# بررسی اثر تنظیم کننده‌های رشدی بر باززایی بذرالبنج مشبک از ریزنمونه گره (*Hyoscyamus reticulatus* L.)

**مهسا امین نژاد[1]، بهمن حسینی[2]**

۱-دانشجوی اسبق کارشناسی ارشد فیزیولوژی و اصلاح گیاهان دارویی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات، تهران ۲- دانشیار گروه باغبانی، دانشگاه ارومیه

*نویسنده مسئول: m_aminnejad@yahoo.com

## چکیده

بذرالبنج مشبک (*Hyoscyamus raticulatus* L.) گیاهی است علفی، دو ساله و متعلق به خانواده سیب‌زمینیان (Solanaceae) می‌باشد. در این تحقیق اثر تنظیم کننده‌های رشدی، Kin و TDZ در چهار سطح (۵ mg/l و۳، ۱، ۰) و IAA در سه سطح (mg/l ۰/۵ و۰/۱ ، ۰) بر باززایی ریزنمونه گره مورد بررسی گردید. داده برداری پس از ۹ هفته و پس از سه بار واکشت انجام شد. پس از آنالیز داده‌ها بالاترین میانگین القا جوانه (با میانگین ۳۷/۳۱ جوانه در هر ریزنمونه) در محیط حاوی یک میلی‌گرم در لیتر Kin در ترکیب با ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر IAA و کمترین کمترین میانگین باززایی در تیمار شاهد( ۲/۰۶۳ جوانه در هر ریزنمونه) مشاهده گردید همچنین بیشترین شاخه باززا شده در محیط کشت MS حاوی ۱ میلی‌گرم در لیتر Kin در ترکیب با ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر IAA با میانگین ۱۴۹/۲۵ و کمترین شاخه باززا شده در تیمار شاهد با میانگین ۱۰/۷۵ بوده است. از محیط کشت MS و 1/2MS حاوی غلظتهای مختلف هورمون‌های IBA (mg/l) و IAA به منظور ارزیابی پاسخ گیاهچه‌های باززایی شده جهت ریشه‌زایی استفاده گردید. نتایج مطالعات ریشه زایی نشان داد که نوع محیط کشت پایه و ترکیب هورمونی بر القا ریشه دارای اثر معنی داری می‌باشد. بیشترین میانگین القاء ریشه (۸۷/۵۰) در محیط کشت MS حاوی ۱/۱ و ۲/۲ میکرومول هورمون IBA تولید گردید. در محیط کشت 1/2 MS حاوی ۱/۱ میکرومول IBA، میانگین القاء ریشه ۵۰ ثبت گردید و در سایر تیمارها ریشه‌زایی مشاهده نگردید. گیاهچه‌های بدست آمده از کشت درون شیشه‌ای، که پس از ریشه‌دار شدن به گلدان‌های پلاستیکی برای سازگاری منتقل شده بودند، پس از ۳ هفته با ۹۰ درصد زنده‌مانی به شرایط گلخانه منتقل شدند.

**کلمات کلیدی:** بذرالبنج مشبک، کشت درون شیشه‌ای، ریزنمونه، تنظیم‌کننده رشدگیاه، باززایی مستقیم

### مقدمه

بذرالبنج مشبک (*Hyoscyamus reticulatus* L. ) از مهمترین گیاهان دارویی و ادویه‌ای، بومی مناطق اروپا ، علفی، دوساله و متعلق به تیره سولاناسه می‌باشد. این گیاه دارویی از نظر آلکالوئیدهای تروپان اهمیت به‌سزایی دارد (چلبیان و مجد،۱۳۸۳). هیوسیامین و آسکوپولامین از آلکالوئیدهای تروپان مهم هستند که به طور طبیعی بوسیله گیاهان این تیره تولید می‌شوند. گونه‌های Hyoscamus منبع غنی از این آلکالوئیدها می‌باشند که از آن‌ها در تهیه داروهای ضد تشنج، بی‌حسی، مسکن و تب‌بر استفاده می‌شود (Supria *et al*, 1998). باززایی و تکثیر گیاهان در شرایط درون شیشه‌ای روش بسیار مفیدی جهت تولید گیاهان عاری از ویروس، تولید گیاهان تراریخت، ریزپیوندی، رفع مشکلات خود ناسازگاری، تولید گیاهان هاپلوئید، تولید متابولیت‌های ثانویه و حفظ ذخایر ژنتیکی و تولید انبوهی از گیاهان در مدت زمان کوتاه می‌باشد. فاکتورهای متعددی بر موفقیت تکثیر درون شیشه‌ای گیاهان دارویی تأثیر می‌گذارند. از مهمترین این فاکتورها، اثرات تنظیم کننده‌های رشد نظیر اکسین و سیتوکینین بر روی شاخساره گیاهان دارویی مختلف می‌باشد. نوع، غلظت و نسبت هورمون‌ها در موفقیت کشت بافت مؤثر است و معمولاً به منظور ریشه‌زایی از هورمونهای اکسینی، جهت شاخه‌زایی از هورمون‌های سیتوکینینی و برای تولید کالوس از نسبت‌های متعادلی از این دو هورمون استفاده می‌شود (Sidhu, 2010). تاکنون بیشترین تعداد ساقه باززاشده در بذرالبنج (*Hyoscyamus niger*) در محیط کشت MS

