجه زیادی به آن برای درمان بیماری‌های مختلف و همچنین استفاده از آن در صنایع غذایی به‌عنوان نگهدارنده شده است. در این پژوهش به منظور بهینه‌سازی شرایط کشت بافت برای القاء کالوس از بافت‌های مختلف این گیاه، اثر تیمارهای مختلف تنظیم‌کننده‌های رشد، شرایط نگهداری محیط کشت و نوع ریزنمونه بر میزان تولید کالوس آن مورد بررسی قرار گرفت. به این منظور آزمایشی به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار در سال های ۱۳۹۵-۱۳۹۶ در دانشگاه جهرم انجام گردید و ریزنمونه‌های مختلف شامل برگ‌های مسن و جوان، گره و بذر این گیاه در محیط کشت MS جامد حاوی ۳۰ گرم بر لیتر ساکارز و غلظت‌های متفاوت دو تنظیم‌کننده رشد تو-فور-دی (۱، ۲ و ۳ میلی‌گرم در لیتر) و بنزیل آدنین (۱، ۰/۵ و ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر) کشت شدند و چهار هفته پس از کشت صفاتی از قبیل درصد تولید کالوس، زمان کالوس‌دهی، بافت و رنگ کالوس‌های القایی مورد ارزیابی قرار گرفتند. بر اساس نتایج حاصله، ریزنمونه‌های مورد استفاده تفاوت معنی‌داری از نظر تولید کالوس نشان دادند، به‌طوری‌که ریزنمونه‌های برگ مسن، برگ جوان و گره قادر به تولید کالوس بودند. پاسخ ریزنمونه‌ها برای تولید کالوس با قرار گرفتن در شرایط نوری مختلف متفاوت بود به نحوی که شرایط تاریکی تأثیر بیشتری در القای کالوس و میزان رشد آن داشت. همچنین اثر تیمارهای مختلف تنظیم‌کننده رشد بر تولید کالوس ریزنمونه‌های مختلف در سطح یک درصد معنی‌دار بود، به‌طوری‌که بیشترین میزان تولید کالوس در ریزنمونه‌های برگ‌های جوان و ریزنمونه‌های گره در محیط کشت دارای یک میلی‌گرم در لیتر تو-فور-دی و یک میلی‌گرم بنزیل آدنین به‌دست‌آمد ولی در مورد برگ مسن بیشترین میزان این صفت در یک میلی‌گرم در لیتر تو-فور-دی و ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر بنزیل آدنین در شرایط تاریکی حاصل شد. در بین ریزنمونه‌های مورد استفاده، ریزنمونه‌های برگ جوان در شرایط تاریکی بیشترین درصد تولید کالوس را نشان داده و رشد کالوس بهتری داشتند. استفاده از ریزنمونه برگ جوان و تیمار یک میلی‌گرم در لیتر تو-فور-دی و یک میلی‌گرم در لیتر بنزیل آدنین و نگهداری کشت‌ها در شرایط تاریکی برای تولید کالوس از این گیاه پیشنهاد می‌گردد.

کلیدواژه‌ها: ۶-بنزیل آدنین، تو-فور-دی، طرح فاکتوریل، کالوس‌زائی، محیط کشت

مقدمه

گیاه گزنه (*Urtica dioica* L.) متعلق به راسته رزالس (Rosales) و تیره گزنه (Urticaceae) گیاهی، علفی، دو پایه، چندساله با ارتفاع ۱۰۰-۵۰ سانتی‌متر و

دارای کرک‌های گزنده می‌باشد. در ایران در مناطق مختلفی از کشور به‌صورت خودرو وجود دارد از جمله در دامنه‌های البرز در استان‌های تهران و البرز، در مناطق شمالی در مازندران و گیلان و در آذربایجان در دامنه‌های سهند، زنقاب، دیلمان و ارسباران، لرستان و در استان فارس. این گیاه ارزش دارویی قابل توجهی دارد و از زمان‌های گذشته مصارف دارویی و غذایی آن شناخته‌شده و مورد استفاده قرار گرفته است. ترکیبات این گیاه شامل اسید سالسیلیک، انواع فلاونوئیدها، سروتونین (Serotonin)، استیل کولین (Acetylcholine)، اسیدفورمیک (Formic acid) و لکوترین‌ها (Leukotriene) می‌باشد (Franciskovic et al., 2017). گزارش‌های زیادی مبنی بر مفید بودن گزنه در درمان برخی بیماری‌ها بخصوص دیابت و جلوگیری از ابتلا به برخی بیماری‌های قلبی عروقی بیان شده است. همچنین به‌علت دارا بودن خواص ضد باکتریایی بر علیه هر دو نوع باکتری‌های گرم منفی و مثبت، اخیراً استفاده از آن به‌عنوان نگهدارنده در صنایع غذایی و بهداشتی-آرایشی توجه زیادی را به خود جلب کرده است (Kregiel et al., 2018).

