بررسی اثر بنزیل آدنین و کینتین بر پرآوری گیاه دارویی سیاه‌توسه (*Frangula alnus* L.) در شرایط درون-شیشه

مهدی بخشی‌پور[1*]، یوسف حمیداوغلی[2]، سحر بهلولی زنجانی[3]

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد گیاهان دارویی، پردیس دانشگاهی دانشگاه گیلان، رشت ۲- دانشیار گروه باغبانی، دانشکده کشاورزی دانشگاه گیلان، رشت
۳- کارشناس ارشد باغبانی، پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی منطقه شمال کشور، رشت
*نویسنده مسئول: M.BAKHSHIPOUR.E@GMAIL.COM

چکیده

سیاه‌توسه (*Frangula alnus* L.)، منبعی غنی از ترکیبات مهم دارویی به نام آنتراکینون می‌باشد که به‌صورت وحشی در مناطق جنگلی شمال ایران می‌روید. در صنایع نوین داروسازی، از مواد موثره موجود در پوست این گیاه دارو تهیه می‌شود. این پژوهش با هدف بررسی اثر بنزیل آدنین و کینتین در ترکیب با ایندول استیک اسید بر تکثیر گیاه سیاه‌توسه در شرایط درون‌شیشه‌ای انجام شد. ریزنمونه‌ها پس از گندزدایی، در محیط کشت موراشیگ‌اسکوگ (MS) به همراه تنظیم کننده رشد کینتین (Kin) و بنزیل‌آدنین (BA) با غلظت‌های ۰، ۰/۵، ۱ و ۲ میلی‌گرم در لیتر و در ترکیب با ایندول‌استیک‌اسید (IAA) با غلظت ۰ و ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر کشت شدند. نتایج پس از ۸ هفته نشان داد که بیشترین تعداد شاخساره در محیط MS همراه با ترکیب ۲ میلی‌گرم بر لیتر BA و ۰/۱ میلی-گرم بر لیتر IAA با میانگین ۷/۱ شاخساره در هر ریزنمونه و تیمار ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BA در ترکیب با ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر IAA با میانگین ۷ سانتیمتر بیشترین ارتفاع شاخساره را تولید کرد. نتایج نشان دادکه IAA در ترکیب با غلظت‌های کم BA بیشترین تأثیر مثبت را در ارتفاع ریزنمونه‌ها و در ترکیب با غلظت‌های بالاتر BA بیشترین تعداد شاخساره را دارد.

کلمات کلیدی: سیاه‌توسه، ریزازدیادی، ایندول‌استیک‌اسید، بنزیل‌آدنین، کینتین

مقدمه

ریزازدیادی یکی از روش‌های آسان و کم هزینه‌ای است که با بهره‌گیری از آن می‌توان در زمانی کوتاه تعداد زیادی گیاهچه از کلون‌ها و یا گونه‌هایی که در معرض خطر نابودی هستند تولید کرد (جرج و همکاران، ۲۰۰۸). در این مورد خاص می‌توان به سیاه‌توسه (*Frangula alnus* L.) از خانواده *Rhamnaceae* اشاره کرد. سیاه‌توسه گیاهی پایا، خزان‌دار و مقاوم به سرما با گل‌های هرمافرودیت بوده و بین ۳ تا ۶ متر رشد می‌کند (وادل و لانگ، ۱۹۶۰). سیاه‌توسه منبعی سرشار از ترکیبات مهم دارویی به نام آنتراکینون می‌باشد که کاربردهای آن بیشتر در صنایع غذایی و داروسازی است. در پوست این گیاه ۳ تا ۷ درصد آنتراکینون وموادی که دارای قدرت آنتی‌اکسیدانی، آنتی‌باکتریایی، آنتی ویروسی و ضد سرطانی بسیار بالا می‌باشند، وجود دارد (هانسل و استیچر، ۲۰۰۷).