تکمیل شده با ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA به همراه ۱ میلی‌گرم در لیتر BA گزارش گردیده است (Ghorbanpour, 2013). بیشترین میزان تولید شاخه در گیاه .*Solanum trilobatum* L از ریزنمونه گره در محیط کشت LS همراه با ۴ میلی‌گرم در لیتر BA و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر IAA و از ریزنمونه میانگره در غلظت‌های ۵ میلی‌گرم در لیتر BA و ۰/۰۵ میلی‌گرم در لیتر NAA بدست آمد (Arockiasamy *et al*, 2002). این مطالعه برای اولین بار در بذرالبنج مشبک، به منظور شناخت بهترین، سریع‌ترین و اقتصادی‌ترین روش تکثیر و دست یابی به محیط کشت مناسب برای باززایی و تکثیر گیاه درون شیشه‌ای این گیاه و همچنین تدوین دانش فن کشت درون شیشه‌ای این گیاه در ایران انجام گردید. در این تحقیق اثرات تنظیم کننده‌های رشد نظیر سیتوکنین (TDZ، BA و Kin) و اکسین (IAA) در سرعت تکثیر و پتانسیل باززایی گیاه بذرالبنج مشبک مورد بررسی قرار گرفت.

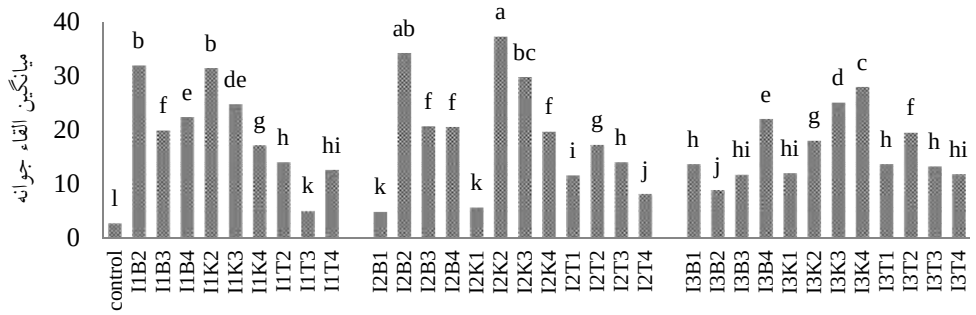
## مواد و روش‌ها

بذر مورد نیاز جهت کشت از باغ گیاهان دارویی دانشکده کشاورزی دانشگاه ارومیه تهیه و تحقیق در مرکز رشد واحدهای فناوری و بیوتکنولوژی جهاد دانشگاهی انجام گردید. پس از ضدعفونی سطحی بذور استریل در محیط کشت پایه MS تکمیل شده با ساکارز ۳ درصد حجمی و آگار ۰/۸ درصد با pH=۵/۷ کشت شدند. شیشه ها در اتاق رشد با دمای C˚ ۲±۲۴و با فتوپریود ۱۶ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی قرار گرفتند، پس از حدود ۳ هفته از گیاهچه‌های رشد کرده ریزنمونه‌های گره تهیه شده و در محیط کشت MS حاوی ترکیب هورمونی BA, Kin, TDZ (۰، ۱، ۳ و ۵) میلی‌گرم در لیتر همراه با IAA (۰، ۰/۱ و ۵) میلی-گرم در لیتر قرار گرفته و به اتاق رشد منتقل شدند. واکشت ریزنمونه‌ها هر ۳ هفته یک‌بار انجام گردید و پس از سه بار واکشت تعداد شاخه‌های باززایی شده در هر تیمار و در هر تکرار محاسبه گردید. تجزیه‌ی آماری داده‌ها توسط نرم افزار SPSS انجام شد.