امروزه گیاهان داروئی به‌علت داشتن ترکیبات ثانویه باارزش اهمیت بسیار زیادی در درمان برخی بیماری‌ها پیدا کرده‌اند. در اکثر مواقع میزان متابولیت داروئی موجود در گیاه به‌صورت طبیعی کم می‌باشد. استفاده از شرایط کشت بافت گیاهی یکی از راه‌های اصلی تولید متابولیت‌های مفید گیاهان داروئی می‌باشد. با استفاده از تکنیک‌هایی از قبیل کشت بافت گیاهی، تولید کالوس و کشت سوسپانسیون سلولی می‌توان میزان متابولیت‌های داروئی خاصی را در گیاهان افزایش داد. تحقیقات فراوانی در زمینه استفاده از این تکنیک‌ها در شرایط درون شیشه، به‌عنوان سیستم جایگزین برای تولید مواد مؤثره با ارزش صورت گرفته است (Leonard et al., 2009; Siahmansour et al., 2018; Sahraroo et al., 2018). کشت کالوس از جمله روش‌های پرکاربرد کشت بافت گیاهی است که به اهداف مختلفی از جمله تولید ترکیبات داروئی با ارزش، ریزازدیادی غیرمستقیم از گیاه، افزایش تنوع ژنتیکی، تولید جنین‌های غیرجنسی و همچنین به‌عنوان ابزار مناسب برای دستکاری ژنتیکی گیاهان مختلف به کار گرفته شده است. کالوس در شرایط درون شیشه، در محیط کشت و تحت تأثیر مواد تنظیم‌کننده رشد گیاهی شکل می‌گیرد (Soltanipul et al., 2012). ساختمان کالوس، مقدار و رنگ کالوس ایجادشده در گیاهان مختلف، به ژنوتیپ، نوع ریزنمونه، میزان تنظیم‌کننده‌های درون‌زاد و برون‌زاد و همچنین ترکیب محیط کشت بستگی دارد (Kumari et al., 2006). از میان عوامل مؤثر بر تولید کالوس، تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی به‌ویژه اکسین و سیتوکنین نقش بسیار مهمی در فرایند القای کالوس دارند (Mungole et al., 2011). نوع تنظیم‌کننده رشد و غلظت‌های آن به محیط کشت و همچنین گونه گیاهی بستگی دارد (Kumari et al., 2006). تو-فور-دی (2,4-Dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D)) و بنزیل آدنین (Benzyl Adenine (BA)) به‌ترتیب از انواع اکسین‌ها و سیتوکنین‌های پرکاربرد در شرایط کشت بافت گیاهی برای القای کالوس می‌باشند، هر چند که نوع گیاه و ریزنمونه هم نقش زیادی در انتخاب نوع تنظیم‌کننده رشد گیاهی دارا می‌باشند (Chee, 1990; Iranpak et al., 2012; Jaiswal and Naryan, 1985; Leonard et al., 2009; Malamug et al., 1991; Abbasi Kajani et al., 2014; Sedaghati et al., 2015).

با توجه به این‌که تاکنون در زمینه کشت بافت گیاه گزنه تحقیقی صورت نگرفته است، سعی بر آن شد تا شرایط بهینه برای محیط کشت این گیاه مورد بررسی قرار گیرد. لذا به منظور انجام بررسی‌های بیشتر در مورد شرایط مناسب کشت بافت این گیاه در این پژوهش سعی شد اثر غلظت‌های مختلف دو تنظیم‌کننده رشد گیاهی بنزیل آدنین و تو-فور-دی، شرایط نگهداری محیط کشت و نوع ریزنمونه بر میزان تولید کالوس این گیاه بررسی گردد.

مواد و روش‌ها

گیاهان گزنه مورد آزمایش از سطح باغات شهرستان جهرم جمع‌آوری و به آزمایشگاه گروه بیوتکنولوژی دانشگاه جهرم منتقل شدند و پس از شستشوی سطحی به

سرعت توسط اتانول ۷۰ درصد به‌مدت یک دقیقه و محلول هیپوکلریت ۱/۲ درصد به‌مدت ۱۰ دقیقه و سه نوبت شستشو با آب مقطر استریل، ضدعفونی سطحی‌شده و مورد کشت قرار گرفتند. در این تحقیق از محیط کشت پایه MS (Murashige and Skoog, 1962) استفاده گردید. تنظیم‌کننده‌های رشد اکسین تو-فور-دی با غلظت‌های ۱، ۲ و ۳ میلی‌گرم در لیتر و همچنین سیتوکنین BA با غلظت‌های ۱، ۰/۵ و ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر به محیط اضافه شدند. همچنین ۳۰ گرم در لیتر ساکارز و ۷/۵ گرم در لیتر آگار به محیط افزوده شد. با استفاده از دستگاه پی اچ سنج دیجیتالی، پی اچ محیط‌های تهیه‌شده قبل از افزودن عامل ژله‌ایی‌کننده در محدوده ۵/۸-۵/۶ تنظیم گردید.

به منظور تولید کالوس قطعاتی از ریزنمونه برگ‌های تازه رشد کرده، همچنین برگ‌های کاملا توسعه‌یافته و یک گره ساقه با ابعاد متوسط یک تا یک و نیم سانتی‌متر جدا شدند و پس از زخم‌زنی پشت آن‌ها روی محیط کشت قرار گرفتند. به منظور مقابله با آلودگی باکتریایی، پس از اتوکلاو کردن محیط کشت و قبل از توزیع محیط کشت به ظروف کشت، آنتی‌بیوتیک کلرامفنیکل به میزان ۵۰ میلی‌گرم در لیتر به محیط افزوده شد. نمونه‌ها در دمای ۲۶-۲۴درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۸ روز نگهداری شدند. برای بررسی اثر نور بر تولید کالوس، برخی نمونه‌ها در جعبه تیره سر بسته قرار گرفته و برخی در شرایط نوری اتاق (۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی) قرار گرفتند.

در آزمایش اول ریزنمونه برگ جوان در شرایط نوری متفاوت تاریکی و روشنی، و نه ترکیب مختلف تنظیم‌کننده رشد با ۳ تکرار و ۷ ریزنمونه در هر پتری دیش جهت شناسایی بهترین شرایط رشد کالوس مورد بررسی قرار گرفت. این طرح در شرایط کنترل‌شده به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح پایه کاملاً تصادفی انجام شد. هر هشت روز یک مرتبه داده برداری انجام گرفت و درصد کالوس‌ها، بافت و میزان رشد آن‌ها بررسی شد و یادداشت‌برداری شد. درصد کالوس‌دهی بر اساس تعداد ریزنمونه‌هایی که در هر تیمار تولید کالوس کرده بودند محاسبه گردید. همچنین ابعاد کالوس‌ها با استفاده از کاغذهای الگوی مدرج محاسبه گردید. رنگ کالوس‌های تولیدی بر اساس رتبه دهی از ۱ تا ۷ (بر اساس میزان رنگ به‌صورت افزایشی) محاسبه گردید.