کاشت بذر، بهترین راه ازدیاد این درختچه است (استِف و همکاران، ۲۰۰۹). اما بذرهای آن دارای رکود فیزیکی و رکود عمیق فیزیولوژیکی بوده و از این‌رو، ازدیاد انبوه آن با بذر دشوار است (مهدوی، ۱۳۹۲). بهره‌گیری از روش ازدیاد درون‌شیشه‌ای (In vitro)، به عنوان نخستین مرحله در توسعه و جلوگیری از نابودی این قبیل گونه‌ها است (استِف و همکاران، ۲۰۰۹). تاکنون کشت درون‌شیشه‌ای سیاه‌توسه بیشتر برای تولید متابولیت‌های ثانویه (آنتراکینون) انجام گرفته است. برای کشت درون‌شیشه‌ای سیاه‌توسه، از دانهال‌های حاصل از رشد رویان جداشده از بذر، در شرایط درون‌شیشه‌ای استفاده شد. رویان‌های جداشده در محیط MS به همراه ۲ گرم بر لیتر پلی‌ونیل‌پیرولیدون (PVP) کشت شدند (لوید و مک‌کان، ۱۹۸۰). در پژوهشی شاخساره و اپیکوتیل گیاه، در

محیط MS با ۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر ایندول‌بوتریک اسید و ۱ میلی‌گرم بر لیتر بنزیل‌آدنین به منظور شاخه‌زایی کشت شد (استِف و همکاران، ۲۰۰۹).

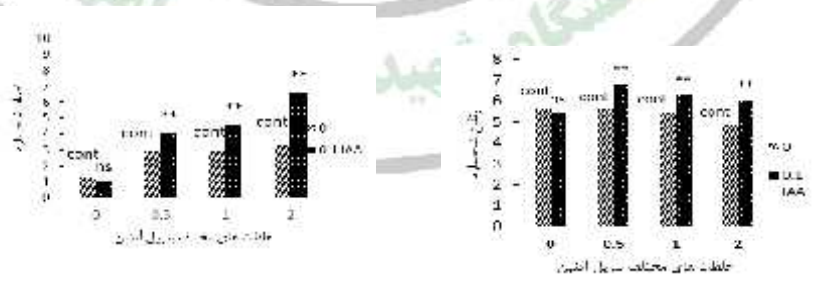
با توجه به اهمیت زیاد سیاه‌توسه از نظر دارویی و در معرض خطر بودن این گونه در کشور، این پژوهش با هدف دست‌یابی به پروتکل ریزازدیادی سیاه‌توسه با بهره‌گیری از ریزنمونه‌های جوانه جانبی انجام شد.

مواد و روش ها

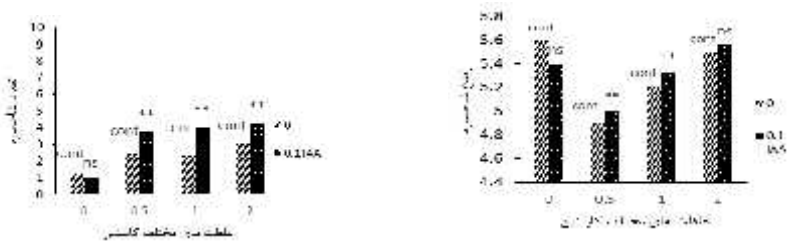
ریزنمونه‌ها ابتدا زیرآب جاری شستشو و عملیات ضدعفونی سطحی نیز با الکل ۷۰٪ به مدت ۲۵ تا ۳۰ ثانیه انجام شد. پس از آن، نمونه‌ها به مدت ۱۵ دقیقه در محلول ۱/۵ درصد هیپوکلراید سدیم غوطه‌ور شدند. ریزنمونه‌ها از محل گره ساقه تهیه شده و پس از گندزدایی در محیط پایه MS با ۳ درصد ساکارز و ۰/۷ درصد آگار (مرک، آلمان) در شرایط کاملاً استریل کشت شدند. pH محیط کشت به میزان ۱ ± ۵/۶ قبل از اتو کلاو تنظیم شد. ریزنمونه‌ها از جوانه‌های جانبی (به طول تقریبی ۱/۵ سانتی‌متر) از گیاه مادری تهیه و کشت شدند. پس از کشت، ریزنمونه‌ها به اتاق رشد با دمای ۲ ± ۲۴ و دوره نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی منتقل شدند. این آزمایش به صورت فاکتوریل با دو فاکتور بنزیل آدنین و کینیتین (هر کدام در چهار سطح ۰، ۰/۵، ۱ و ۲ میلی‌گرم در لیتر) به تنهایی و در ترکیب با ایندول‌استیک‌اسید، ۰ و ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر بر پایه طرح کاملا تصادفی و در سه تکرار اجرا شد. همچنین تجزیه داده‌ها با استفاده از نرم افزار SAS نسخه ۹/۱ انجام شد. مقایسه میانگین تیمارها نیز توسط آزمون حداقل اختلاف معنی‌دار (LSD) در سطح احتمال معنی‌دار شدن هر یک از صفت‌ها در جدول تجزیه واریانس انجام شد. نمودارها نیز با استفاده از برنامه Excel رسم گردید.

