به‌نژادی گیاهان زراعی و باغی
دوره ۳ ■ شماره ۲ ■ پاییز و زمستان ۱۳۹۴
صفحه‌های ۱۵۱-۱۶۲

# بررسی اثر تنظیم‌کننده‌های رشد بر باززایی مستقیم شاخساره بذرالبنج مشبک

بهمن حسینی[۱]*، مهسا امین‌نژاد[۲]

۱. دانشیار گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه، ارومیه – ایران
۲. دانشجوی کارشناسی ارشد فیزیولوژی و اصلاح گیاهان دارویی، گروه باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات، تهران – ایران

تاریخ وصول مقاله: ۱۳۹۴/۰۱/۱۵ تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۴/۰۶/۲۴

## چکیده

به منظور بررسی اثر چهار سطح هورمون Kin (صفر، یک، سه و پنج میلی‌گرم در لیتر) در ترکیب با سه سطح IAA (صفر، ۰/۵ و یک میلی‌گرم در لیتر) بر باززایی مستقیم ریزنمونه‌های گره، کوتیلدن، هیپوکوتیل و نوک شاخساره در شرایط درون‌شیشه‌ای، تحقیقی در آزمایشگاه کشت بافت شرکت دانش بنیان اروم زیست تاک در سال ۱۳۹۲ انجام گردید. حداکثر القای جوانه (۴۱/۰۶۲ در هر ریزنمونه) از ریزنمونه نوک شاخساره و حداکثر باززایی شاخه (۱۵۵/۶۷ شاخساره در هر تیمار) در محیط کشت MS حاوی پنج میلی‌گرم در لیتر Kin در ترکیب با ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر IAA و کمترین میانگین القای جوانه (۱/۶۲ در هر ریزنمونه) از ریزنمونه هیپوکوتیل و حداقل باززایی شاخه (۵/۷ و ۶/۵) در محیط کشت MS فاقد Kin مشاهده شد. در تیمار شاهد (فاقد هورمون) ریزنمونه‌های کوتیلدن و هیپوکوتیل باززایی نداشتند. از محیط کشت MS و $MS^{1/2}$ حاوی غلظت‌های مختلف هورمون‌های IBA (µM/l) و IAA به منظور ارزیابی پاسخ گیاهچه‌های باززایی شده جهت ریشه‌زایی استفاده گردید. بیشترین میانگین القای ریشه (۸۷/۵۰) در محیط کشت MS حاوی ۱/۱ و ۲/۲ میکرومول در لیتر هورمون IBA تولید گردید. در محیط کشت نصف غلظت MS حاوی ۱/۱ میکرومول در لیتر IBA، میانگین القای ریشه ۵۰ ثبت گردید و در سایر تیمارها ریشه‌زایی مشاهده نگردید. گیاهچه‌های ریشه‌دار منتقل شده به گلدان‌های پلاستیکی جهت سازگاری، پس از سه هفته با ۹۰ درصد زنده‌مانی به محیط گلخانه منتقل شدند.

**کلیدواژه‌ها:** باززایی مستقیم، بذرالبنج مشبک، تنظیم‌کننده رشد گیاه، ریزنمونه، کشت درون‌شیشه‌ای

* نویسنده مسئول Email: b.hosseini@urmia.ac.ir

## مقدمه

گیاهان جنس *Hyoscyamus* از جمله گیاهان دارویی باارزش، متعلق به تیره Solanaceae و دارای ۲۰ گونه و ۹۰ جنس در سطح جهان و نیز ۱۳ گونه در ایران می‌باشد که هفت گونه آن بومی[1] هستند [۱، ۶]. گونه بذرالبنج مشبک (با نام علمی *Hyoscyamus reticulatus* L.) بومی مناطق اروپا، علفی، دوساله بوده و دارای ترکیبات دارویی نظیر تروپان آلکالوئیدهای هیوسیامین و اسکوپولامین می‌باشد که از آن‌ها در تهیه داروهای ضدتشنج، بی‌حسی، مسکن و تب‌بر استفاده می‌شود [۳،۷، ۲۱ و ۲۶]. میزان آلکالوئیدهای کل در *H. reticulatus* در برگ‌ها ۰/۰۲۷-۰/۰۱۱ و در ریشه‌ها ۰/۴۱۷ درصد مشاهده شد. سایر متابولیت‌های[2] شناخته شده در گونه‌های بذرالبنج شامل فلاونوئیدها[3]، اسید کلروژنیک[4]، تانن[5] و کومارین[6] می‌باشند [۵، ۱۶ و ۱۹].

فاکتورهای شیمیایی، مواد معدنی، تنظیم‌کننده‌های رشد به عنوان مهمترین عوامل در تمایززدایی و رشد گیاه مؤثرند [۲۳]. تحقیقات متعددی بر روی باززایی گیاهان متعلق به این تیره نظیر [*Hyoscyamus niger* ۱۴]، [*Solanum trilobatum* L. ۱۳]، [*Solanum melongena* L. ۱۸]، در محیط کشت حاوی ترکیبات و سطوح مختلف تنظیم‌کننده‌های رشدی و ریزنمونه‌های مختلف انجام شده است.

در یکی از گونه‌های گیاه مریم‌گلی (با نام علمی *Salvia miltiorhizza*)، بیشترین نرخ باززایی غیرمستقیم در محیط کشت MS حاوی ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر IAA و ۴/۶ میلی‌گرم در لیتر Kin و باززایی مستقیم در محیط کشت MS حاوی ۲/۶ میلی‌گرم در لیتر BA و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر IAA به‌دست آمد [۲۸]. در گیاه نعناع فلفلی (با نام علمی *Mentha piperita*)، حداکثر تعداد شاخه و طول شاخه در محیط کشت MS حاوی ۰/۴ میلی‌گرم در لیتر NAA و ۰/۴ میلی‌گرم در لیتر Kin به‌دست آمد [۲۹]. اندام‌زایی درون‌شیشه‌ای از گیاه *Cassia auriculata* L. در محیط کشت MS حاوی سه میلی‌گرم در لیتر BA و یک میلی‌گرم در لیتر NAA و محیط کشت MS حاوی سه میلی‌گرم در لیتر Kin و سه میلی‌گرم در لیتر BA صورت گرفت [۲۷].