## نتایج و بحث

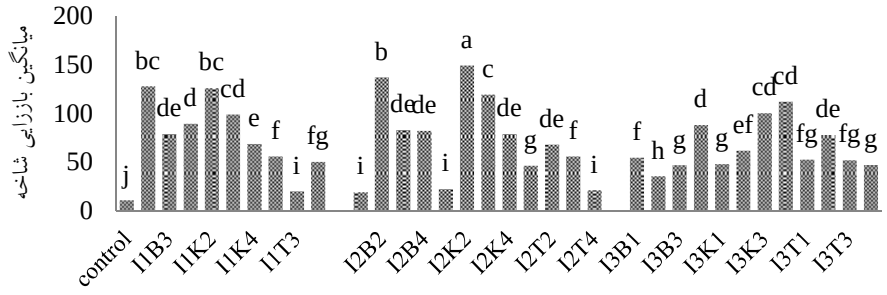
این آزمایش به منظور ارزیابی پاسخ ریزنمونه گره گیاه بذرالبنج مشبک در محیط کشت پایه MS حاوی غلظت‌های مختلف Kin,BA, TDZ در ترکیب با غلظت‌های مختلف IAA انجام گردید. پس از حدود ۳ هفته، القا جوانه‌ها آغاز گردید. پس از ۹ هفته داده‌های بدست آمده مورد تجزیه واریانس قرار گرفتند. نتایج نشان داد که اثر متقابل سیتوکنین و اکسین بر میانگین القاء جوانه و باززایی شاخساره از ریزنمونه‌های گره در سطح احتمال ۱ درصد معنی‌دار می‌باشد. بیشترین میانگین القاء جوانه از ریزنمونه‌ی گره در محیط کشت MS حاوی در محیط کشت حاوی یک میلی‌گرم در لیتر Kin در ترکیب با ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر IAA با میانگین ۳۷/۳۱ و کمترین میانگین القاء جوانه در تیمار شاهد با میانگین ۲/۰۶۳ بدست آمد (شکل۱) و حداکثر میانگین شاخساره باززا شده در محیط کشت MS حاوی ۱ میلی‌گرم در لیتر Kin در ترکیب با ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر IAA با میانگین ۱۴۹/۲۵ و کمترین شاخه باززا شده در تیمار شاهد با میانگین ۱۰/۷۵ بوده است (شکل۲).

در ارتباط با اثر تنظیم کننده‌های رشد گیاهی، نوع، غلظت و نسبت هورمون‌ها در موفقیت کشت بافت مطالعات زیادی انجام و گزارش شده است. معمولا جهت شاخه‌زایی از هورمون‌های سیتوکنینی استفاده می‌شود(Sidhu, 2010). نتایج نشان می‌دهد که تولید شاخساره بیشتر تحت تاثیر سیتوکنین است تا هورمون‌های اکسینی؛ مشاهده شده است که بدون هورمون سیتوکنینی، IAA تاثیری در باززایی شاخساره نداشت (Oluk& Cakir, 2009). Ahmadi Hesar و همکاران (۲۰۱۱) در آزمایشات خود بر روی اثرات غلظت‌های مختلف Kin بر روی باززایی گیاه زینتی *Matthiola incana* مشاهده کردند که با افزایش غلظت Kin تعداد و طول شاخه‌های پرآوری شده افزایش یافت. Ashoc و Bashir (۲۰۱۰) نیز گزارش کردند که سیتوکنین‌ها بر غالبیت انتهایی غلبه می‌کنند، باعث القاء 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.




ترکیبات و غلظت های مختلف تنظیم کننده های رشد ($mg.l^{-1}$)

شکل۱- نمودار مقایسه میانگین اثرات متقابل سیتوکنین و IAA در میانگین القا جوانه در ریزنمونه گره. حروف غیر مشابه نشان دهنده تفاوت معنی‌دار در سطح احتمال ۱ درصد در بین میانگین‌ها در آزمون دانکن می‌باشد.