در آزمایش دوم سه تکرار از ریزنمونه‌های مختلف برگ مسن و جوان با ۷ مشاهده و ریزنمونه گره با ۵ مشاهده در هر پتری‌دیش و بیست نمونه بذری ضدعفونی‌شده در هر پتری‌یش در نه غلظت مختلف تنظیم‌کننده رشد گیاهی و به‌صورت آزمایش فاکتوریل در قالب طرح پایه کاملاً تصادفی مورد ارزیابی قرار گرفتند.

پس از ثبت داده‌ها، از نرم‌افزار SAS نسخه ۳، ۱، ۹ برای تجزیه و تحلیل داده‌ها و آزمون معنی‌داری تیمارها در سطح یک درصد استفاده شد و مقایسه میانگین داده‌ها توسط آزمون چند دامنه‌ایی دانکن انجام گرفت.

نتایج و بحث

ریزنمونه‌ها از هفته دوم بعد از کشت در محیط القای کالوس، شروع به تولید کالوس نمودند (شکل ۱). در آزمایش اول ریزنمونه‌های برگ جوان در دو شرایط مختلف تاریکی و روشنایی قرار گرفتند. بر اساس نتایج حاصله مشخص شد که اثر شرایط نگهداری رشد و غلظت تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی بر میزان تولید کالوس در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بود (جدول ۱). این بدان مفهوم است که فاکتورهای مورد مطالعه از نظر تأثیر بر روی صفت مورد مطالعه به‌صورت مستقل از یکدیگر عمل نمی‌کنند و وابسته به یکدیگر می‌باشند.

بر اساس نتایج حاصل‌شده، بدون در نظر گرفتن تیمارهای مختلف تنظیم‌کننده رشد، برگ‌های جوان گیاه گزنه در شرایط تاریکی میزان کالوس‌دهی بیشتری از شرایط روشنایی از خود نشان دادند. اثر متقابل تنظیم‌کننده رشد گیاهی و شرایط نگهداری ریزنمونه‌ها نشان داد که ریزنمونه‌های برگ جوان در تمام تیمارهای مورد استفاده شرایط تاریکی تولید کالوس بهتری نشان دادند (شکل ۲). بیشترین درصد کال‌زایی در شرایط تاریکی و روشنایی در ریزنمونه‌های تیمارشده با یک میلی‌گرم در لیتر تو-فور-دی و یک میلی‌گرم در لیتر بنزیل آدنین حاصل شد. همچنین

کالوس‌های تولیدی در شرایط روشنایی رنگ تیره‌تری نسبت به کالوس‌های حاصل‌شده در شرایط تاریکی داشتند (شکل ۳). به‌علاوه با افزایش غلظت تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی رنگ کالوس‌های تولیدی تیره‌تر شد به‌طوری‌که غلظت ۳ میلی‌گرم در لیتر تو-فور-دی کالوس‌های کاملاً قهوه‌ایی تولید نمودند (شکل ۳). برای القاء کالوس در بیشتر ریزنمونه‌های گیاهی نیاز به هر دو نوع تنظیم‌کننده‌های رشد اکسین و سیتوکنین می‌باشد.

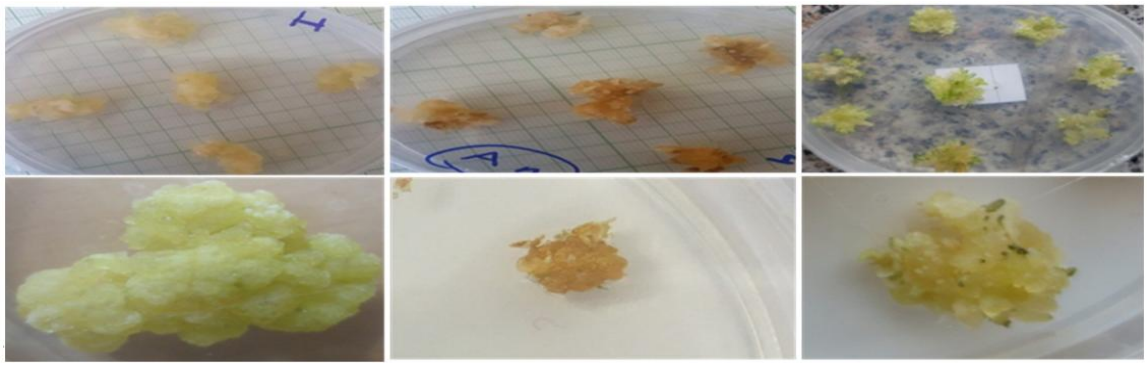

Figure 1. Callus obtained from different explants of *U. dioica*
Left: Young leaves, middle: Old leaves and right: node explants

Table 1. Effects of different concentrations of plant growth regulators in dark and light conditions on the callogenesis of young leaves of *U. dioica* plant

S.O.V.	df	Murashige and Skoog	
		Callus induction	Callus color and texture
Plant growth regulators	8	1.015**	23.685**
Culture condition	1	1.89**	3.629**
Plant growth regulators ×Culture condition	8	0.054**	2.629**
Error	36	0.0045	0.0185
C.V. (%)	-	10.61	3.53

Significant at 1% probability.