باتوجه به اهمیت این گیاه و نیز درنظر گرفتن این نکته که هیچ مطالعه‌ای در مورد کشت درون‌شیشه‌ای این گیاه تاکنون گزارش نشده است، هدف از انجام پژوهش حاضر، شناخت بهترین، سریع‌ترین و اقتصادی‌ترین روش تکثیر و دست‌یابی به محیط کشت مناسب برای باززایی و تکثیر گیاه درون‌شیشه‌ای این گیاه و همچنین تدوین دانش فن‌کشت درون‌شیشه‌ای در ایران می‌باشد.

## مواد و روش‌ها

### مواد گیاهی، ضدعفونی سطحی و شرایط نگهداری

بذر موردنیاز جهت کشت درون‌شیشه‌ای در شرایط گندزدا به منظور تهیه ریزنمونه سالم و تمیز از باغ گیاهان دارویی دانشکده کشاورزی دانشگاه ارومیه تهیه گردید. همچنین تحقیق در مرکز رشد واحدهای فناوری و بیوتکنولوژی جهاد دانشگاهی ارومیه در سال ۱۳۹۲ انجام گردید. ابتدا جهت شکستن خواب فیزیولوژیکی بذور به مدت ۲۴ ساعت در شرایط کاملاً تاریکی و در دمای ۲۴ درجه سانتی‌گراد با محلول جیبرلین آغشته گردید. سپس جهت ضدعفونی سطحی بذرها از اسیدسولفوریک ۱۰ درصد به مدت هفت دقیقه، هیپوکلریت سدیم پنج درصد به مدت ۱۰ دقیقه و سه بار غوطه‌وری در آب مقطر به مدت ۱۰ دقیقه استفاده گردید. پس از ضدعفونی سطحی بذور استریل در محیط کشت پایه MS تکمیل شده با ساکارز سه

1. Endemic
2. Metabolites
3. Flavonoids
4. Chlorogenicasid
5. Tannin
6. Coumarin

درصد حجمی و آگار ۰/۸ درصد با اسیدیته ۵/۷ کشت شدند. جهت کشت کلیه مواد گیاهی در اتاق رشد با دمای ۲ ± ۲۴ درجه سانتی‌گراد و با فتوپریود ۱۶ ساعت روشنایی و هشت ساعت تاریکی قرار گرفتند. قطعات هیپوکوتیل و کوتیلدون ۱۵ روز پس از کشت بذر و قطعات گره و نوک شاخه ۲۱ روز پس از کشت بذر از گیاهچه‌های حاصل تهیه شدند.

## آزمایش بررسی اثر ترکیبات و غلظت‌های مختلف تنظیم‌کننده‌های رشد بر باززایی

این آزمایش به منظور بررسی اثر ترکیبات و غلظت‌های مختلف تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی بر میزان باززایی ریزنمونه‌های کوتیلدن، هیپوکوتیل، گره و نوک شاخساره به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با چهار تکرار انجام گردید. فاکتورهای آزمایشی شامل ترکیب هورمون IAA در سه سطح (صفر، ۰/۱ و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر) با Kin در چهار سطح (صفر، یک، سه و پنج میلی‌گرم در لیتر) بودند (جدول ۱). واکشت ریزنمونه‌ها هر سه هفته یک‌بار انجام گردید و پس از سه بار واکشت، میزان القای جوانه و تعداد شاخه‌های باززایی شده در هر تیمار و در هر تکرار محاسبه گردید.

**جدول ۱. ترکیبات مختلف تنظیم‌کننده رشد گیاهی جهت مطالعه باززایی گیاه بذرالبنج مشبک در شرایط درون‌شیشه**

| تیمار | ترکیبات هورمونی |
|---|---|
| $T_1$ | control |
| $T_2$ | 1 mg.l$^{-1}$ Kin |
| $T_3$ | 3 mg.l$^{-1}$ Kin |
| $T_4$ | 5 mg.l$^{-1}$ Kin |
| $T_5$ | 0.1mg.l$^{-1}$ IAA |
| $T_6$ | 1 mg.l$^{-1}$ Kin + 0.1 mg.l$^{-1}$ IAA |
| $T_7$ | 3 mg.l$^{-1}$ Kin + 0.1 mg.l$^{-1}$ IAA |
| $T_8$ | 5 mg.l$^{-1}$ Kin + 0.1 mg.l$^{-1}$ IAA |
| $T_9$ | 0.5 mg.l$^{-1}$ IAA |
| $T_{10}$ | 1 mg.l$^{-1}$ Kin + 0.5 mg.l$^{-1}$ IAA |
| $T_{11}$ | 3 mg.l$^{-1}$ Kin + 0.5 mg.l$^{-1}$ IAA |
| $T_{12}$ | 5 mg.l$^{-1}$ Kin + 0.5 mg.l$^{-1}$ IAA |

## آزمایش بررسی اثر نوع محیط کشت پایه و غلظت IBA و IAA بر ریشه‌زایی

این آزمایش به منظور بررسی تأثیر غلظت نمک (MS) و هورمون‌های IAA و IBA بر میزان ریشه‌زایی گیاهچه‌های باززایی شده در آزمایشگاه انجام گرفت. تیمارهای آزمایشی شامل محیط کشت $\frac{1}{2}$ MS و MS در غلظت‌های ۱/۱ و ۲/۲ میکرومولار IAA و IBA بودند. همچنین محیط کشت $\frac{1}{2}$ MS و MS فاقد هورمون به عنوان تیمار شاهد مورد آزمایش قرار گرفت. آزمایش به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی در چهار تکرار صورت پذیرفت. در پایان واکشت‌ها میانگین القای ریشه حاصله اندازه‌گیری گردید.

## سازگاری

گیاهچه‌های ریشه‌دار شده به داخل گلدان‌های پلاستیکی با بستری از پیت و پرلیت به نسبت (۳ به ۱) تغذیه شده با محلول ½MS منتقل شدند. برای حفظ رطوبت نسبی، گلدان‌ها در جعبه پلاستیکی شفاف قرار گرفته و در اتاق رشد نگهداری شدند. بعد از ۲۱ روز، درپوش جعبه پلاستیکی به‌تدریج باز و گیاهچه‌های سازگار شده نهایتاً به گلخانه منتقل شدند.

