القای کالوس در گیاه دارویی باباآدم (*Arctium lappa* L.)

طیبه سلیمانی[۱]، مهرناز کیهان‌فر[۲*]، خسرو پیری[۱] و طاهره حسنلو[۳]

[۱] همدان، دانشگاه بو علی سینا، دانشکده کشاورزی، گروه بیوتکنولوژی

[۲] اصفهان، دانشگاه اصفهان، دانشکده علوم و فناوری‌های نوین، گروه زیست‌فناوری

[۳] کرج، پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی، بخش فیزیولوژی مولکولی

تاریخ دریافت: ۹۱/۴/۶ تاریخ پذیرش: ۹۲/۴/۹

چکیده

باباآدم، گیاه دارویی با اهمیتی است که حاوی ترکیبات دارویی فراوانی از جمله آرکتین و آرکتیژنین می‌باشد که خواص ضد سرطانی این متابولیتهای ثانویه شناخته شده است. پیشرفت در روشهای کشت بافت و باززایی این گیاه در شرایط *in vitro* به منظور آسان نمودن روشهای انتقال ژن به این گیاه دارویی بسیار مهم می‌باشد. در این تحقیق، برای کالوس‌زایی در گیاه باباآدم، از ریزنمونه‌های برگ، دمبرگ و ریشه گیاهچه‌های ۲ هفته‌ای استفاده شد. این ریزنمونه‌ها برای کالوس‌زایی در محیط کشت MS حاوی ۰/۵ درصد PVP (به عنوان آنتی‌اکسیدان)، و ترکیبی از غلظتهای هورمونی مختلف BA و2,4-D قرار گرفتند. این آزمایشات نشان داد که از نظر تیپ ریزنمونه، ریزنمونه‌های دمبرگ بیشترین کالوس‌زایی را داشتند. از نظر غلظتهای هورمونی، ترکیب دو هورمون در غلظتهای ۰/۵ mg/L BA +۱ mg/L 2,4-D و همچنین ۱ mg/L BA +۲ mg/L 2,4-D بیشترین میزان تولید کالوس را نشان دادند و در نتیجه بهترین تیمارها برای القای کالوس در گیاه دارویی باباآدم بودند.

واژه های کلیدی: باباآدم، کشت بافت، کالوس‌زایی، ترکیبات آنتی اکسیدانی، هورمونهای رشد گیاهی

* نویسنده مسئول، تلفن: ۳۷۹۳۴۴۰۲-۰۳۱، پست الکترونیکی: m.keyhanfar@ast.ui.ac.ir

مقدمه

گیاه باباآدم با نام انگلیسی Burdock و نام علمی *Arctium lappa* L. گیاهی از خانواده کاسنی می‌باشد (۲) و دارای ترکیبات لیگنانی فراوانی ازجمله آرکتین و آرکتیژنین می‌باشد (۱۰ و ۱۴) که این متابولیتهای ثانویه دارای فعالیتهای بیولوژیکی متنوعی از جمله ضد سرطان، ضدالتهاب، آنتی‌اکسیدان و اثرات ضدمیکروبی می‌باشند. خاصیت ضد سرطانی این متابولیتهای ثانویه بر روی رده-های سلولهای سرطانی پانکراس و سرطان کلون و در نتیجه القای مرگ سلولی برنامه ریزی شده در این سلولها گزارش شد (۶، ۲۷و ۳۰). همچنین دی‌آرکتیژنین که از بذر گیاه مذکور جدا شده است، به عنوان بازدارنده تولید نیتریک‌اکساید در ماکروفارژها می‌باشد. قابل ذکر است که نیتریک‌اکساید نوعی رادیکال آزاد است که در پروسه‌های فیزیولوژی و فیزیولوژی بیماری، از جمله در ایجاد شوکهای عفونی و تصلب شریان نقش مهمی دارد (۱۷). علاوه بر این چندین ترکیب لیگنانی با اثرات ضد ویروس (به خصوص ضد ویروس HIV)، در این گیاه شناسایی شده‌اند (۲۶). گیاه *A. lappa* دارای خواص دارویی متعددی می‌باشد. خصوصیات آنتی‌آسکوربوتیک این گیاه آن را داروی گیاهی مناسب برای درمان التهاب، کمبود ویتامین C و دردهای روماتیسمی می‌سازد. این گیاه به عنوان یک تسکین دهنده طبیعی به منظور شستشوی سطحی زخمها و اختلالات و ناهمواریهای پوستی مورد استفاده قرار می‌گیرد (۱۰). ریشه باباآدم دارای اثر تصفیه

کننده خون، مدر و معرق است و مصرف آن به منظور درمان نقرس، روماتیسم، سنگ کلیه و بیماریهای پوستی نظیر، اگزما و خشکی پوست، جوشهای صورت، دانه‌های غرور و سرخک از گذشته معمول بوده است. همچنین ریشه گیاه مذکور در معالجه زخمهای حاصل از سوختگی، التهاب مخاط دهان و گلو مؤثر است (۱۰).