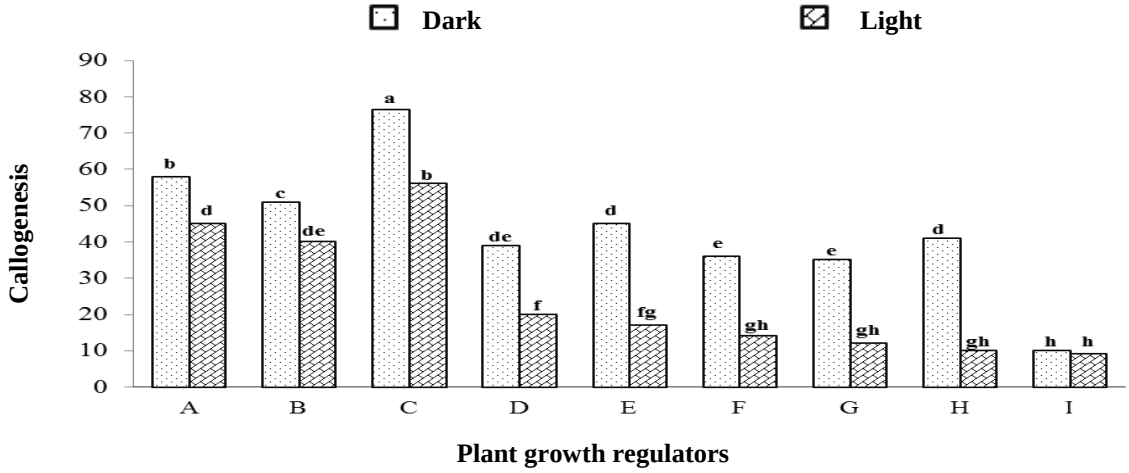

Figure 2. Reciprocal effects of culture condition in dark or light and plant growth regulators on callogenesis in *U. dioica*. Letters on horizontal axis represent type of plant growth regulators treatments as described above
A) 1 mg l^{-1} 2,4-D, 0.1 mg l^{-1} BA; B) 1 mg l^{-1} 2,4-D, 0.5 mg l^{-1} BA; C) 1 mg l^{-1} 2,4-D, 1 mg l^{-1} BA; D) 2 mg l^{-1} 2,4-D, 0.1 mg l^{-1} BA; E) 2 mg l^{-1} 2,4-D, 0.5 mg l^{-1} BA; F) 2 mg l^{-1} 2,4-D, 1 mg l^{-1} BA; G) 3 mg l^{-1} 2,4-D, 0.1 mg l^{-1} BA; H) 3 mg l^{-1} 2,4-D, 0.5 mg l^{-1} BA; I) 3 mg l^{-1} 2,4-D, 1 mg l^{-1} BA

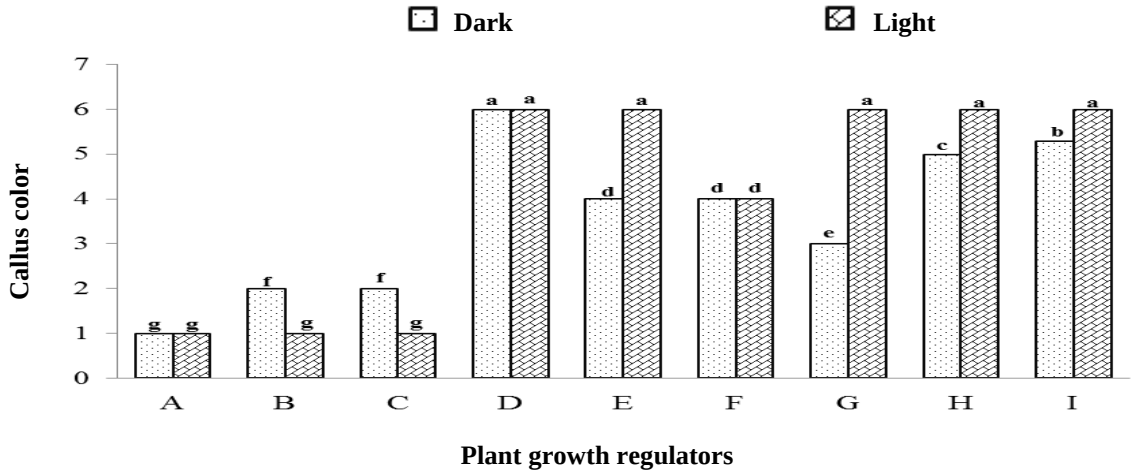

Figure 3. Reciprocal effects of culture condition in dark or light and plant growth regulators on color of callus in *U. dioica*. Letters on horizontal axis represent type of plant growth regulators treatments according to Fig. 2.

نیاز به نسبت‌های مختلف تنظیم‌کننده‌های رشد جهت القای کالوس در بسیاری از گیاهان گزارش شده است (Abbasi Kajani et al., 2014). همچنین در بررسی که بر روی ریزنمونه‌های گیاه ارس کوهی (*Juniperus excelsa*) انجام گرفت مشخص شد که تنظیم‌کننده رشد تو-فور-دی نسبت به NAA و IBA در محیط کشت MS تأثیر بیشتری در القاء کالوس داشت (Salehi Shanjani, 2003). در مطالعات متعددی اثر شرایط نوری بر میزان تولید کالوس گیاهان مختلف مورد ارزیابی قرار گرفته است که برخی از آن‌ها بیانگر این مطلب بوده اند که تیمارهای مختلف نوری تأثیر معنی‌داری در تولید کالوس گیاهان نداشته است (Soltanipul et al., 2012) و در برخی گزارش‌شده که القاء کالوس در شرایط تاریکی بهتر از شرایط روشنایی بوده است (Ameri et al., 2011; Iranpak et al., 2012; Khoramirad and Shoor, 2011). Compton (1999) در بررسی اثر نور بر ساقه‌زایی لپه‌های هندوانه بیان کرد که پیش تیمار تاریکی به‌طور معنی‌داری تعداد ریزنمونه‌هایی که تولید ساقه می کنند را افزایش داده است. نقش دقیق تاریکی هنوز کاملاً مشخص‌نشده، اما احتمال داده می‌شود که قرار دادن بافت‌های گیاهی در تاریکی، تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی و سایر ترکیبات را از حساسیت نوری حفظ می کند (Evans et al., 1981; Hartmann et al., 1997).

همچنین قرار دادن ریزنمونه‌ها به منظور جنین‌زایی سوماتیکی در تاریکی، تمایز و تقسیم سلولی را قبل از انتقال دادن بافت گیاهی به نور، تحریک می‌کند (Compton and Gray, 1993). بافت‌های گیاهی اتیوله اغلب دارای ترکیبات فنلی اکسیداتیو کمتر و همچنین بافت آوندی و دیواره‌های سلولی نازک‌تری هستند (Hartmann et al., 1997).