## روش تجزیه آماری

تجزیه آماری داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار آماری SPSS و مقایسه میانگین‌ها با آزمون چنددامنه‌ای دانکن (DMRT)[1] انجام و نمودارها با استفاده از نرم‌افزار Excel رسم شد.

## نتایج و بحث

### اثر غلظت‌های مختلف Kin و IAA بر میانگین القای جوانه

نتایج جدول تجزیه واریانس نشان داد که اثر متقابل در ریزنمونه‌های کوتیلدن، هیپوکوتیل و گره در ترکیبات مختلف هورمونی و در ریزنمونه نوک شاخساره اثر ساده کینتین بر میانگین القای جوانه در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بوده است (جدول‌های ۲ و ۳). براساس مقایسه میانگین‌های انجام شده طبق آزمون دانکن، بیشترین میانگین القای جوانه (۳۲/۵۰ و ۳۱ جوانه در هر ریزنمونه) در ریزنمونه کوتیلدن به‌ترتیب در محیط کشت حاوی یک میلی‌گرم در لیتر Kin و ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر IAA و پنج میلی‌گرم در لیتر Kin و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر IAA به‌دست آمد. در ریزنمونه هیپوکوتیل حداکثر القای جوانه (۳۱/۶۳ و ۳۱/۳۱ جوانه در هر ریزنمونه ) به ترتیب در محیط کشت MS حاوی سه میلی‌گرم در لیتر Kin و ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر IAA و پنج میلی‌گرم در لیتر Kin و ۰/۵ میلی‌گرم مشاهده گردید و در ریزنمونه گره بالاترین مقدار القای جوانه (۳۷/۳۱ جوانه در هر ریزنمونه) در محیط کشت MS تکمیل شده با یک میلی‌گرم در لیتر Kin و ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر IAA به‌دست آمد. همچنین در ریزنمونه نوک شاخساره در همه تیمارها، القای جوانه مشاهده گردید که تفاوت معنی‌داری با تیمار شاهد نشان دادند (شکل‌های ۱، ۲، ۳ و ۴).

**جدول ۲. نتایج تجزیه واریانس اثر ترکیب تنظیم‌کننده رشد Kin و IAA بر میانگین القای جوانه از ریزنمونه‌های کوتیلدن، هیپوکوتیل، گره و نوک شاخساره گیاه بذرالینج مشبک[1]**

| منابع تغییرات | درجه آزادی | میانگین القای جوانه | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | کوتیلدن | هیپوکوتیل | گره | نوک شاخساره |
| Kin | ۳ | ۱۵۸۱/۱۹۲$^{**}$ | ۱۶۶۴/۷۵۵$^{**}$ | ۱۱۸۶/۰۱۴$^{**}$ | ۱۰۵۶/۵۵۳$^{*}$ |
| IAA | ۲ | ۲۴۸/۳۷۱$^{**}$ | ۲۳۲/۶۵۸$^{**}$ | ۶۷/۰۳۰$^{*}$ | ۲۶۴/۲۲۸$^{ns}$ |
| IAA × BAP | ۶ | ۱۷۷/۶۳۵$^{**}$ | ۶۳/۴۰۶$^{**}$ | ۱۹۲/۴۰۵$^{**}$ | ۱۳۰/۱۹۷ $^{ns}$ |
| اشتباه آزمایشی | ۳۶ | ۱/۳۸ | ۳/۷۷۰ | ۲۸/۵۶۷ | ۲۸/۵۶۷ |

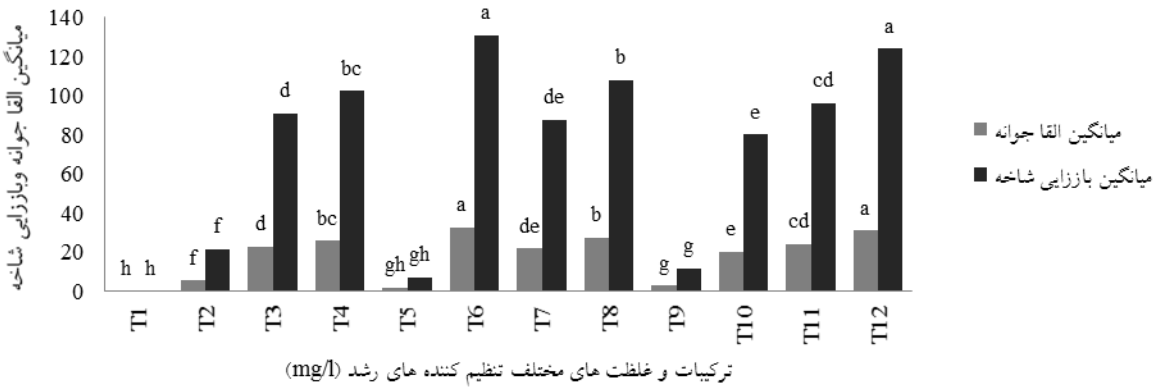
** – معنی‌دار بودن در سطح احتمال ۱ درصد، * – معنی‌دار بودن در سطح احتمال ۵ درصد، ns – عدم معنی‌دار بودن

1. Duncan's Multiple Range Test

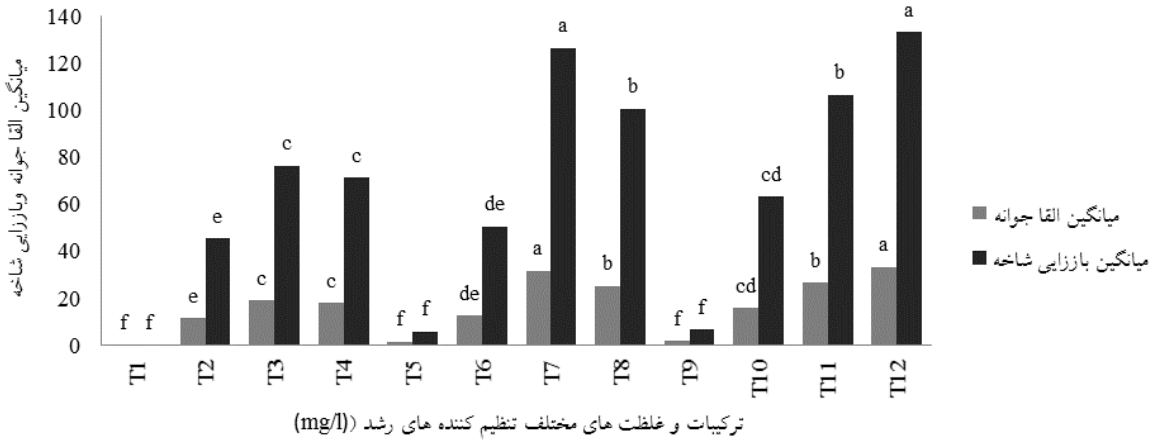
**جدول ۳. جدول تجزیه واریانس اثرات نوع ریزنمونهKin بر میانگین القای جوانه در بذرالبنج مشبک**

