بررسی تاثیر تنظیم کننده های رشد گیاهی بر القای کالوس و باززایی مستقیم در زرین گیاه (*Dracocephalum kotschyi* Bioss.)

سپیده بخشایش[1*]، مهدی محب الدینی[1]، بهمن حسینی[2]

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد علوم باغبانی، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل ۱- استادیار گروه علوم باغبانی، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل ۲- استادیار گروه علوم باغبانی، دانشگاه ارومیه، ارومیه

*نویسنده مسئول: s_bakhshayesh68@yahoo.com

چکیده

زرین گیاه یکی از گیاهان خانواده نعناعیان است. این گیاه دارویی مهم و نادر به صورت سنتی در درمان بیماری های روماتسمی، کاهش دهنده تب و درد استفاده می شود. باززایی گیاه توسط کشت بافت روشی مکمل برای افزایش کیفیت و تولید زرین گیاه می‌باشد. این آزمایش به منظور بررسی تنظیم کننده های رشد گیاهی روی القای کالوس و باززایی مستقیم در زرین گیاه انجام شد. محیط کشت MS همراه با غلظت های مختلف BAP (۰، ۱/۵، ۳ و۶ میلی گرم در لیتر) و NAA (۰، ۱/۵، ۳ و۶ میلی گرم در لیتر) برای ریزنمونه برگ به همراه دمبرگ در این آزمایش مورد استفاده قرار گرفت. نتایج نشان داد که بهترین تیمار برای درصد باززایی مستقیم با ۱۷/۴۹ درصد و بیشترین میانگین تعداد نوساقه با میانگین ۶/۲۵ مربوط به تیمار MS به همراه ۶ میلی گرم در لیتر BAP و ۰ میلی گرم در لیتر NAA بود. بیشترین درصد القای کالوس مربوط به غلظت های NAA (۰، ۱/۵، ۳ و۶ میلی گرم در لیتر) بود.

کلمات کلیدی: القای کالوس، باززایی مستقیم، تنظیم کننده های رشد گیاهی، زرین گیاه، ریزنمونه برگ به همراه دمبرگ، نو ساقه های ایجاد شده

مقدمه

زرین گیاه با نام علمی .*Dracocephalum kotschyi* Bioss یکی از گیاهان معطر و دارویی است که در رویشگاه های طبیعی و در نواحی کوهستانی و مرتفع ایران یافت می شود. گونه زرین گیاه گیاهی چند ساله و از تیره نعناعیان است. از اندام های این گیاه دو منو ترپن گلیکوزید جدید به همراه ۷ ترپنوئید و فیتواسترول جدا شده است و به عنوان ضد درد در موش ها مورد استفاده قرار گرفته است. این گیاه از قدیم مورد توجه مردم محل رویش بوده و به علت بهره برداری بی رویه در حال انقراض می باشد (اسعدی و خشنود یزدی، ۱۳۸۹). تحقیقات اخیر نشان داده است که ترکیبات موجود در بادرنجبویه دنایی از لحاظ دارویی ارزشمند بوده و حاوی اسانس، فلاونوئید، رزمارینیک اسید و گلیکوزیدهای مونوترپن می‌باشد. نیاز این گیاه به شرایط میکروکلیمایی خاص مانند مناطق مرتفع و صخره ای با بارندگی تا حدودی زیاد باعث شده است که این گیاه جمعیت های کوچک و جدا از هم داشته باشد بنابراین احتمال رانده شدن ژنتیکی وجود خواهد داشت که احتمال منقرض شدن آن وجود دارد. اهالی محل در مناطق مختلف برای تسکین درد و بیماری های روماتیسمی از این گیاه استفاده می کنند (فتاحی، ۱۳۹۱). رشد و تکثیر این گیاه به ندرت صورت می گیرد و ازدیاد زرین گیاه در ایران از طریق کاشت بذر صورت می گیرد. از طرفی برخی عوامل طبیعی مانند فرسایش و غیر طبیعی مانند بهره برداری بی رویه در خطر انقراض قرار دارد و به گونه های کم یاب تبدیل شده است. با توجه به خطر انقراض و