کمتر شدن ضخامت دیواره سلولی و ترکیبات کمتر آن ممکن است حرکت تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی را به مکان‌های باززایی ریزنمونه‌ها تسهیل کنند (Compton et al., 2004). گزارش‌های متعددی بیان کرده‌اند که تنظیم‌کننده رشد تو-فور-دی، بهترین تنظیم‌کننده رشد گیاهی نوع اکسین برای القاء کالوس از گیاهان تک‌لپه و دولپه‌ایی می‌باشد (Chee, 1990; Jaiswal and Naryan, 1985; Malamug et al., 1991; Lu et al., 1982).

بر اساس نتایج حاصله اثر نوع ریزنمونه روی درصد تولید کالوس در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بود (جدول ۲). به‌طوری‌که ریزنمونه‌های برگ جوان قابلیت بیشتری در تولید کالوس داشتند درحالی‌که ریزنمونه‌های بذر در محیط کشت هیچ تغییری نکردند. بر اساس نتایج حاصله و بدون در نظر گرفتن تیمار تنظیم‌کننده رشد گیاهی نمونه‌های برگ جوان بیشترین درصد تولید کالوس را دارا بودند و بعد از آن ریزنمونه‌های گره و سپس ریزنمونه‌های برگ مسن در رتبه‌های بعدی قرار داشتند.

Table 2. Analysis of different concentrations of hormonal treatments and explant types on callogenesis of nettle plants in dark condition

S.O.V.	df	Murashige and Skoog	
		Callus induction	Callus color and texture
Plant growth regulators	8	1.13**	14.50**
Explant	2	2.85**	27.44**
Plant growth regulators × Explant	16	0.21**	5.71**
Error	54	0.0016	0.259
C.V. (%)	-	7.52	23.30

Significant at 1% probability.

ریزنمونه‌های بذر هیچ رشدی در محیط کشت نداشتند که بیانگر این است که بذور این گیاه ممکن است دارای خفتگی بوده و یا بازدارنده‌های رشد و عدم نمو کامل بذر مانع از جوانه زدن بذر در شرایط رشد گردیده است. به هرحال با توجه به این‌که گزارشی در مورد جوانه‌زنی بذر این گیاه مشاهده نشده است، نمی‌توان با قطعیت در این مورد نظر داد و به تحقیقات بیشتر در این زمینه نیاز است. بر اساس نتایج حاصل از این پژوهش هر سه ریزنمونه رویشی استفاده‌شده قادر به تولید کالوس بودند و کالوس‌ها پس از چند مرتبه واکشت هم سالم و بدون تغییر باقی مانند که بیانگر قابلیت استفاده از این کالوس‌ها چه به‌صورت کالوس و چه در شرایط کشت سلولی برای تولید متابولیت‌های ارزشمند از این گیاه می‌باشد.

همچنین اثر متقابل نوع ریزنمونه و غلظت تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی بر میزان تولید کالوس گیاه گزنه معنی‌دار بود (شکل ۴). به عبارتی بیشترین میزان تولید کالوس (۱۰۰ درصد) در تیمارهای ۱ میلی‌گرم در لیتر تو-فور-دی و ۱ میلی‌گرم در لیتر بنزیل آدنین از ریزنمونه برگ جوان و گره حاصل شد.

برگ‌های مسن در غلظت ۱ میلی‌گرم در لیتر تو-فور-دی و ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر بنزیل آدنین بیشترین تولید کالوس را از خود نشان دادند. با افزایش غلظت تنظیم‌کننده‌های رشد میزان تولید کالوس از برگ‌های مسن به شدت کاهش یافت. همچنین در تیمارهای ۲ میلی‌گرم در لیتر تو-فور-دی و ۰/۱ و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر بنزیل آدنین، میزان تولید کالوس در ریزنمونه گره بیشتر از برگ جوان بود که ممکن است بیانگر این مطلب باشد که برای القاء کالوس از ریزنمونه‌های گره نیاز به غلظت‌های بیشتر تنظیم‌کننده رشد تو-فور-دی می‌باشد. این مشاهدات ممکن است ناشی از غلظت متفاوت تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی درونزاد در ریزنمونه‌های مختلف باشد. تأثیر متفاوت ریزنمونه‌ها و غلظت تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی در گیاهان مختلفی گزارش شده است (Sharafi et al., 2014; Ebrahimzadeh et al., 2006). به عبارتی این احتمال وجود دارد که گره برای القاء کالوس به غلظت‌های بیشتری از تنظیم‌کننده رشد اکسین نیاز دارد و یا در غلظت‌های بیشتری از تنظیم‌کننده رشد تولید کالوس را در سطح بالایی حفظ می‌کند. معمولاً بافت‌های جوان میزان بیشتری از تنظیم‌کننده‌های رشد درون‌زاد دارا می‌باشند. به عبارتی این امکان وجود دارد که میزان بیشتری از تنظیم‌کننده‌های رشد اکسین در بافت‌های جوان باعث شوند که این بافت‌ها در غلظت‌های پایین‌تر اکسین کالزایی مناسب داشته باشند و با افزایش میزان اکسین در محیط کشت، و اثر سینتژید آن با تنظیم‌کننده‌های رشد درون‌زاد گیاه، اثر بازدارندگی تنظیم‌کننده رشد به وجود آید. بهترین تیمار تنظیم‌کننده رشد و شرایط نگهداری کشت در این پژوهش مشابه با گزارش Carolina et al. (2001) در مورد گل راعی می‌باشد که بیشترین تولید کالوس را از ریزنمونه‌های کشت‌شده در حضور یک میلی‌گرم در لیتر بنزیل آدنین و یک میلی‌گرم در لیتر تو-فور-دی و در شرایط تاریکی گزارش کردند. همچنین Ayan et al. (2005) گزارش کردند که بیشترین میزان کالوس از این گیاه در تیمار یک میلی‌گرم در لیتر تو-فور-دی و کینیتین حاصل شد.