| منابع تغییرات | درجه آزادی | میانگین مربعات |
|---|---|---|
| ریزنمونه | ۳ | ۱۴۷۴/۹۶۸** |
| Kin | ۳ | ۴۵۱۴/۱۱۰** |
| اکسین | ۲ | ۱۰۲۲/۶۲۰* |
| ریزنمونه × Kin | ۹ | ۲۵۱/۷۲۵** |
| ریزنمونه × اکسین | ۶ | ۷۱/۶۹۸* |
| Kin × اکسین | ۶ | ۱۶۹/۶۶۳* |
| Kin × اکسین × ریزنمونه | ۱۸ | ۱۴۷/۷۵۲** |
| اشتباه آزمایشی | ۱۴۱ | ۵۴/۸۲۰ |
| ضریب تغییرات (٪) | | ۲۸/۴۶ |

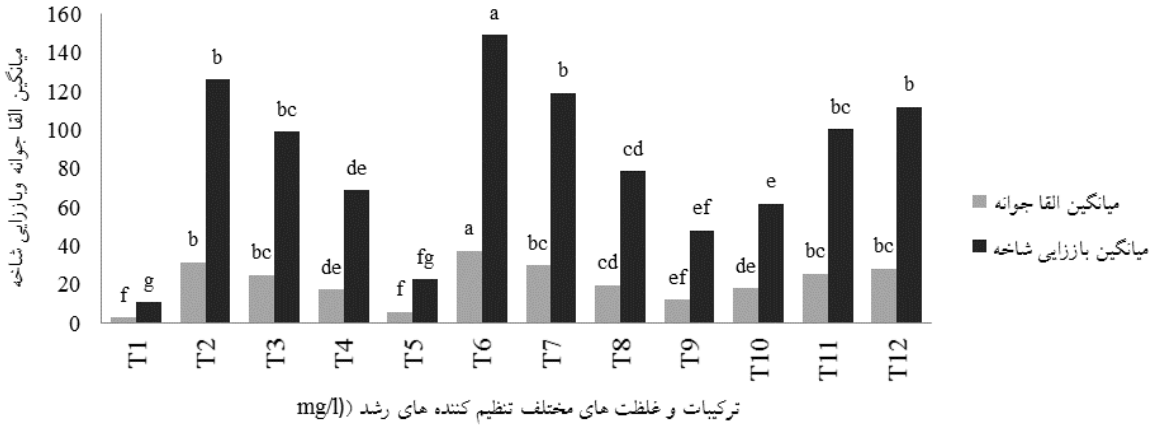
* و ** – به‌ترتیب نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در سطوح یک و پنج درصد می‌باشد.




**شکل ۱. تأثیر ترکیبات و غلظت‌های مختلف Kin و IAA بر میانگین القا جوانه و باززایی شاخه در ریزنمونه کوتیلدن گیاه بذرالبنج مشبک. حروف غیرمشابه نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار در سطح احتمال ۱ درصد بین میانگین‌ها در آزمون دانکن می‌باشد.**



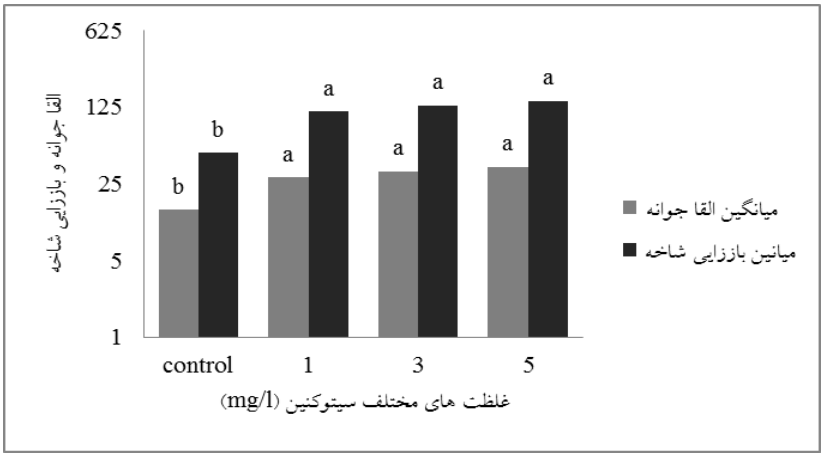

**شکل ۲. تأثیر ترکیبات و غلظت‌های مختلف Kin و IAA بر میانگین القای جوانه و باززایی شاخه در ریزنمونه هیپوکوتیل گیاه بذرالبنج مشبک. حروف غیرمشابه نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار در سطح احتمال ۱ درصد در بین میانگین‌ها در آزمون دانکن می‌باشند.**




**شکل ۳. تأثیر ترکیبات و غلظت‌های مختلف Kin و IAA بر میانگین القای جوانه و باززایی شاخه در ریزنمونه گره گیاه بذرالبنج مشبک. حروف غیرمشابه نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار در سطح احتمال ۱ درصد در بین میانگین‌ها در آزمون دانکن می‌باشند.**