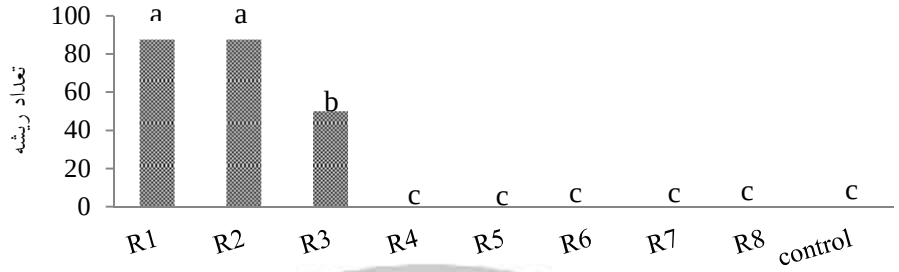

ترکیب و غلظت‌های مختلف تنظیم کننده های رشد گیاهی($mg.l^{-1}$)

شکل۲- نمودار مقایسه میانگین اثرات متقابل سیتوکنین و IAA باززایی شاخه در ریزنمونه گره. حروف غیر مشابه نشان دهنده تفاوت معنی‌دار در سطح احتمال ۱ درصد در بین میانگین‌ها در آزمون دانکن می‌باشد.

نتایج تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که اثرات ساده و متقابل محیط کشت و هورمون بر القا ریشه در سطح احتمال ۱ درصد معنی‌دار بود. مقایسه میانگین اثرات متقابل هورمون و محیط بر القا ریشه نشان داد که محیط کشت MS حاوری ۱/۱ و ۲/۲ میکرومول هورمون IBA با میانگین ۸۷/۵۰ بیشترین میانگین القا ریشه را ایجاد کرد. میانگین القا ریشه ایجاد شده در محیط کشت $MS^{1/2}$ حاوی ۱/۱ میکرومول IBA، ۵۰ بود و در سایر تیمارها ریشه‌زایی صورت نگرفت (شکل۳). ریزشاخه‌هایی که در محیط کشت بدون اکسین قرار داده شدند، ریشه‌ای ایجاد نکردند. نتایج مشابهی در کشت درون شیشه‌ای گیاه بادرنجبویه بدست آمده است (Deliu *et al*, 2002). در کل ریشه‌زایی گیاهچه‌های بذرالبنج مشبک در محیط MS و در حضور IBA بهتر از سایر تیمارها بود، که نتایج ما با نتایج حاصل از تحقیق انجام شده در مورد گیاه *Curculigo latifolia* مطابقت دارد (Babaei, 2014). گزارشات قبلی ریشه‌زایی گیاهچه‌های ماریتیغال (*Silybum marianum*) در محیط MS حاوی ۰/۲۵ میلی‌گرم در لیتر IBA نشان می‌دهند (SamandariGikoo *et al*, 2012).

موفقیت هر پروتکل کشت بافت بستگی به سازگاری موفق گیاهچه‌های بدست آمده از کشت درون شیشه‌ای در شرایط گلخانه و مزرعه دارد (Singh *et al*, 2011). درتحقیق حاضر گیاهچه‌های بدست آمده از کشت درون شیشه‌ای، که پس از ریشه-دار شدن به گلدان‌های پلاستیکی برای سازگاری منتقل شده بودند، پس از ۱۰ روز با ۹۰ درصد زنده‌مانی به شرایط گلخانه منتقل

شدند. می توان چنین نتیجه گرفت که 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 می تواند به میزان زیادی افزایش یابد.




غلظت های مختلف نمک و تنظیم کننده های رشد گیاهی (µM)

شکل۳- اثر محیط‌های مختلف بر میانگین تعداد ریشه‌های تولید شده در محیط کشت MS و $^{1/2}$MS حاوی غلظت‌های مختلف IAA و IBA در بذرالبنج مشبک.

R1=MS+ 1.1µM IBA, R2= MS+2.2µM IBA, R3= $^{1/2}$MS+ 1.1µM IBA, R4=$^{1/2}$MS+ 2.2µM IBA, R5= MS+ 1.1µM IAA, R6= MS+2.2µM IAA, R7= $^{1/2}$MS+ 1.1µM IAA, R8= $^{1/2}$MS+ 2.2 µM IAA

## منابع


۱. چلبیان، ف. و مجد، ا. ۱۳۸۳. بررسی تغییر میزان آلکالوئیدهای تروپان در مراحل مختلف رشد گیاه *Hyoscyamus reticulatus* L. در شرایط طبیعی و تاثیر تغییر عناصر و قند بر بیوسنتز این آلکالوئیدها در کشت بافت آن. فصلنامه گیاهان دارویی. شماره ۱۰.