Omidi et al. (2011) گزارش کردند که تنظیم‌کننده رشد تو-فور-دی نسبت به نفتالین استیک اسید تأثیر

بیشتری بر درصد تشکیل کالوس در گیاه سرخدار دارا می‌باشد. همچنین پس از بررسی غلظت‌های ۰/۵، ۱، ۲ و ۴ میلی‌گرم در لیتر تو-فور-دی به همراه ۰/۲، ۰/۴ و ۱ میلی‌گرم در لیتر کینیتین، این محققین مشاهده کردند که بیشترین درصد تشکیل کالوس در غلظت یک میلی‌گرم در لیتر تو-فور-دی و یک میلی‌گرم در لیتر کینتین و از ریزنمونه ساقه حاص شد. به‌علاوه این محققین گزارش کردند که کالوس‌های حاصل از ساقه نرم، انعطاف‌پذیر و به رنگ کرم بودند درحالی‌که کالوس‌های حاصل از برگ بیشتر حالت فشرده، سفت و قهوه‌ایی داشتند.

بر اساس نتایج بدون در نظر گرفتن غلظت تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی، ریزنمونه‌های مختلف کالوس‌های با بافت متفاوتی تولید نمودند. رنگ کالوس‌های مختلف از سفید تا قهوه‌ایی متفاوت بود. کالوس‌های حاصل از ریزنمونه گره روشن‌ترین کالوس‌ها را تولید نمودند درحالی‌که کالوس‌های حاصل از برگ جوان تیره‌ترین کالوس را در بین ریزنمونه‌های مختلف حاصل کردند. اثر متقابل ریزنمونه‌های مختلف و غلظت‌های تنظیم‌کننده رشد گیاهی نشان داد که هر دو فاکتور مورد مطالعه در رنگ و بافت کالوس مؤثر بودند (شکل ۵).

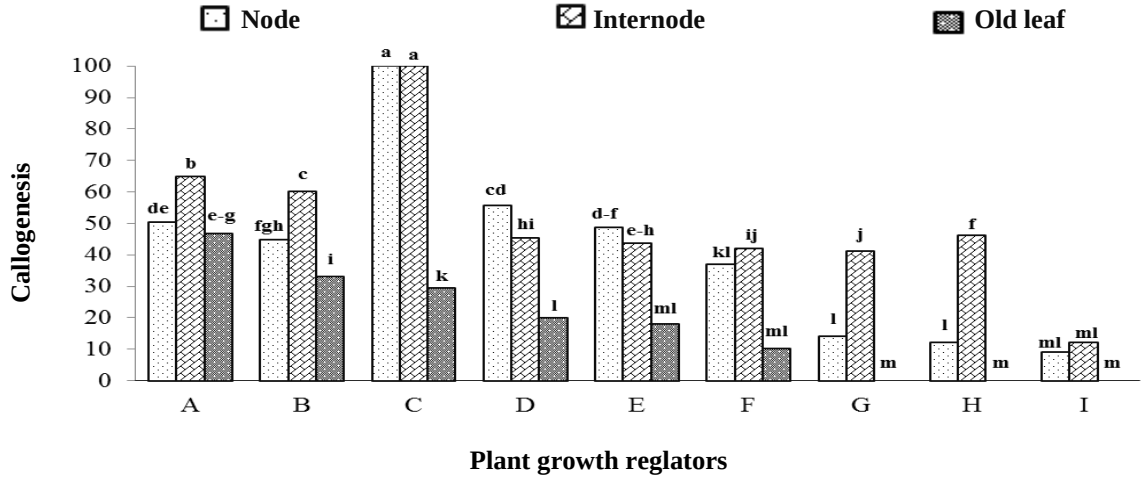

Figure 4. Effects of different explants and plant growth regulators on the callogenesis in *U. dioica*. Letters on horizontal axis represent type of plant growth regulators treatments according to Fig. 2

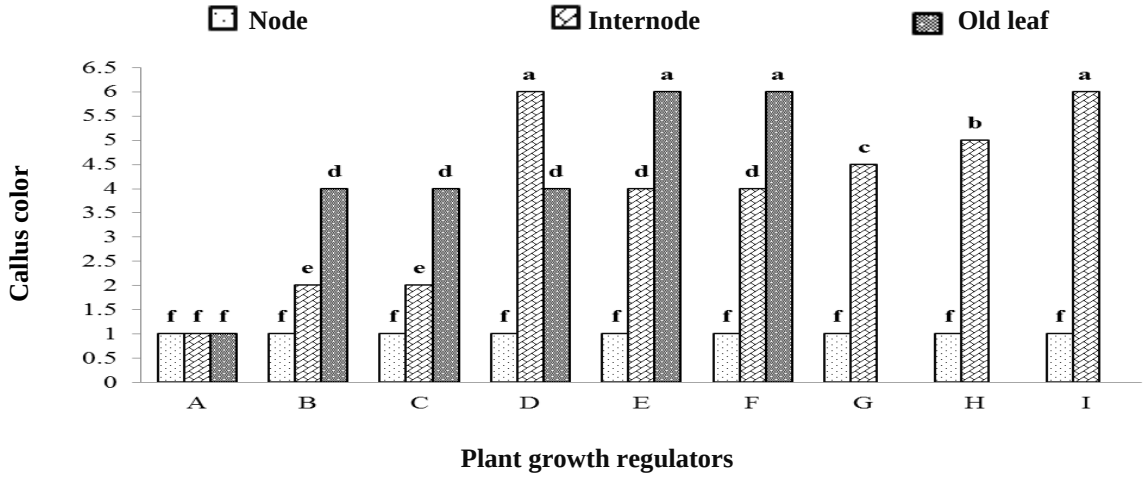

Figure 5. Effects of different explants and plant growth regulators on the color of callus in *U. dioica*. Letters on horizontal axis represent type of plant growth regulators treatments according to Fig. 2