نتایج

نتایج تجزیه واریانس، نشان داد اثرات ساده و متقابل هورمون‌های BA و KIN با IAA روی صفات تعداد شاخساره و طول شاخساره در سطح ۱ و ۵ درصد معنی‌دار است. شکل ۱ مقایسه میانگین تأثیر تیمارهای BA در ترکیب IAA را نشان می‌دهد که بیشترین تعداد شاخساره در تیمار۲ میلی‌گرم در لیتر BA در ترکیب با ۰/۱ میلی‌گرم برلیتر IAA با میانگین ۷/۱ شاخساره در هر ریزنمونه و تیمار ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BA در ترکیب با ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر IAA با میانگین ۷ سانتیمتر بیشترین ارتفاع شاخساره را با اختلاف معنی‌دار در سطح ۱ درصد نسبت با شاهد ایجاد کرد. نتایج نشان داد که سطوح IAA در ترکیب با غلظت کم BA بیشترین تأثیر مثبت را در ارتفاع ریزنمونه‌ها داشته‌اند.



شکل۱- مقایسه میانگین اثر متقابل BA و IAA بر تعداد شاخساره، ارتفاع گیاهچه در ریزنمونه جوانه جانبی سیاه‌توسه. مقایسه میانگین به روش LSd صورت گرفته است. معنی‌داری در سطح ۵ و ۱ درصد با * و ** و غیر معنی‌داری در میانگین‌ها با ns نشان داده شده است.



شکل۲- مقایسه میانگین اثر متقابل KIN و IAA بر تعداد شاخساره، ارتفاع گیاهچه در ریزنمونه جوانه جانبی سیاه‌توسه. مقایسه میانگین به روش LSd صورت گرفته و معنی‌داری در سطح ۵ و ۱ درصد با * و ** و غیر معنی‌داری در میانگین‌ها با ns نشان داده شده است.

شکل ۲ مقایسه میانگین، تأثیر تیمارهای KIN در ترکیب IAA را نشان می‌دهد. در این آزمایش بیشترین تعداد شاخساره پرآوری شده در تیمار۲ میلی‌گرم در لیتر KIN در ترکیب با ۰/۱ میلی‌گرم برلیتر IAA با میانگین ۴/۳ شاخساره در هر ریزنمونه و تیمار ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر KIN در ترکیب با ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر IAA با میانگین ۵/۳۳ سانتیمتر بیشترین ارتفاع شاخساره را با اختلاف معنی‌دار در سطح ۱ درصد نسبت به شاهد ایجاد کرد.

بحث و نتیجه گیری

میانگین تعداد شاخساره در هر ریزنمونه یکی از فاکتورهای اصلی در پرآوری است که در پرآوری گونه‌هایی که کاربرد تجاری دارند بسیار بر آن تأکید می‌گردد. بررسی میانگین تعداد شاخساره تولید شده از ریزنمونه، حاکی از تأثیر نوع و غلظت تنظیم‌کننده‌های رشد به کار رفته است به گونه‌ای که ترکیب غلظت بالای سایتوکنین‌ها (BA و Kin) به همراه یک اکسین (IAA) بیشترین تأثیرگذاری را درپرآوری شاخساره داشت. با این تفاسیر می‌توان گفت اکسین بر نقش سایتوکنین اثر تقویت‌کنندگی دارد و از طرفی عموما سایتوکنین‌ها را عامل اصلی تقسیم سلولی می‌دانند که با تأثیر بر جوانه انتهایی و غلبه بر اکسین، باعث از بین رفتن چیرگی انتهایی می‌شوند و با تجمع در جوانه‌های جانبی باعث رشد جوانه جانبی می‌شوند (تایز و زیگر، ۲۰۰۲).