2. Ahmadi Hesar, A., Kaviani, B., Tarang, A. and Bohlooli Zanjani, S. 2011. Effect of different concentrations of etin on regeneration of ten weeks (*Matthiola incana*). Plant Omics Journal. 4(5): 236- 238.
3. Arockiasamy, D., Muthukumar, B., Natarajan, E., and John Britto, S. 2002. Plant Rageneration From Node and Internod Explants Of *Solanum trilobatum* L . Plant tissue culture . 93-97.
4. Ashok, K., Bashir, J.M. 2010. *In vitro* propagation of a medicinal plant *Portulaca grandiflora* Hook. Agricultural Sciences Journal. 6(3):327- 330.
5. Babaei, N., Abdullah, N., Saleh, G., Lee Abdullah, T. 2014. An efficient *In Vitro* plantlet regeneration from shoot tip cultures of *Curculigo latifolia*, a medicinal plant .The Scientific World Journal. 1-9.
6. Deliu, C., Keul, A., Munteanu-Deliu, C., Cost, A., ŞTEFĂNESCU, C., Tamas, M. 2002. Tropane alkaloid biosynthesis in tissue cultures of *Scopolia Carniolica* JACQ .Contribuţii Botanice Journal. 155-164.
7. 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. Science Journal. 2: 125-134.
8. Oluk, E., Cakir, A. 2009. *Micropropagation of Origanum sipyleun L. an endemic medicinal herb of Turkey*. African Journal of Biotechnology. 8(21): 5769-5772.
9. Samandari Gikoo,T., Elhami, B., Khosrowchahi, M. 2012. Effects of explants type, plant growth regulators and actived charcoal on direct organogenesis of *Silybum marianum*. biotechnology Journal. 11(37): 9023-9027.

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

11. Singh Negi, R., Chand Sharma, K., 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 Journal. 1 (1): 21-29.

12. Supria, KB., Szoke, E., Toth, K., Laszlo, I., Kursinszki, L .1998. Investigation of tropane alkaloids in genetically transformed *Atropa belladonna* L. cultures. Chromatographia. 60: 555-559.

## Effect of plant growth regulators on direct shoot regeneration from node explants of (*Hyoscyamus reticulatus* L.)

**M. Aminnejad[1], B. Hosseini[2]**

1-Department of horticulture, Faculty of agriculture, Islamic azad university, Science and Research branch Tehran,Iran. 2. Assistance Professor, Horticulture Department of Agriculture Faculty of Urmia University-Urmia-Iran- P.O. Box 165

*Corresponding author: m_aminnejad@yahoo.com

### Abstract

*Hyoscyamus reticulatus* L. is an herbaceous, biennial, belonging to Solanaceae family. The effects of plant growth regulators Kin and TDZ on four levels (mg / l 5, 3, 1, 0) and IAA in three levels ( 0, 0.1, 0.5 and mg / l) on shoot regeneration of *H reticulatus* L node explants was investigated. Data were collected after 3 subcultures (9 weeks). Statistical analysis showed the maximum buds inducted (average of 37.31 buds per explant) were in 1 $mg.l^{-1}$ Kin and 0.1 $mg.l^{-1}$ IAA and The lowest average bud induction in control (2.063 buds per explant) were observed, it was also the largest shoot regenerated on MS medium containing 1 $mg.l^{-1}$ Kin in combination with 1.0 $mg.l^{-1}$ IAA with an average of 149.25 shoots per treatment and the lowest shoot with an average of 10/75 shoots per treatment has been regenerated in control. The regenerated shoots were rooted in MS and ½ MS media whit different concentration of IAA and IBA (0, 1.1, 2.2 µM) during four weeks. The maximum average root induction (87.50 roots) were MS medium treatment of 1.1, 2.2 µM IBA. The rooted plantlets were acclimatized successfully in the green house environment with 100% humidity and 90% of survival rate.

**Keywords**: *Hyoscyamus Reticulatus, In Vitro* Culture, Explant, Plant Growth Regulators, Direct Regeneration