بر اساس این نتایج کالوس‌های حاصل از گره در تیمارهای مختلف تفاوت معنی‌داری نداشتند و همگی رنگ سفید داشتند. به عبارتی غلظت‌های مختلف تنظیم‌کننده رشد گیاهی هیچ گونه تأثیری در رنگ و بافت کالوس‌های حاصله نداشت. از طرفی کالوس‌های حاصل از برگ جوان و برگ مسن در غلظت‌های پایین تنظیم‌کننده رشد رنگ روشن داشتند ولی با افزایش غلظت تنظیم‌کننده رشد رنگ آن‌ها به سمت قهوه‌ایی متمایل شد درحالی‌که تیمار ۲ میلی‌گرم در لیتر تو-فور-دی تیره‌ترین نوع کالوس‌ها را حاصل نمود. در غلظت‌های ۳ میلی‌گرم در لیتر تو-فور-دی برگ‌های مسن کالوسی تولید نکردند ولی برگ‌های جوانی که کالوس تولید نمودند هنوز رنگ تیره داشتند. بنابراین نتایج حاصل نشان داد که کالوس‌های روشن در تیمارهای پایین‌تر مربوط به ریزنمونه‌های برگ حاصل می‌شود درحالی‌که ریزنمونه گره کالوس قهوه‌ای تولید نکردند.

نوع، مقدار و رنگ کالوس ایجادشده در گیاهان مختلف به ژنوتیپ، میزان تنظیم‌کننده‌های رشد درون‌زا و برون‌زا و ترکیب محیط کشت وابسته است (Kumari et al., 2006). در میان این عوامل مؤثر، تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی به‌ویژه اکسین و سیتوکنین نقش بسیار حیاتی در فرایند القای کالوس دارند (Mungole et al., 2011). نوع تنظیم‌کننده رشد و غلظت‌های آن به محیط و خصوصاً گونه گیاهی بستگی دارد. البته نوع ریزنمونه گیاهی مورد استفاده هم می‌تواند تأثیر زیادی در غلظت‌های مورد نیاز گذارد. Karamzad et al. (2016) برای القاء کالوس از گیاه سیب‌زمینی ریزنمونه‌های برگ و گره را در غلظت‌های مختلف تو-فور-دی مورد ارزیابی قرار دادند و گزارش کردند که ریزنمونه‌های گره نسبت به برگ به غلظت بالاتری از تو-فور-دی برای القاء کالزایی نیاز داشتند (۴ میلی‌گرم در برابر ۲ میلی‌گرم در لیتر). همچنین این محققین گزارش کردند که کالوس‌های تولیدشده از ریزنمونه گره رنگ روشن‌تری از کالوس‌های حاصل‌شده از ریزنمونه برگ داشتند. به عبارتی دیگر می‌توان نتیجه گرفت که رابطه‌ایی بین غلظت تنظیم‌کننده رشد و رنگ کالوس وجود داشته باشد و از آنجایی که گره نسبت به برگ غلظت بیشتری از تنظیم‌کننده رشد را تحمل می‌کند، ممکن است تولید کالوس‌های با رنگ روشن‌تری کنند.

نتیجه‌گیری

در این پژوهش سعی شد تا با کاربرد غلظت‌های مختلف تنظیم‌کننده‌های رشد و نوع ریزنمونه، بهترین ریزنمونه و بهترین سطح تنظیم‌کننده رشد و همچنین بهترین شرایط نگهداری کشت‌ها جهت بدست آوردن بیشترین میزان کالوس پیدا شود تا بتوان از کشت کالوس و یا کشت سوسپانسیون سلولی و کاربرد القاءکننده‌های مختلف بتوان به مقدار بیشتری از ترکیبات ثانویه مفید دست یافت. نتایج حاصل از این پژوهش نشان داد که استفاده از تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی تو-فور-دی و بنزیل آدنین به‌طور کارایی قادر به القاء کالوس از سه نوع ریزنمونه برگ جوان، برگ مسن و گره گیاه گزنه می‌باشد. همچین نگهداری کشت‌ها در شرایط تاریکی تأثیر بیشتری در القاء کالوس در گیاه گزنه داشت.

سپاس‌گزاری

نویسندگان این مقاله از دانشگاه جهرم برای فراهم نمودن امکانات لازم برای انجام این پژوهش قدردانی می‌نمایند.

References

Abbasi Kajani, A., Alami Saeid, K., Daneshvar, M. H. and Mofid, M. R. (2014). Effect of growth regulators and antioxidants in the medium on in vitro callus induction in European yew (*Taxus baccata* L.). *Plant Productions*, 37(4), 1-7. [In Farsi]

Ameri, M., Lahoti, M., Bagheri A. and Sharifi, A. (2011). *Optimization of callus induction media for Citrollus lanatus L. (cv. Crismon sweet) explants by IBA and IAA hormonal treatments in In vitro*

condition. Proceeding of 7th national congress of Biotechnology, Tehran, Iran. [In Farsi]

Ayan, A. K., Cirak, C., Kevserolu K. and Sokmen A. (2005). Effects of expellant types and different concentrations of sucrose and phytohormones on plant regeneration and hypericin content in *Hypericum perforatum* L. *Turkish Journal of Agriculture*, 29(1), 197-204.

Carolina, A., Astarita L. V. and Santarem E. R. (2001). *Organogenesis in Hypericum perforatum* L. IV Encontro Latino-Americano de Biotechnologia Vegetal, Goiania, Resumos.

Chee, P. P. (1990). High frequency of somatic embryogenesis and recovery of fertile Cucumber Plants. *Horticultural Science*, 25(7), 792-793.

Compton, M. E. (1999). Dark pretreatment improves adventitious shoot organogenesis from cotyledons of diploid watermelon. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 58(1), 185-188.