**اثر غلظت‌های مختلف Kin و IAA بر باززایی شاخه**

نتایج آنالیز واریانس داده‌ها نشان داد که اثر متقابل ریزنمونه‌های کوتیلدن، هیپوکوتیل و گره در کینتین، ایندول استیک اسید و در ریزنمونه نوک شاخساره اثر ساده کینتین بر میانگین باززایی شاخه در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بوده است (جدول‌های ۴ و ۵). براساس مقایسه میانگین‌های انجام شده طبق آزمون دانکن، حداکثر میانگین باززایی شاخه در ریزنمونه کوتیلدن در محیط کشت حاوی ۱ میلی‌گرم در لیتر Kin و ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر IAA (۱۳۱ گیاهچه در هر تیمار) و پنج میلی‌گرم در لیتر Kin و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر IAA (۱۲۴ گیاهچه در هر تیمار)، در ریزنمونه هیپوکوتیل در محیط کشت حاوی ۳ میلی‌گرم در لیتر Kin و ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر IAA (۱۲۶/۵۰ گیاهچه در هر تیمار) و پنج میلی‌گرم در لیتر Kin و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر (۱۳۳/۲۵ گیاهچه در هر تیمار)، در ریزنمونه گره در محیط کشت تکمیل شده با یک میلی‌گرم در لیتر Kin و ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر IAA (۱۴۹/۲۵ گیاهچه در هر تیمار) مشاهده گردید (شکل‌های ۱، ۲ و ۳). همچنین در ریزنمونه نوک شاخساره در همه تیمارها باززایی شاخه مشاهده گردید که تفاوت معنی‌داری با تیمار شاهد داشتند (شکل ۴).




**شکل ۴. اثر سیتوکنین بر باززایی ریزنمونه نوک شاخساره گیاه بذرالبنج مشبک**

**جدول ۴. جدول تجزیه واریانس اثر ترکیب تنظیم‌کننده رشد Kin و IAA بر میانگین باززایی شاخه از ریزنمونه‌های کوتیلدن، هیپوکوتیل، گره و نوک شاخساره**

| منابع تغییرات | درجه آزادی | میانگین باززایی شاخه | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | کوتیلدن | هیپوکوتیل | گره | نوک شاخساره |
| Kin | ۳ | ۲۵۳۱۴/۲۴۳** | ۲۶۶۳۶/۰۷۶** | ۱۸۱۴۴/۲۴۳** | ۲۱۶۹۰/۴۴۴** |
| IAA | ۲ | ۴۰۲۰/۷۷۱** | ۳۷۲۲/۵۲۱** | ۱۱۴۰/۶۴۶ns | ۳۰۳۰/۱۴۶ns |
| IAA × BAP | ۶ | ۲۸۹۱/۳۲۶** | ۱۰۱۴/۴۹۳** | ۳۶۹۷/۴۵۱** | ۱۳۹۴/۲۵۷ns |
| خطای آزمایشی | ۳۶ | ۲۵/۵۶۳ | ۶۰/۳۲۶ | ۴۰۸/۲۲۹ | ۸۳۵/۵۶۹ |

** – اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۱ درصد، ns – عدم وجود اختلاف معنی‌دار

**جدول ۵. تجزیه واریانس اثرات نوع ریزنمونه و Kin بر میانگین باززایی شاخه در بذرالبنج مشبک**

| منابع تغییرات | درجه آزادی | میانگین مربعات (MS) |
|---|---|---|
| ریزنمونه | ۳ | ۲۱۱۴۸/۲۵۳ ** |
| Kin | ۳ | ۷۶۶۶۹/۷۲۹** |
| اکسین | ۲ | ۱۴۸۱۰/۸۲۸** |
| ریزنمونه × Kin | ۹ | ۲۲۹/۷۰۶** |
| ریزنمونه × اکسین | ۶ | ۱۲۵۳/۷۹۳* |
| Kin × اکسین | ۶ | ۲۸۲۵/۲۲۴** |
| Kin × اکسین × ریزنمونه | ۱۸ | ۲۳۲۴/۸۴۶** |
| اشتباه آزمایشی | ۱۴۱ | ۸۲۰/۵۵ |
| ضریب تغییرات (٪) | | ۲۱/۷۵ |

* و ** – به ترتیب نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در سطوح پنج و یک درصد می‌باشد.

در تیمار شاهد ریزنمونه‌های کوتیلدن و هیپوکوتیل باززایی شاخه و القای جوانه صورت نگرفت و در تیمار شاهد ریزنمونه‌های گره و نوک شاخساره کمترین میانگین القای جوانه و باززایی شاخه مشاهده گردید.

تکثیر درون‌شیشه‌ای به وسیله فاکتورهای متعددی تحت تأثیر قرار می‌گیرد، یکی از فاکتورهای بسیار مهم نوع و غلظت و نسبت تنظیم‌کننده‌های رشد اضافه شده به محیط کشت می‌باشد که در کشت درون‌شیشه‌ای جهت تسریع در رشد استفاده می‌شود [۲۰]. به عنوان یک قاعده کلی جهت انجام هرچه بهتر رشد، اکسین یا سیتوکنین و یا هر دو با هم به محیط کشت افزوده می‌شوند [۷]، ولی نسبت مناسب اکسین به سیتوکنین به نوع گونه و ریزنمونه بستگی دارد. نتایج این آزمایش نیز نقش مؤثر تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی در پاسخ ریزنمونه‌ها را مشخص نمود.

در ارتباط با اثر تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی، نوع، غلظت و نسبت هورمون‌ها در موفقیت کشت بافت، تحقیقات متعددی انجام شده است. معمولاً جهت شاخه‌زایی از هورمون‌های سیتوکنینی استفاده می‌شود [۲۶]. نوع ریزنمونه، محیط رشد و سطوح هورمون‌های داخلی در القای شاخساره تأثیر می‌گذارند و این فاکتورها باعث تفاوت در مشاهدات می‌شوند [۱۵].