نابودی این گیاه دارویی یافتن روشی مناسب براساس تکنیک های کشت بافت که در آن تکثیر انبوه و آسان این گیاه (با کیفیت مطلوب و عاری از عوامل بیماری زا) صورت پذیرد، امری ضروری به نظر می رسد. می رسد (اطرشی و مرادی، ۱۳۹۱). ریزازدیادی درون شیشه ای می تواند روش موثری برای تکثیر سریع و انبوه زرین گیاه محسوب شود که منجر به تولید گیاهانی با یکنواختی بالا می شود. در پژوهش حاضر تاثیر غلظت های مختلف هورمونی بر میزان باززایی مستقیم و القای کالوس در ریزنمونه برگ به همراه دمبرگ زرین گیاه مورد بررسی قرار گرفته است تا ضمن بهینه سازی کشت درون شیشه ای آن، بستر مناسب برای انجام سایر پژوهش ها نظیر انتقال ژن و نیز افزایش کمیت و کیفیت مواد موثر با استفاده از دست ورزی ژنتیکی فراهم شود.

مواد و روش‌ها

خواب بذور زرین گیاه با استفاده از اسید سولفوریک غلیظ به مدت ۱۵ دقیقه برطرف شد. برای ضدعفونی کردن بذور از الکل ۷۰ درصد به مدت ۶۰ ثانیه و هیپوکلریت سدیم ۵ درصد به مدت ۲۰ دقیقه استفاده شد و بعد از هر مرحله بذور سه بار با آب مقطر استریل شست وشو داده شدند. برای جوانه زنی و تولید گیاهچه های سترون جهت تهیه ریزنمونه، بذور در محیط پایه MS کشت شدند. ریز نمونه برگ به همراه چند میلی متر دمبرگ از گیاهچه های ۱۲ روزه که در شرایط درون شیشه ای رشد کرده بودند تهیه شد. ریزنمونه های فوق در محیط کشت MS حاوی هورمون BAP با غلظت های ۰، ۱/۵، ۳ و ۶ میلی گرم در لیتر و NAA با غلظت های ۰، ۱/۵، ۳ و ۶ میلی گرم در لیتر کشت شدند. تاثیر ریزنمونه ها در یک آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملا تصادفی در چهار تکرار و هر تکرار حاوی ۶ ریزنمونه بررسی شد. در این آزمایش درصد باززایی، درصد القای کالوس و تعداد نو ساقه ها به ازای هر ریزنمونه محاسبه شد. برای تجزیه و تحلیل داده های آماری از نرم افزار SPSS 16 و برای مقایسه میانگین ها از آزمون چند دامنه ای دانکن استفاده شد.

نتایج و بحث

براساس جدول تجزیه واریانس (جدول ۱) اثرات هورمون های BAP و NAA در سطح احتمال ۱ درصد و اثرات متقابل هورمون های NAA*BAP در سطح احتمال ۵ درصد بر درصد باززایی مستقیم زرین گیاه معنی دار بودند. با توجه به معنی دار بودن اثر متقابل، مقایسه میانگین با استفاده از آزمون چند دامنه ای دانکن برای ترکیبات تیماری انجام شد (جدول ۲)

جدول ۱- تجزیه واریانس درصد القای کالوس، درصد باززایی مستقیم و تعداد نوساقه

منابع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات
BAP	۳	۶۱۳ /۱۳۴**
NAA	۳	۷۳۹۳ /۶۸۷ **
BAP* NAA	۹	۱۰۸۶ /۶۳۳ *
اشتباه آزمایشی	۴۲	۱۳۴۱ / ۴۵۶

** و * به ترتیب معنی داری در سطح احتمال ۱ درصد و ۵ درصد

طبق نتایج به دست آمده بیش ترین درصد باززایی مستقیم مربوط به محیط کشت MS حاوی ۶ میلی گرم در لیتر BAP و ۰ میلی گرم در لیتر NAA می باشد. محیط کشت های MS حاوی ۱/۵ میلی گرم BAP + ۱/۵ میلی گرم NAA و ۶ میلی گرم در لیتر BAP +۵ /۱ میلی گرم NAA و ۵/ ۱ میلی گرم BAP + ۰ میلی گرم در لیتر NAA برای صفت درصد باززایی مستقیم از لحاظ