با توجه به اهمیت گیاه دارویی باباآدم و پایین بودن میزان ترکیبات دارویی موجود در گیاه طبیعی، استفاده از روشهایی برای افزایش تولید متابولیتهای ثانویه مهم در این گیاه، ضروری به نظر می‌رسد. همچنین برداشت بی رویه آن از طبیعت ممکن است باعث انقراض نسل این گیاه دارویی شود. استفاده از روشهای بیوتکنولوژی شامل، کشت بافت و ریزازدیادی به تولید انبوه این گیاه با اهمیت در یک سطح محدود و جلوگیری از انقراض نسل آن منجر می‌گردد.

ازدیاد در شرایط *in vitro* دارای پتانسیل عظیمی برای تولید گیاهان دارویی با کیفیت بالا می‌باشد که این مهم، می‌تواند از طریق روشهای مختلف ریزازدیادی به دست آید. ریزازدیادی در گونه‌های گیاهی متنوعی از جمله تعداد زیادی از گیاهان دارویی شامل، *Catharanthus roseus*، *Cinchona ledgeriana*، *Digitalis spp*، *Datura melet*، *Bacopa monnieri* و *Chlorophytum borivilianum* نتایج مطلوبی را نشان داده است (۱۵ و ۲۸). در تکثیر گیاهان دارویی، باززایی گیاه از کالوس، نیز به منظور تکثیر گیاهان دارویی کاربرد فراوانی دارد (۱۹). باززایی گیاه از کالوس در گیاهان دارویی چون *Plumbago rosea*، *Dioscorea alata*، *Mentha arvensis* و *Echinacea pallida* و چندین گونه گیاه دارویی دیگر گزارش شده است (۲۸). همچنین بافت کالوس گیاهی علاوه بر ازدیاد گیاهان، قابلیتهای متنوع دیگری نیز دارد که از جمله می‌توان به استفاده از آنها در انتقال ژن به گیاه و یا کاربرد آن در تهیه کشتهای سوسپانسیون سلولی به منظور تولید متابولیتهای ثانویه و یا ترکیبات مفید دیگر حاصل از آنها اشاره نمود (۱۵).

گزارشات در مورد کشت بافت و القای کالوس در گیاه دارویی باباآدم بسیار محدود می‌باشد و تنها یک مورد، توسط هی و همکاران در سال ۲۰۰۶، گزارش شده است (۱۲). در تحقیق حاضر سعی بر آن بوده است که بهینه-سازی کالوس‌زایی در ریزنمونه‌های گیاه باباآدم انجام شود. قابل ذکر است که کالوس‌زایی در گیاه دارویی باباآدم بومی ایران، تا کنون گزارش نشده است و برای اولین بار در این تحقیق انجام گرفت.

مواد و روشها

جمع آوری، استریل کردن و کشت بذور باباآدم : بذور گیاه دارویی باباآدم از باغ گیاهان دارویی استان همدان جمع آوری شد و پس از استریل کردن به وسیله محلول هیپوکلریت سدیم ۲ درصد (v/v) به مدت ۱۳ دقیقه و اتانول ۷۰ درصد (v/v) به مدت ۱ دقیقه، با آب مقطر شستشو داده شد و سپس به منظور جوانه‌زنی بر روی کاغذ صافی مرطوب و استریل کشت گردید و در اتاق رشد با دمای ۲±۲۵ درجه سانتی گراد نگهداری شد.

بهینه‌سازی القای کالوس در گیاه باباآدم: برای تولید کالوس در ریزنمونه‌های باباآدم از سه اندام برگ، دمبرگ و ریشه گیاهچه‌های ۳ هفته‌ای ریزنمونه تهیه شد. همچنین از غلظتهای هورمونی مختلف 2,4-dichlorophenoxy acetic acid (2,4-D) و Benzyladenine (BA) به صورت ترکیب با هم و مطابق جدول ۱ استفاده شد (۱۲). این آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی و در دو سطح (سطح اول شامل غلظتهای هورمونی مختلف، سطح دوم نوع ریزنمونه) انجام شد. همچنین از ۴ تکرار و در هر تکرار از سه ریزنمونه استفاده گردید. در تمامی مراحل آزمایش، علاوه بر ترکیبات هورمونی مورد نظر، ترکیب پلی وینیل پیرولیدون (PVP) به نسبت ۰/۵ درصد نیز به محیط کشت MS جامد