منبع ریزنمونه مورد استفاده، برای تعیین اندام و پتانسیل تولید مهم است که به‌طور معنی‌داری تحت تأثیر شرایط فیزیولوژیکی و فتوسنتزی گیاه والد قرار می‌گیرد [۱۲ و ۲۲]. سن فیزیولوژیکی ریزنمونه‌ها، نوع و اندازه ریزنمونه‌ها از فاکتورهای دیگری است که بر تشکیل اندام‌های درون شیشه مؤثر هستند [۲۳]. در گیاهان مختلف از بخش‌های هوایی گیاهان به عنوان ریزنمونه استفاده شده است. به عنوان مثال، در کور (*Capparis spinosa* L.) از ریزنمونه هیپوکوتیل [۶]، در گیاه *Benincasa hispida* از کوتیلدن [۱۶]، در گیاه نعناع فلفلی از ریزنمونه گره [۲۵] و در گیاه پرسیاوش (*Ginkgi biloba*) از ریزنمونه مریستم انتهایی، برگ و دمبرگ [۲] استفاده شده است. در بررسی تأثیر ۴ ریزنمونه (مریستم انتهایی، گره، کوتیلدن و قطعات برگ) در باززایی درون شیشه‌ای بادرنجبویه (*Mehissa officinalis*) گزارش نمودند که حداکثر درصد باززایی در

ریزنمونه مریستم انتهایی (۹۴/۵ گیاهچه در هر ریزنمونه) و بیشترین میانگین باززایی در ریزنمونه گره (۳۴/۹ گیاهچه در هر ریزنمونه) مربوط به تیمار ۲۲ میکرومول BA بود در حالی که ریزنمونه کوتیلدن و قطعات برگ باززایی نشان ندادند [۴].

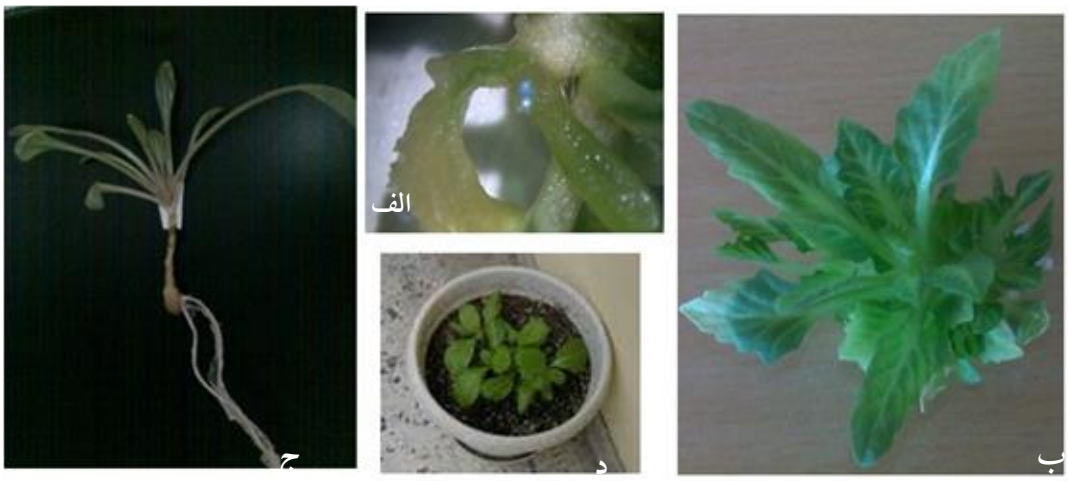
بیشترین باززایی از ریزنمونه نوک شاخساره و در محیط حاوی غلظت‌ها و ترکیبات مختلف تنظیم‌کننده‌های رشد به‌دست آمد (شکل ۵- الف و ب). در این رابطه، محققین در آزمایشات خود بر روی اثرات غلظت‌های مختلف Kinبر روی باززایی گیاه زینتی *Matthiolain cana* مشاهده کردند که با افزایش غلظت Kin تعداد و طول شاخه‌های پرآوری شده افزایش یافت [۸]. سیتوکینین‌ها بر غالبیت انتهایی غلبه می‌کنند، باعث القای تعداد زیادی جوانه شاخه شده و باعث از بین رفتن خواب جوانه‌های جانبی می‌شوند. بنابراین انتخاب غلظت مناسب تنظیم‌کننده رشد گیاهی، مرحله بحرانی در باززایی شاخه است [۱۱].

موقعیت ریزنمونه بر روی گیاه مادری بر روی رشد و نمو مؤثر است و هرقدر از قسمت بالاتر گیاه ریزنمونه تهیه شود، احتمال موفقیت در کشت بافت بیشتر خواهد بود [۱]. بنابراین احتمال می‌رود علت عملکرد موفقیت‌آمیز ریزنمونه نوک شاخساره نسبت به سایر ریزنمونه‌ها همین موضوع باشد. همچنین در محیط شاهد (بدون تنظیم‌کننده رشد) باززایی بسیار کم مشاهده گردید که این امر نشان‌دهنده اهمیت سیتوکینین‌ها در تحریک پرآوری و تقسیم سلولی در ریزنمونه‌های کشت شده و تشکیل اندام در بافت‌های تیمار شده با سیتوکینین است. به‌طورکلی، تنظیم‌کننده رشد Kin در تعادل با غلظت‌های اکسین، ریزنمونه‌ها را در جهت افزایش طول سلول‌ها و درنتیجه افزایش تولید شاخساره کامل پیش برده است [۱۲].

## بررسی اثرات غلظت نمک (MS) و تنظیم-کننده‌های رشد IAA و IBA بر ریشه‌زایی گیاهچه‌های باززایی شده

در تحقیق حاضر، اثر غلظت نمک در محیط کشت پایه MS و تیمار هورمونی IAA و IBA به منظور ارزیابی پاسخ گیاهچه‌های باززایی شده جهت ریشه‌زایی انجام گردید. حدود چهار هفته بعد از قرار گرفتن گیاهچه‌های حاصل از باززایی در محیط ریشه‌زایی، گیاهچه‌های ریشه‌دار شده با دقت از شیشه‌ها خارج و ریشه‌های القاء شده شمارش شدند. نتایج تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که اثرات ساده و متقابل محیط کشت و هورمون بر القای ریشه در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بود (جدول ۶). مقایسه میانگین اثرات متقابل هورمون و محیط بر القای ریشه نشان داد که محیط کشت MS حاوی ۱/۱ و ۲/۲ میکرومول هورمون IBA با میانگین ۸۷/۵۰ بیشترین میانگین القای ریشه را ایجاد کرد. میانگین القای ریشه ایجاد شده در محیط کشت $MS^{1/2}$ حاوی ۱/۱ میکرومول IBA، ۵۰ بود و در سایر تیمارها ریشه‌زایی مشاهده نگردید (شکل‌های ۵- ج و شکل ۶). ریزشاخه‌هایی که در محیط کشت بدون اکسین قرار داده شدند، ریشه‌ای ایجاد نکردند. نتایج مشابهی در کشت درون‌شیشه‌ای گیاه بادرنجبویه به‌دست آمده است [۴،۱۳].