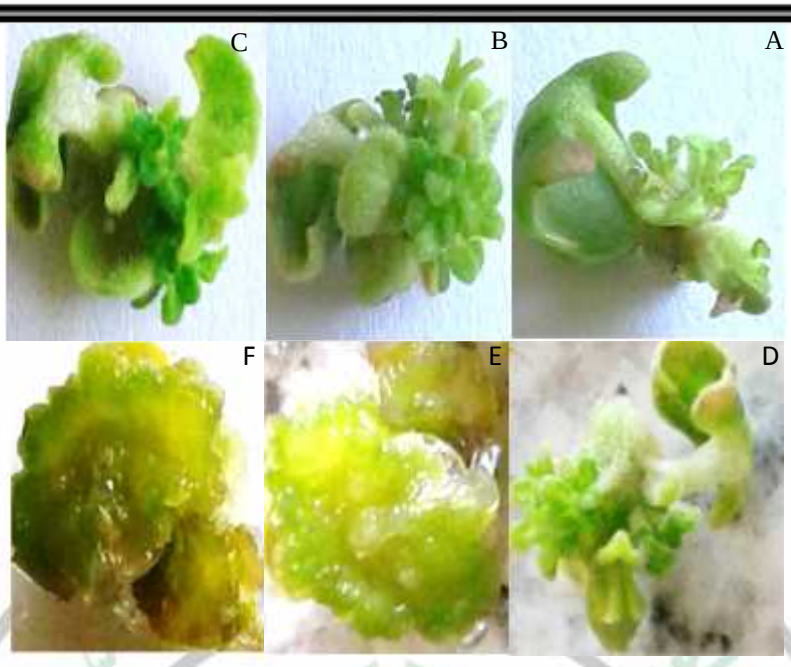
آماری اختلاف معنی داری باهم نداشتند. بیش ترین میانگین تعداد نو ساقه ایجاد شده نیز با میانگین ۶/۲۵ مربوط به تیمار ۶ میلی گرم در لیتر BAP و ۰ میلی گرم در لیتر NAA می‌باشد.

جدول ۲- مقایسه میانگین درصد باززایی مستقیم و میانگین تعداد نو ساقه

ترکیب تیماری	درصد باززایی مستقیم	میانگین تعداد نو ساقه
BAP 6 mg l^{-1} +NAA 0 mg l^{-1}	۱۷/۴۹ a	۶/۲۵ a
BAP 1.5 mg l^{-1}+NAA0 mg l^{-1}	۸/۳۳ b	۰/۵ b
BAP 6 mg l^{-1} + NAA 1.5 mg l^{-1}	۵ b	۰/۲۵ b
BAP 1.5 mg l^{-1} + NAA 1.5 mg l^{-1}	۵ b	۰/۲۵ b
BAP 6 mg l^{-1} + NAA 6 mg l^{-1}	۰ b	۰ b
BAP 6 mg l^{-1} + NAA 3 mg l^{-1}	۰ b	۰ b
BAP 3 mg l^{-1} + NAA 6 mg l^{-1}	۰ b	۰ b
BAP 3 mg l^{-1} + NAA 3 mg l^{-1}	۰ b	۰ b
BAP 3 mg l^{-1} + NAA 1.5 mg l^{-1}	۰ b	۰ b
BAP 3 mg l^{-1} + NAA 0 mg l^{-1}	۰ b	۰ b
BAP 1.5 mg l^{-1} + NAA 6 mg l^{-1}	۰ b	۰ b
BAP 1.5 mg l^{-1} + NAA 3 mg l^{-1}	۰ b	۰ b
BAP 0 mg l^{-1} + NAA 6 mg l^{-1}	۰ b	۰ b
BAP 0 mg l^{-1} + NAA 3 mg l^{-1}	۰ b	۰ b
BAP 0 mg l^{-1} + NAA 1.5 mg l^{-1}	۰ b	۰ b
BAP 0 mg l^{-1} + NAA 0 mg l^{-1}	۰ b	۰ b

اعداد با حروف یکسان از لحاظ آماری با هم اختلاف ندارند.