حاوی g/L ۳۰ ساکارز و g/L ۷ آگار، اضافه شد (۲۳) . لازم به توضیح است که مشاهدات در این تحقیق نشان داد که ریزنمونه‌های گیاه باباآدم در شرایط کشت *in vitro* قهوه‌ای شده و از بین رفتند که می‌تواند به دلیل ترشح ترکیبات فنولی باشد (۵). استفاده از PVP (یا هر ترکیب آنتی‌اکسیدان مناسب دیگر) می‌تواند مانع ترشح ترکیبات فنولی از ریزنمونه‌های باباآدم شده و در نتیجه از قهوه‌ای شدن بافت ریزنمونه‌ها و محیط کشت حاوی آنها جلوگیری کند (۵). آزمایشات بهینه‌سازی در این مطالعه نشان داد که استفاده از PVP در غلظت ۰/۵ درصد از قهوه‌ای شدن ریز نمونه‌ها جلوگیری کرد (۳). کشت‌ها در اتاق رشد با شرایط دمای ۲±۲۵ درجه سانتی گراد و در شرایط تاریکی قرار گرفتند. یک ماه بعد، مشاهده ماکروسکوپی برای بررسی تولید یا عدم تولید کالوس انجام گرفت. تجزیه آماری داده‌ها با استفاده از نرم افزار (sas ver 9.1) و به روش آماری GLM انجام شد و به منظور مقایسه میانگینها از آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ٪۵= α استفاده گردید.

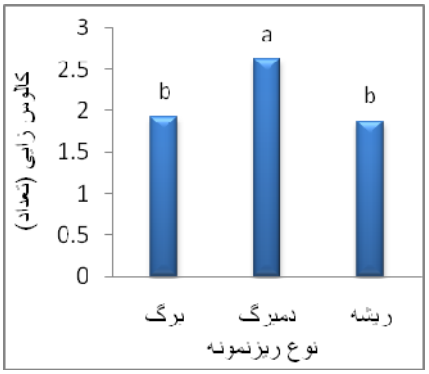
جدول ۱- غلظتهای هورمونی مورد استفاده برای کالوس زایی

هورمون (mg/L)	A	B	C	D
BA	۰	۰/۵	۱	۲
2,4-D	۰	۱	۲	۳

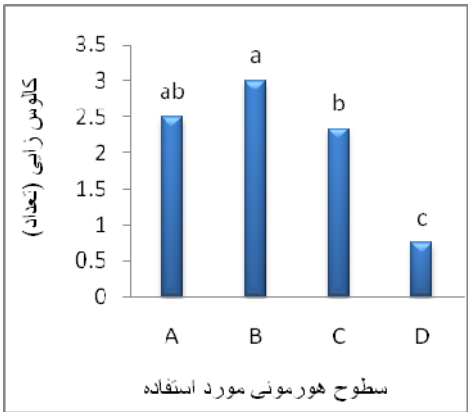
نتایج و بحث

تاثیر نوع ریزنمونه بر میزان کالوس‌زایی: آزمون میانگین کالوس‌زایی در ریزنمونه‌های گیاه باباآدم نشان داد که ریزنمونه‌های مورد استفاده تفاوت معنی‌داری در میزان تولید کالوس داشتند (شکل- ۱). ریزنمونه دمبرگ بیشترین مقدار و ریشه کمترین مقدار کالوس‌زایی را نشان دادند.

نوع ریزنمونه یک فاکتور با اهمیت برای تشکیل کالوس است. بر اساس این نتایج، بافت دمبرگ در گیاهچه‌های باباآدم، بهترین ریزنمونه برای تولید کالوس می باشد.



شکل ۱- میانگین کالوس‌زایی در ریزنمونه‌هابی مختلف گیاه دارویی باباآدم. حروف a و b در بالای ستونها معنی‌دار بودن یا عدم معنی دار بودن اختلاف بین تیمارها در سطح احتمال ٪۵= α را نشان می‌دهد.



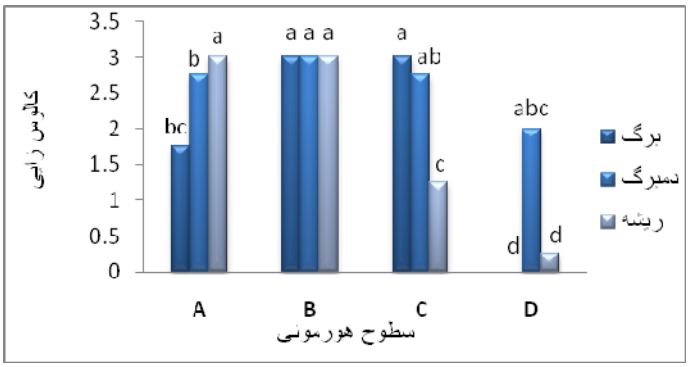
شکل ۲- میانگین کالوس‌زایی گیاه دارویی باباآدم در سطوح هورمونی مختلف. حروف a، b و c در بالای ستونها معنی‌دار بودن یا عدم معنی‌دار بودن اختلاف بین تیمارها در سطح احتمال ٪۵= α را نشان می‌دهد.