ریشه‌زایی به‌وسیله عوامل مختلفی نظیر وجود تنظیم-کننده‌های رشد در محیط، ترکیب نمک‌های پایه، ژنوتیپ و شرایط محیطی تحت تأثیر قرار می‌گیرد. اکسین‌ها نقش مهمی در ریشه‌زایی دارند و برای بیشتر گونه‌ها وجود اکسین برای انگیزش ریشه‌زایی لازم است [۱۷ و ۳۰]. اکسین مراحل پیچیده تشکیل ریشه جانبی (Lateral) را از طریق تکرار تقسیم سلولی القاء می‌کند [۱۶].

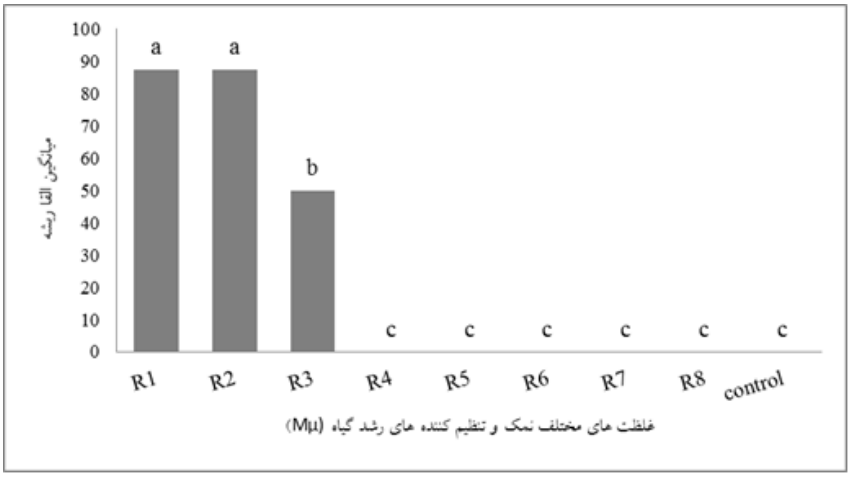



**شکل ۵ . مراحل کشت بافت: الف – جوانه‌های القا شده در محیط حاوی پنج میلی‌گرم بر لیتر Kin در ترکیب با ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر IAA ۶ هفته بعد از کشت، ب – گیاهچه‌های باززا شده ۹ هفته بعد از کشت، ج – گیاهچه‌های ریشه‌دار شده در محیط MS حاوی ۲/۲ میکرومول IBA و د – گیاهچه‌های سازگار شده.**

**جدول ۶ . جدول تجزیه واریانس اثرات متقابل غلظت نمک در محیط کشت پایه MS و تیمار هورمونی بر میانگین القای ریشه گیاه بذرالبنج مشبک**

| منابع تغییرات | درجه آزادی | میانگین مربعات القا ریشه |
|---|---|---|
| غلظت نمک | ۱ | ۷۸۱۲/۵۰۰** |
| تیمار هورمونی | ۳ | ۹۲۷۰/۸۳۳** |
| اثر متقابل غلظت نمک × تیمار هورمونی | ۳ | ۳۴۳۷/۵۰۰** |
| خطای آزمایشی | ۲۱ | ۵۹/۵۲۴ |

** – اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۱ درصد




**شکل ۶. اثر محیط‌های مختلف ریشه‌زایی بر میانگین القای ریشه‌های تولید شده در محیط کشت‌های MS و $^{1/2}$MS حاوی غلظت‌های مختلف IAA و IBA گیاه بذرالبنج مشبک**

$R_1$ = MS + 1.1µM IBA, $R_2$ = MS + 2.2µM IBA, $R_3$ = $^{1/2}$MS + 1.1µM IBA, $R_4$ = $^{1/2}$MS + 2.2µM IBA, $R_5$ = MS + 1.1µM IAA, $R_6$ = MS + 2.2µM IAA, $R_7$ = $^{1/2}$MS + 1.1µM IAA, $R_8$ = $^{1/2}$MS + 2.2 µM IAA

در کل ریشه‌زایی گیاهچه‌های بذرالبنج مشبک در محیط MS و در حضور IBA بهتر از سایر تیمارها بود که این نتایج با نتایج حاصل از تحقیق انجام شده در مورد گیاه *Curculigo latifolia* مطابقت دارد [۱۱]. همچنین دیگر گزارشات، ریشه‌زایی گیاهچه‌های ماریتیغال (*Silybum marianum*) در محیط MS حاوی ۰/۲۵ میلی-گرم در لیتر IBA نشان می‌دهند [۲۴.]

## سازگاری

موفقیت هر دستورالعمل کشت بافت، بستگی به سازگاری موفق گیاهچه‌های به‌دست آمده از کشت درون‌شیشه‌ای در شرایط گلخانه و مزرعه دارد [۱۹]. در تحقیق حاضر، گیاهچه‌های به‌دست آمده از کشت درون‌شیشه‌ای که پس از ریشه‌دار شدن به گلدان‌های پلاستیکی برای سازگاری منتقل شده بودند، پس از ۱۰ روز با ۹۰ درصد زنده‌مانی به شرایط گلخانه منتقل شدند (شکل ۵- د). درنتیجه، با استفاده از تکنیک کشت بافت و با ریزنمونه‌های جوانه‌های انتهایی در یک محیط مغذی حاوی سیتوکینین یا ترکیب سیتوکینین و اکسین مناسب، میزان و سرعت تکثیر شاخه می‌تواند به میزان زیادی افزایش یابد.

## منابع


۱. باقری ه و آزادی پ (۱۳۸۱) کشت بافت گیاهی (تکنیک‌ها و آزمایش‌ها). چاپ اول، انتشارات دانشگاه مشهد. ۱۵۴ ص.

۲. تولیت م، عبدلی م، مشکین م، سیگارودی ف و امیدی م (۱۳۸۷) بررسی کشت درون‌شیشه‌ای گیاه ژینکوبیلوبا از طریق کشت بافت ریزنمونه‌های مختلف. گیاهان دارویی. ۳۲: ۱۶۲-۱۵۶.