تا کنون گزارشی مبنی بر باززایی مستقیم ۱۷/۴۹ درصد و میانگین تعداد نو ساقه ایجاد شده ۶/۲۵ از ریزنمونه برگ به همراه دمبرگ (۱۲ روزه) گزارش نشده است (شکل ۱) و اولین گزارش مربوط به پژوهش حاضر می باشد. با توجه به جدول تجزیه واریانس (جدول ۱)، اثر BAP و اثر متقابل BAP*NAA بر روی القای کالوس معنی دار نبود و اثر NAA بر روی القای کالوس در سطح احتمال ۱ درصد معنی دار بود. بیش ترین درصد القای کالوس مربوط به غلظت های مختلف NAA (۰، ۱/۵، ۳ و۶ میلی گرم در لیتر) بود که با شاهد اختلاف معنی داری داشتند. از فاکتورهای موثر در باززایی گیاهان دارویی می‌توان به ژنوتیپ، ریزنمونه و عوامل هورمونی اشاره کرد و به همین دلیل در گیاهان دارویی از ریزنمونه های مختلف برای باززایی استفاده شده است (جنگجو و همکاران ۱۳۹۳). اطرشی و مرادی (۱۳۹۱) از ریزنمونه نوک شاخه در محیط کشت MS حاوی ۵ میلی گرم در لیتر BAP و ۰/۲ میلی گرم در لیتر NAA بهترین باززایی را گزارش کرده اند. همچنین زینلی و همکاران (۲۰۱۴) بهترین باززایی را از ریزنمونه گره در محیط کشت MS حاوی ۲ میلی گرم در لیتر KIN به تنهایی یا در ترکیب با ۰/۵ میلی گرم در لیتر NAA یا IBA گزارش کردند که با یافته های ما در این پژوهش شباهت چندانی ندارند.



شکل ۱- A,B,C,D باززایی مستقیم و نو ساقه های ایجاد شده، E,F القای کالوس

منابع

۱. اسعدی، ع، م.، خشنود یزدی، ا. ۱۳۸۹. بررسی خصوصیات بوم شناختی *Dracocephalum kotschyi* Bioss. در مراتع شهرستان بجنورد. فصلنامه علمی – پژوهشی تحقیقات گیاهان دارویی و معطر ایران. جلد ۲۶، شماره ۳ : ۴۱۴-۴۰۶

۲. فتاحی، م.، ناظری، و.، سفید کن، ف.، زمانی، ذ. ۱۳۹۲. بررسی ات اکولوژی بادرنجبویه دنایی *Dracocephalum kotschyi* Bioss. در ایران. فصلنامه علمی- پژوهشی تحقیقات گیاهان دارویی و معطر ایران. جلد ۲۹، شماره ۲: ۳۴۲-۳۲۵

۳. اطرشی، م.، مرادی، ک. ۱۳۹۱. اثر ریزنمونه ها و هورمون های رشد در باززایی مستقیم زرین گیاه *Dracocephalum kotschyi* Bioss. با استفاده از تکنیک کشت بافت. فصلنامه داروهای گیاهی. ۳ : ۱۳۴-۱۲۷

4. Zeinali. S., et al. 2014. Influence of Plant Growth Regulators on *In vitro* culture and Regeneration of *Dracocephalum Kotschyi* International Journal of Agriculture Innovations and Research. 2: 108-111.

The study of effect plant growth regulators on direct regeneration and callus induction in *Dracocephalum kotschyi* Bioss.

S. Bakhshayesh[1*], M. Mohebodini[1], B. Hoseini[2]

1-M. Sc student of Horticultural Sciences, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil 1- Assistant Professor, Dep. of Horticultural Science, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil 2- Assistant Professor, Dep. of Horticultural Science, Urmia University, urmia
*Corresponding author: s_bakhshayesh68@yahoo.com

Abstract

Dracocephalum kotschyi Bioss. belongs to Lamiaceae family. This important – rare medicinal plant traditionally is used for curing rheumatism, fever and relief the pain. Plant regeneration by tissue culture technique would be possible alternative for improving quality and producing *Dracocephalum kotschyi* plant. An experiment was conducted to study the effect of plant growth regulators on callus

induction and direct plant regeneration in *Dracocephalum kotschyi* Bioss .The medium used for this purpose was MS whit different concentration of BAP (0, 1.5, 3, 6 mg l^{-1}) and NAA (0,1.5, 3, 6 mg l^{-1}) for leaf whit petal as explant. The results showed that best treatment for direct regeneration and maximum plant regenerated whit average 6.25 was BAP 6 mg l^{-1} + NAA 0 mg l^{-1} . also callus induction was observed at different concentration of NAA (0,1.5, 3, 6 mg l^{-1}).

Key words: callus induction, direct regeneration, plant growth regulators, *Dracocephalum kotschyi*, leaf whit petal, plant regenerated