همچنین گزارش شده است که انواع مختلف ریزنمونه‌ها، به منظور القای کالوس در گیاه *Cannabis sativa* L. مورد بررسی قرار گرفت و مشخص شد که در این گیاه، ریزنمونه‌های دمبرگ، مستعدترین بافت برای القای کالوس می‌باشد (۲۱). بر خلاف نتایج این تحقیق، خرمی‌راد و همکاران (۲۰۱۲)، اثر ریزنمونه‌های مختلف را بر روی القای کالوس در گیاه *Anthurium andreanum* مورد بررسی قرار دادند و نشان دادند که استفاده از ریزنمونه دمبرگ برای القای کالوس در این گیاه، مناسب نیست (۱۶).

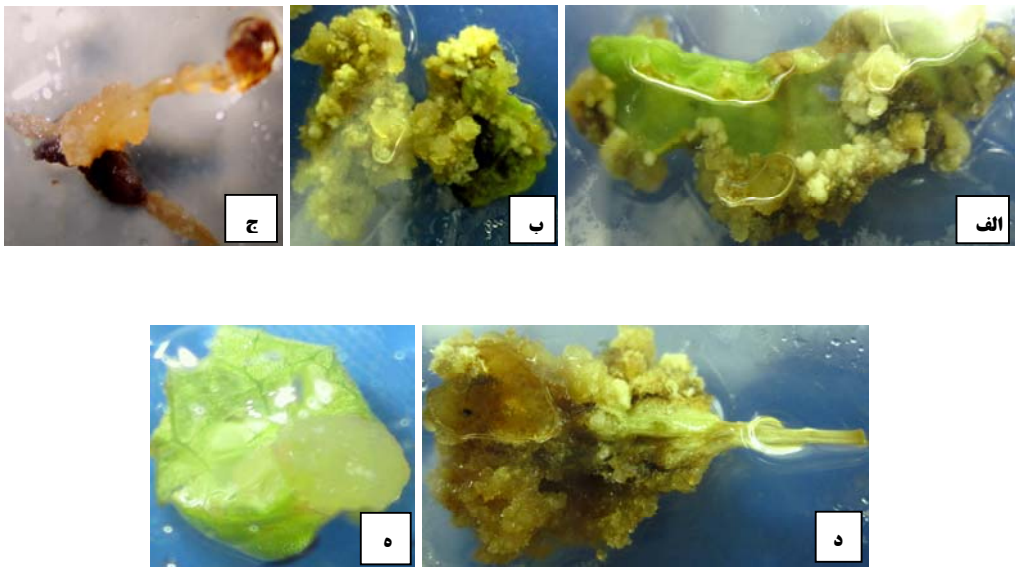
همچنین نتایج تحقیق حاضر نشان داد که، ریزنمونه ریشه

برای القای کالوس در گیاه دارویی باباآدم مناسب نیست. همانند نتایج این تحقیق، ویجی و همکاران (۲۰۱۰)، پس از بررسی ریزنمونه‌های مختلف برای تولید کالوس در گیاه *Citrus jambhiri*، گزارش کردند که از ریزنمونه‌های ریشه، کمترین میزان تولید کالوس حاصل گردید (۲۹).

تأثیر غلظتهای هورمونی بر میزان کالوس‌زایی در گیاه دارویی باباآدم: در نتایج آزمون میانگین کالوس‌زایی تحت تأثیر سطوح هورمونی مورد استفاده (شکل-۲)، مشاهده شد که سطوح هورمونی مختلف به طور معنی‌داری بر میزان تولید کالوس اثر داشته‌اند و تیمار ریزنمونه‌ها با سطح هورمونی B یعنی ۰/۵ mg/L BA +۱ mg/L 2,4-D، بیشترین تأثیر را بر کالوس‌زایی نشان داد. در حالی که تیمار ریزنمونه‌ها با ۲ mg/L BA +۳ mg/L 2,4-D (سطح هورمونیD) کمترین تأثیر را بر میزان کالوس‌زایی گیاه داشته است.



شکل ۳- مقایسه نوع ریزنمونه و سطوح هورمونی (میلی گرم بر لیتر)، در میزان کالوس زایی. حروف a، b، c و d معنی‌دار بودن یا عدم معنی دار بودن اختلاف بین تیمارها در سطح احتمال ۵٪= α را نشان می‌دهد.