Compton, M. E. and Gray D. J. (1993). Shoot organogenesis and plant regeneration from cotyledons of diploid, triploid, and tetraploid watermelon. *Journal of American Society for Horticultural Science*, 118(1), 151-157.

Compton, M. E., Gray, D. J. and Gaba, V. P. (2004). Use of tissue culture and biotechnology for the genetic improvement of watermelon. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 77(1), 231-243.

Ebrahimzadeh, M., Shaker, H., Bernard, F. and Khavarinejad, R. (2006). Effect of hormones and explant in callus induction and plant regeneration in tissue culture of *Anthurium andreanum* Var. Tropical. *Pajouhesh & Sazandegi*, 73(3), 169-176. [In Farsi]

Evans, D. A., Sharp W. R. and Flick, C. E. (1981). Plant regeneration from cell cultures. *Horticulture Review*, 3, 214-314.

Franciskovic, M., Gonzalez-Perez, R., Orcic, D., Sanchez de Medina, F., Martinez-Augustin, O., Svircev, E., Simin, N. and Mimica-Dukic, N. (2017). Chemical composition and immuno-modulatory effects of *Urtica dioica* L. (stinging nettle) extracts. *Phytotherapy Research*, 31(8), 1183-1191.

Hartmann, H. T., Kester, D. E., Davies F. T. and Geneve R. L. (1997). *Plant propagation: Principles and practices* (6th ed). Englewood Cliffs, NJ: Prentice-Hall, Inc.

Iranpak, N., Kalateh Jari, S. and Kalantari S. (2012. Effects of explant and plant growth regulators on callus induction and shoot formation in *Narcissus tazetta* L. *Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants*, 28(2), 356-369. [In Farsi]

Jaiswal, V. S. and Naryan, P. (1985). Regeneration of Plantlets from the callus of stem segments of adult plants of *Ficus religiosa* L. *Plant Cell Reports*, 4(1), 256-258.

Karamzad, Z. H., Farshadfar, M., Zebarjadi, A. R. and Zolnorian, H. (2016). Investigation of effect of different concentrations of 2, 4- D and kinetin on callus induction in potato (*Solanum tuberosum* L.) variety of agria. *Journal of Plant Research*, 28(2), 316-325. [In Farsi]

Khoramirad, M. and Shoor M. (2011). *Investigation of micro propagation of two commercial cultivars of Anthurium andraeanum under in vitro condition*. M.Sc. Thesis of Biotechnology, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad. [In Farsi]

Kregiel, D., Pawlikowska, E. and Antolak, H. (2018). Urtica spp.: Ordinary plants with extraordinary properties. *Molecules*, 23(7), 1-21.

Kumari, B. D. R., Setuu A. and Sujatha, G. (2006). Somatic embryogenesis and plant regeneration in soybean (*Glycine max*). *Indian Journal of Biotechnology*, 5(2), 243-245.

Leonard, E., Runguphan, W., Connor, S. O. and Prather K. J. (2009). Opportunity in metabolic engineering to facilitate scalable alkaloid production. *Nature Chemical Biology*, 5(5), 292-300.

Lu, C., Vasil, I. K. and Ozias-Akins, P. (1982). Somatic embryogenesis in *Zea mays* L. *Theoretical and Applied Genetics*, 75(1), 16-25.

Malamug, J. J. F., Inden, H. and Asahira, T. (1991). Plantlets regeneration and propagation from ginger callus. *Scientia Horticulturae*, 48(1-2), 89-97.

Mungole, A. J., Doifode, V. D., Kamble, R. B., Chaturvedi, A. and Zanware, P. (2011). *In vitro* callus induction and shoot regeneration in *Physalis minima* L. *Annals of Biological Research*, 2(2), 79-85.

Murashige, T. and Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiologia Planetarium*, 15(1), 473-479.

Omidi, M., Behjat Sasan, B., Naghavi, M. R., Kalate Jari, S. and Etminan, A. R. (2011). Effect of growth regulators, medium and explant on callus induction in *Taxus baccata* L. *Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants*, 27(2), 316-325. [In Farsi]

Sahraroo, A., Mirjalili, M. H., Corchete, P., Babalar, M., Fattahi Moghadam, M. R. and Zarei, A. (2018). Enhancement of rosmarinic acid production by *Satureja khuzistanica* cell suspensions: Effects of phenylalanine and sucrose. *SABRAO Journal of Breeding and Genetics*, 50(1), 25-35.

Salehi Shanjani, P. (2003). Nitrogen effect on callus induction and plant regeneration of *Juniperus excelsa*. *International Jornal of Agriculture and Biology*, 5(4), 419-422.

Sedaghati, B., Babaeian, N., Bagheri, N. and Salehian Aghblaq, H. (2015). Effect of leaf explants types and various levels of 2, 4-D on callus induction and plant regeneration in *Anthurium andreanum*. *Journal of Crop Breeding*, 7(16), 11-15. [In Farsi]

Sharafi, E., Khayymnikoei, S. M., Fotokian, M. H., Davoodi, D. and Hassanloo, T. (2014). Effect of different growth regulators levels and explants types of callogenesis and organogenesis *Hypericum perforatum* L. under *in vitro* condition. *Journal of Agricultural Biotechnology*, 5(3), 57-66. [In Farsi]

Siahmansour, S. H., Ismaili, A. and Nazarian Firouzabadi, F. (2018). Effect of different elicitor treatments on hairy root of medicinal plant poppies (*Papaver somniferum* L.). *Plant Productions*, 41(1), 29-42. [In Farsi]

Soltanipul, M. M., Mohammadi, A., Rahnema, H. and Abbaszadeh, B. (2012). Callogenesis investigation of lemon balm (*Melissa officinalis* L.). *Journal of Agronomy and Plant Breeding*, 7(1), 45-54. [In Farsi]

© 2020 by the authors. Licensee SCU, Ahvaz, Iran. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution-Non Commercial 4.0 International (CC BY-NC 4.0 license) (http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/)