۳. چلبیان ف و مجد ا (۱۳۸۳) بررسی تغییر میزان آلکالوئیدهای تروپان در مراحل مختلف رشد گیاه *Hyoscyamus reticulatus* L. در شرایط طبیعی و تأثیر تغییر عناصر و قند بر بیوسنتز این آلکالوئیدها در کشت بافت آن. گیاهان دارویی. ۱۰: ۴۶-۳۹.

۴. جنگجو خ (۱۳۹۱) بررسی فاکتورهای مؤثر در باززایی درون‌شیشه‌ای بادرنجبویه (*Melissa officinalis*). دانشگاه ارومیه. ارومیه. پایان‌نامه کارشناسی ارشد.

۵. معاونی پ (۱۳۸۸) گیاهان دارویی، جلد اول. چاپ اول. انتشارات دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهر قدس. ۱۱۲۹ ص.

۶. موافقی ع، حبیبی ق و علی اصغرپور م (۱۳۸۷) باززایی گیاه دارویی کور (*Capparis spinosa* L.) با استفاده از کشت قطعات هیپوکوتیل. زیست‌شناسی ایران. ۲(۲۱): ۱۰-۱

۷. وصال س و باقری ع (۱۳۸۲) عملیات کشت بافت‌های گیاهی. انتشارات آستان قدس رضوی. ۲۰۰ ص.

8. AhmadiHesar A, Kaviani B, Tarang A and BohlooliZanjani S (2011) Effect of different concentrations of etin on regeneration of ten weeks (Matthiolaincana). Plant Omics. 4(5): 236-238.

9. Arteca RN (1996) Plant growth substances principles and applications. Pensylvania University. 325P.

10. Ashok K and Bashir JM (2010) *In vitro* propagation of a medicinal plant *Portulaca grandiflora* Hook. Agricultural Sciences. 6(3): 327-330.

11. Babaei N, Abdullah N, Saleh G and Lee Abdullah T (2014) An efficient *in vitro* plantlet regeneration from shoot tip cultures of *Curculigo latifolia*, a medicinal plant. The Scientific World. Pp. 1-9.

12. Debergh PC and Maene LJ (1981) Ascheme for commercial propagation of ornamental plants by tissue culture. Scientia Horticulturae. 14: 335-345.

13. Deliu C, Keul A, Munteanu-Deliu C, Cost A, ŞTEFĂNESCU C and Tamas M (2002) Tropane Alkaloid biosynthesis in tissue cultures of scopolia carniolica JACQ. Contribuţii Botanice. Pp. 155-164.

14. Ghorbanpour M, Omidi M, Etminan A, Hatami M and Shooshtari L (2013) *In vitro* hyoscyamine and scopolamine production of black henbane (*Hyoscyamus niger*) from shoot tip culture under various plant growth regulators and culture medi. Trakia Science. (2): 125-134.

15. Kesari V, Ramesh AM and Rangan L (2012) High frequency direct organogenesis and evaluation of genetic stability for *in vitro* regenerated *Pongamiapinnata*, a valuable bio die sell plant. Biomass and Bioenergy. 44: 23-32.

16. Liu E, Leung D, Hua Xia Q, Zheng J, Xiang Peng X and Ming He X (2013) Efficient plant regeneration *in vitro* from cotyledon explants of chieh-qua *Benincasa hispida* Cogn. var.*chieh-qua*. Research Article. Pp. 134-138.

17. Nandagopal S and RanjithaKumari BD (2007) Effectiveness of auxin induced *in vitro* root culture in *Chicory*. Centrol European Agriculture. 8: 73-79.

18. Mohinder K, Ajmer Singh D, Jagdeep Singh S, Amrik Singh S and Satbir Singh G (2013) Effect of media composition and explant type on the regeneration of eggplant (*Solanum melongena* L.). Biotechnology. 12(8): 860-866.

19. Nejadhabibvash F, Rahmani F, Heidari R and Jamei R (2012) Heritability and correlation studies of fatty acid composition within *Hyoscyamus* accessions. Applied and BasicSciences. 3(9): 1837-1844.

20. Nolawade SM and Tsay HS (2004) *In vitro* propagation of some important chinese medicinal plants and their sustainable usage. *In vitro* Cellular and Developmental Biology Plant. 40: 143-154.

21. Oto G, Ozdemir H, Yaren B, Yetkin Y, Tas A and Tantitanir P (2013) Antinociceptive activity of methanol extract of *Hyoscyamus reticulatus* L. Phytomedicine and Clinical Therapeutics. Pp. 177-123.

22. Read PE (1988) Stock plant influence micropropagation success. Acta. Horticulture. 226: 41-52.

23. Rout G, Saxeena C, Samantaray S and Das P (1999) Rapid clonal propagation of Plumbago zeylanica Linn. Plant Growth Regulation. 28: 1-4.

24. SamandariGikoo T, Elhami B and Khosrowchahi M (2012) Effects of explants type, plant growth regulators and actived charcoal on direct organogenesis of *Silybum marianum*. Biotechnology. 11(37): 9023-9027.

25. Sarwar S, Zia M, Riaz-ur R, Zarrin F and Riaz A (2009) *In vitro* direct regeneration in mint from different explants on half strength MS medium. Biotechnology. 8(18): 4667-4671.

26. Sidhu S (2010) *In vitro* micropropagation of medicinal plants by tissue culture. The Plymouth Student. 4(1): 432-446.

27. Singh Negi R, Chand Sharma K and Sharma M (2011) Micropropagation and anatomical comparision of *in vivo* and *in vitro* developed shoot and root in *Cassia auriculata* L. a medicinally important plant. Fundamental and Applied Life Sciences. 1(1): 21-29.

28. Spiridon E (2010) Tissue Culture, somatic embryogenesis, micropropagation and biotransformation. Chromatographia. 60: 555-559.

29. Venkatromalingam K and Ebbie MG (2011) An efficient *in vitro* culture method of shoot regeneration coramedicinaly important plant *Mentha piperita*. Plant Sciences. 10: 1-5.

30. Vuylasteker C, Dewaele S and Rambour S (1998) Auxin induced lateral root formation in Chicory. Annals Botany. 81: 449-454.