شکل-۴- کالوس‌زایی در ریزنمونه‌های گیاه باباآدم: الف و ب) کالوس‌زایی در برگ،ج) کالوس‌زایی در ریشه، د) کالوس‌زایی در دمبرگ،ه) نمونه‌های کنترل (بدون استفاده از هورمونهای گیاهی)

برهمکنش میان نوع ریزنمونه و غلظتهای هورمونی در تولید کالوس: آزمون میانگین برهمکنش میان نوع ریزنمونه و سطوح هورمونی مختلف نشان داد که نوع ریزنمونه و سطوح هورمونی به کار رفته تفاوت معنی‌داری بر تولید کالوس داشته است (شکل-۳). ریزنمونه برگی در سطوح هورمونی (B و C)، ساقه در سطح هورمونی (B) و ریشه در سطح هورمونی (A و B) دارای نتایج مشابه بودند و بیشترین میزان کالوس‌زایی را نشان دادند. ریزنمونه برگ در سطح هورمونی (D) کمترین میزان کالوس‌زایی را نشان داد. ریزنمونه‌های برگ در این سطح هورمونی در نواحی زخمی قهوه‌ای شدند و تدریجاً از بین رفتند.

استفاده از غلظتهای مختلف هورمونهای گیاهی چون، 2,4-D و BA در تحقیقات مختلفی گزارش شده است. بسته به گونه گیاهی، نوع و سن ریزنمونه‌های مورد استفاده، غلظت به خصوصی از این هورمونها بیشترین تأثیر را در کالوس-زایی گیاه نشان داده است. برای نمونه، هی و همکاران (۲۰۰۶)، اثر هورمونهای رشد گیاهی را بر کالوس‌زایی گیاه باباآدم بررسی کردند و نشان دادند که 2,4-D با غلظت ۲ میلی‌گرم در لیتر و BA در دامنه غلظتی ۱ تا ۲ میلی‌گرم در لیتر، بیشترین درصد فراوانی (۱۰۰ درصد) را برای تولید کالوس داشتند (۱۲). در تحقیق دیگری، دهار و جوشی (۲۰۰۵) اثر هورمونهای رشد را روی کالوس‌زایی ریزنمونه‌های مختلف (برگ، ساقه، ریشه و هیپوکوتیل) گیاه *Saussurea obvallata* بررسی نموده و دریافتند که ریزنمونه برگی و غلظت هورمونی ۲/۵ میلی‌گرم BA و ۱۰ میلی‌گرم NAA بیشترین میزان کالوس‌زایی را داشتند (۹). ایشی و همکاران (۱۹۹۸) گزارش کردند که محیط کشت حاوی ترکیبی از ۰/۱ میلی گرم بر لیتر 2,4-D و ۰/۰۱ میلی گرم بر لیتر BA نسبت به سایر غلظتهای مورد استفاده از این دو هورمون، بیشترین تاثیر را بر کالوس‌زایی گیاه *Phalaenopsis* داشتند (۱۳). همچنین در گیاه *Ceropegia candelabrum* L ترکیبی از BA و 2,4-D برای القای کالوس مؤثر واقع شد (۷). کالوس‌زایی توسط ترکیبی از این دو هورمون گیاهی در گیاهان دیگری مانند *Kaempferia galanga* L. و *Curcuma longa* L. نیز مورد بررسی قرار گرفته و نتایج مشابهی را داشته است (۲۵).

در تحقیق حاضر زمانی که ترکیبی از BA و 2,4-D در سطوح هورمونی B و C یعنی به ترتیب غلظتهای mg/L ۱ mg/L 2,4-D +۰/۵ BA و mg/L 2,4-D +۱ mg/L BA ۲ مورد استفاده قرار گرفتند، بیشترین میزان کالوس‌زایی مشاهده شد. در سطح هورمونی B، همه ریزنمونه‌ها، حتی ریزنمونه‌های ریشه، بیشترین میزان کالوس‌زایی را نشان دادند و با افزایش غلظتهای هورمونی، به تدریج میزان کالوس‌زایی هم کاهش یافت، تا آنجا که بافت ریزنمونه-های برگی، در بالاترین غلظت هورمونی مورد استفاده (سطح D)، قهوه‌ای شده و این ریزنمونه‌ها بدون تولید هیچ کالوسی کاملاً از بین رفتند. مشابه این نتیجه را ویجی و همکاران (۲۰۱۰)، برای القای کالوس در گیاه *Citrus jambhiri* به دست آوردند. آنها متوجه شدند زمانی که از غلظتهای کمتر 2,4-D (۱mg/L) استفاده نمودند، بیشترین میزان کالوس در این گیاه به دست می آید (۲۹).

قهوه‌ای شدن ریزنمونه‌های باباآدم را می‌توان، به دلیل وجود ترکیبات فنولی فراوان و اکسید شدن آن توسط آنزیم پلی‌فنل‌اکسیداز دانست. ترکیب PVP به عنوان جاذب ترکیبات فنولی عمل می‌کند و در نتیجه، این ترکیبات را (ترکیبات فنولی) از دسترس آنزیم پلی‌فنل‌اکسیداز دور نگه داشته و مانع قهوه‌ای شدن بافت می‌گردد (۲۰). از آنجایی که سنتز ترکیبات فنولی در برگ انجام می‌گیرد و سپس به سایر اندامها انتقال می‌یابد، بنابراین میزان ترکیبات فنولی در ریزنمونه برگی بیشتر از سایر انواع ریزنمونه‌های مورد استفاده می‌باشد (۸).

PVP همچنین می‌تواند تنظیم کننده‌های رشد گیاهی را هم جذب کند (۱۸). احتمالاً، زمانی که سطوح بالای غلظت هورمونی (سطح D) برای ریزنمونه‌های برگی به کار رفت، باعث شد که این ترکیبات هورمونی، برای جذب

توسط PVP، در رقابت با ترکیبات فنولی قرار بگیرند. در نتیجه این عوامل،PVP مورد نیاز برای جلوگیری از قهوه ای شدن بافت در ریزنمونه‌های برگی (که در سطح هورمونی D تیمار شده بودند) کم بوده و در نتیجه منجر به قهوه‌ای شدن بافت و نهایتاً مرگ این ریزنمونه‌ها شده است.

اکسین و سیتوکنین به عنوان تنظیم کننده‌های رشد گیاهی، فاکتورهای کلیدی برای کنترل تقسیم سلولی در شرایط کشت بافت می‌باشند. از این بین استفاده از 2,4-D (به عنوان اکسین) و BA (به عنوان سیتوکنین) به منظور تولید کالوس در کشت بافت گیاهان زیادی گزارش شده است (۴ و ۱۶) . تنوع در فراوانی تولید کالوس در پاسخ به سطوح مختلف هورمونی، می‌تواند به دلیل تمایز در بیان ژنهای کنترل کننده تولید کالوس باشد. همچنین ممکن است که در بعضی از سطوح هورمونی مورد استفاده، برخی از ژنهای مسئول در سنتز کالوس، به طور کامل بیان نشوند (۲۲). به علاوه، گزارش شده است که غلظتهای خیلی زیاد هورمون 2,4-D ممکن است برای بیان ژنهای درگیر در تقسیم سلولی و تمایززدایی بافت، مهار کننده باشد (۲۲). همچنین استفاده از BA به همراه ایندول استیک اسید (IAA) تغییرات معنی داری را در رشد اندام هوایی گیاه تاتوره تماشایی نشان داده است (۱).

نتایج بررسی میانگین کالوس زایی در ریز نمونه های مختلف گیاه باباآدم نشان داد که ریزنمونه‌های دمبرگ بیشترین میزان کالوس‌زایی را نسبت به سایر ریزنمونه‌ها دارد (شکل- ۱). در مجموع، نتایج این مطالعات نشان داد که پاسخ به القای کالوس، هم به نوع ریزنمونه‌ها و هم به غلظت هورمونی مورد استفاده بستگی دارد و موفقیت در کشت بافت این گیاه، با انتخاب ریزنمونه مناسب وابسته است. نتایج مشابهی برای گیاهانی مانند *Holarrhena antidysenterica* (۲۴) و *Lonicera japonica* (۱۱) گزارش شده است. این مطالعات نشان دادند که نوع ریزنمونه تأثیر به سزایی در القای کالوس در این گیاهان داشته است.

تحقیق حاضر روش ساده‌ای را برای القاء کالوس توسط هورمونهای گیاهی قابل دسترس ارائه می‌دهد. با وجود اینکه در شرایط عدم استفاده از هورمونهای گیاهی (نمونه کنترل) هم کالوس ایجاد شد، اما کالوسهای ایجاد شده از نظر مقدار، رنگ و ساختمان با کالوس تولید شده در محیطهای کشت دارای هورمونهای گیاهی، متفاوت بودند (شکل- ۴). مقدار کالوس تولید شده در نمونه‌های کنترل نسبت به نمونه‌های موجود در محیط هورمون‌دار بسیار کمتر بوده و خیلی زود تبدیل به کالوسهای دارای رنگ قهوه‌ای تیره می‌شدند. همچنین این کالوسها دارای جنس نرم بودند. در صورتی که کالوسهای ایجاد شده در شرایط هورمون‌دار (به خصوص کالوسهای حاصل از ریزنمونه های برگ و دمبرگ) دارای رنگ سفید یا قهوه‌ای روشن، و ترد بوده و همچنین در برخی موارد به نظر می‌آمد که کالوسهای جنین‌زا (سفید، سفت و گرانوله یا کروی) تولید شده است. البته بررسیهای بعدی برای صحت این احتمال در حیطه این آزمایش نبوده است. هر چند به نظر می‌رسد که خصوصاً ریزنمونه‌های برگی در محیطهای با غلظتهای هورمونی سطح B، بالقوه توانایی تولید کالوس جنین‌زا را دارند.

منابع

۱- تشکری میانرودی، ح، کریمی، ف، تقی زاده، م،۱۳۹۰، ریز ازدیادی گیاهچه های تاتوره تماشایی (*Datura innoxia*) با استفاده از IAA و BA و افزایش محتوای تروپان آلکالوئید گیاهچه ها تحت تاثیر تیمار با پوترسین، مجله زیست شناسی ایران، جلد ۲۴، ۳۵۵-۳۶۵

۲- زرگری، ع، ۱۳۷۰، گیاهان دارویی، انتشارات دانشگاه تهران، جلد ۳

۳- سلیمانی، ط، کیهانفر، م، پیری، خ، حسنلو، ط، ۱۳۸۹، کنترل ترشح ترکیبات فنولی و اثر تنظیم کننده های رشد برای القای کالوس در گیاه دارویی *Arctium lappa* L. یازدهمین کنگره ژنتیک ایران، تهران، دانشگاه شهید بهشتی.

۴- شرفی، ع، هاشمی سهی، ه، جورابچی، ع، ۱۳۸۷، بهینه سازی شرایط باززایی گیاه دارویی *Artemisia annua*، مجله زیست شناسی ایران، جلد ۲۱، ۵۶۵-۵۷۳

5- Abdelwahd, R, Hakam, N, Labhilili, M and Udupa, SM, 2008, Use of an adsorbent and antioxidants to reduce the effects of leached phenolics in in vitro plantlet regeneration of faba bean, Afr. J. Biotechnol, 7(8): 997-1002.

6- Awale, S, Lu, J, Kalauni, SK, Kurashima, Y, Tezuka, Y, Kadota, S and Esumi, H, 2006, Identification of arctigenin as an antitumor agent having the ability to eliminate the tolerance of cancer cells to nutrient starvation, Cancer Res, 66(3): 1751-1757.

7- Beena, MR and Martin, KP, 2003, *In vitro* propagation of the rare medicinal plant *Ceropegia candelabrum* L. through somatic embryogenesis, In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant, 39:510–513.

8- Chamandoosti, F, 2010, The relationship between plant growth regulators for organogenesis and phenolic compound in Cotton (*Gossypium hirsutum* L.), Asian J. Dev. Biol, 2(1): 16-22.

9- Dhar, U, Joshi, M, 2005, Efficient plant regeneration protocol through callus for *Saussurea obvallata* (DC.) Edgew. (Asteraceae): effect of explant type, age and plant growth regulators, Plant Cell Rep, 24(4):195-200.

10- Dweck, A, 1995, Cosmetics and toiletries advanced technology conference, Botanicals-Research of Actives, Paris.

11- Georges, D, Chenieux, JC, Ochatt, SJ, 1993, Plant regeneration from aged callus of the woody ornamental species, *Lonicera japonicacv*. 'Halls Prolific', Plant Cell Reproduction, 13: 91–94.

12- He, WT, Hou, SW, and Wang, CY, 2006, Callus induction and high-frequency plant regeneration from hypocotyls and cotyledon explants of *Arctium lappa* L. *In Vitro* Cell, Dev. Biol. Plant, 42: 411–414.

13- Ishii, Y, Takamura, T, Goi, M and Tanaka, M, 1998, Callus induction and somatic embryogenesis of *Phalaenopsis*, Plant Cell Reports, 17: 446–450.

14- Kamkaen, N, Matsuki, Y, Ichino, C, Kiyohara, H and Yamada, H, 2006, The Isolation of the Anti-Helicobacter Pylori Compounds in Seeds of *Arctium lappa* Linn., Thai Pharmaceutical and Health Science Journal, 1(2): 12-18.

15- Kayser, O, and Quax, WJ, 2007, Medicinal Plant Biotechnology, Wiley-Vch Verlag GmbH & Co.

16- Khorrami Raad, M, Bohluli Zanjani, S, Ramezani Sayyad, A, Maghsudi, M, Kaviani, B, 2012, Effect of Cultivar, Type and Age of Explants, Light Conditions and Plant Growth Regulators on Callus Formation of *Anthurium*, American-Eurasian J. Agric. & Environ. Sci., 12(6): 706-712.

17- Kim, BH, Hong, SS, Kwon, SW, Lee, HY, Sung, H, Lee, IJ, Hwang, BY, Song, S, Lee, CK, Chung, D, Ahn, B, Nam, SY, Han,SB, and Kim, Y, 2008, Diarctigenin, a Lignan Constituent from *Arctium lappa*, Down-Regulated Zymosan-Induced Transcription of Inflammatory Genes through Suppression of DNA Binding Ability of Nuclear Factor-kappaB in Macrophages, J. Pharmacol. Exp. Ther, 327(2):393-401.

18- Kiong, ALP, Thing, YS, Gansau, JA and Hussein, S, 2008, Induction and multiplication of callus from endosperm of *Cycas revolute* Afr. J. Biotechnol, 7(23): 4279-4284.

19- Kokate, CK, 2006, Medicinal plant biotechnology, CBS publisher and distributors..

20- Krishna, H, Sairam, RK, Singh, SK, Patel, VB, Sharma, RR, Grover, M, Nain, L, and Sachdev, A, 2008, Mngo explant browning: effect of ontogenic age, mycorrhization and pre-treatments, Scientia horticulturae, 118(2): 132-138.

21- Lusarkiewicz-Jarzina, A, Ponitka, A and Kaczmarek, Z, 2005, Influence of cultivar, explants source and plant growth regulator on callus induction and plant regeneration of *Cannabis sativa* L., ACTA Biologica Cracoviensia Series Botanica, 47(2): 145–151.

22- Mahmood, I, Razzaq, A, Khan, ZUD, Hafez, IA and Kaleem, S, 2012, Evaluation of tissue culture responses of promising Wheat (*Triticum aestivum* L.) cultivars and development of efficient regeneration system, Pak. J. Bot., 44: 277-284.

23- Murashige, T, and Skoog, F, 1962, A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture, Physiol Plant, 15: 473-479.

24- Raha, S, Roy, SC, 2003, Efficient plant regeneration in *Holarrhena antidysentrika* Wall., from shoot segment derived callus, In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant, 39: 151–155.

25-Saenouk, P, 2011, Callus induction and plant regeneration from leaf explant of *Cornukaempferia aurantiflora* Mood & Larsen, Pak. J. Bot., 43(5): 2415-2418.

26- Suzuki, S, Umezawa, T, and Shimada, M, 2002, tereochemical diversity in lignin biosynthesis of *Arctium lappa* L., Biosci. Biochem. 66(6): 1262-1269.

27- Sohn, E, Jang, A, Joo, H, Park, S, Kang, SC, Lee, CH and Kim,SY, 2011, Anti-allergic and anti-inflammatory effects of butanol extract from *Arctium Lappa* L, Clinical and Molecular Allergy, 9(4): 3-11.

28- Tripathi, L, and Tripathi, JN, 2003, Role of biotechnology in medicinal plants, Tropical Journal of Pharmaceutical Research, 2(2):243-253.

29- Vijay, S, Virk, GS and Nagpal, A, 2010, Effect of Explant Type and Different Plant Growth Regulators on Callus Induction and Plantlet Regeneration in *Citrus jambhiri* Lush, Environ. We Int. J. Sci. Tech., 5: 97-106.

30- Zhao, F Wang, L and Liu, k, 2009, *In vitro* anti-inflammatory effects of arctigenin, a lignan from *Arctium lappa* L., through inhibition on iNOS pathway, Journal of Ethnopharmacology 122: 457–462.

Callus induction in Burdock (*Arctium lappa* L.)

Soleimani T.[1], Keyhanfar M.[2], Piri Kh.[1] and Hasanloo T.[3]

[1] Biotechnology Dept., Faculty of Agriculture, Bu-Ali Sina University, Hamedan, I.R. of Iran

[2] Biotechnology Dept., Faculty of Advanced Sciences and Technologies, University of Isfahan, Isfahan, I.R. of Iran

[3] Molecular Physiology Dept., Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran, Karaj, I.R. of Iran

Abstract

Burdock (*Arctium lappa* L.) is an important medicinal plant containing arctiin and arctigenin, which are important secondary metabolits used as anticancer reagents. Due to the existence of important secondary metabolites in this plant, development of a reliable *in vitro* tissue culture and regeneration methods to facilitate genetic transformation in this plant is important. In the current study, for optimization of the callus induction, leaf, petiole and root explants of *A. lappa* were cultured in solid MS medium, which was supplemented with 0.5% PVP (as an anti-oxidant) and different concentrations and combinations of BA and 2,4-D hormones. This study revealed that the petiole explants induced highest callus rate comparing to the other tested explants. In addition, two hormones combined concentrations of 0.5 mg/L BA + 1.0 mg/L 2,4-D and 1.0 mg/L BA + 2.0 mg/L 2,4-D, produced the highest amount of callus and were the most suitable treatments for the callus induction.

Key words: Burdock, tissue culture, callus induction, antioxidant compounds, plant phytohormones