با در نظر گرفتن نقش اکسین‌ها در رشد طولی ساقه و تعادل مناسب بین نسبت اکسین به سایتوکنین، می‌توان نتیجه گرفت که غلظت‌های متوسط و کم از سایتوکنین‌ها و اکسین، مهمترین عامل القای رشد طولی شاخساره هستند (جرج و همکاران، ۲۰۰۸). همانگونه که در نتایج دیده می‌شود نوع برهمکنش سایتوکنین‌های مختلف در ترکیب با IAA مشابه بوده و میانگین ارتفاع شاخساره اصلی بستگی به غلظت‌های مختلف از تنظیم‌کننده‌های رشد دارد. به گونه‌ای که در غلظت‌های بالا، پرآوری افزایش یافته و از میانگین ارتفاع شاخساره کاسته شد(آرتِکا، ۱۹۹۵). یکی از اثرهای بارز و شناخته‌شده غلظت‌های بالای سایتوکنین‌ها در محیط کشت، کاهش طول شاخساره است (کوملو و همکاران، ۱۹۸۹). کاهش ارتفاع شاخساره به دلیل تأثیر سایتوکنین‌ها بر افزایش تعداد جوانه‌های نابجا می‌باشد. درحالی‌که در محیط بدون سایتوکنین شاخساره‌ها به صورت تکی و یا با تعداد کمی شاخساره جانبی شروع به رشد می‌کنند (ابوکود و همکاران، ۲۰۱۰). سایتوکنین‌ها نیز علاوه بر نقش بارز خود به عنوان محرک تقسیم سلولی، به طریقی متفاوت از اکسین‌ها در رشد سلولی موثرند و وجود سایتوکنین‌ها برای افزایش طول کلیه سلول‌های گیاهی الزامی است (عطری، ۱۳۷۵). با توجه به نقش اکسین‌ها و سایتوکنینها، تیمارهای هورمونی از طریق تأثیرگذاری بر تنظیم کننده‌های رشد درونی، نقش خود را ایفا می‌کنند (گاسپار و همکاران، ۲۰۰۳).

با توجه به اهمیت بسیار زیاد سیاه‌توسه در دو زمینه کاربردی محافظتی و دارویی و در کنار آن، افزایش روز افزون نابودی زیستگاه‌های این گیاه به عنوان یکی از گونه‌های مهم جنگل‌های هیرکانی، لازم است برای جلوگیری از نابودی این گونه، از ابزارهای به‌روز مانند کشت درون‌شیشه‌ای جهت تکثیر و حفظ این ذخیره ژنتیکی ارزشمند مورد استفاده قرار گیرد. که در این راستا با انجام آزمایش‌هایی، کشت درون‌شیشه‌ای این گیاه مورد آزمون قرار گرفت. بهترین نتایج به دست آمده، اعمال تیمارهای سایتوکنین و اکسین بر روی پرآوری ریزنمونه جوانه جانبی در سطح ۲ میلی‌گرم بر لیتر BA در ترکیب با ۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر IAA بدست آمد.

منابع

۱. عطری، م.(۱۳۷۵). ارگانوژنز (اندامزایی) و مورفوژنز (ریختزایی) گیاهی (جلد دوم). جهاد دانشگاهی ارومیه ۴۶۹ ص.

۲. مهدوی فیکجور، ادریس. (۱۳۹۲). بررسی رکود فیزیکی و فیزیولوژیکی بذور گیاه دارویی سیاه‌توسه. مجله گیاه و زیست‌بوم دانشگاه آزاد واحد شهرری.

3. Arteca, R. N. (1995). Plant growth regulations, substances principles and applications. Chapman and Hall. New York. pp: 322.
4. Abu-Qaoud, H., Abu-Rayya, A. And Yaish, S. 2010. In vitro regeneration and somaclonal variation of *Petunia hybrid*. Journal of Fruit and Ornamental Plant Research. 18: 71-81.
5. Comloh, M., Gogala, N. and Ruzic, R. (1989). The micropropagation of Nephrolepis exalata, Bioloski - Vestnik. 37:23-33.
6. Gaspar, T., Kevers, C., Faivre-Rampant, O., Cre`vecoeur, M., Penel, C Greppin, ., H. and Dommes, J. (2003). Changing concepts in plant hormo ne action. In Vitro Cell. Development Biology Plant . In Vitro Cell.39:85–105.
7. George, E.F., Hall, M.A. and De Klerk, G.-J. (2008). The components of plant tissue culture media I: macro-and micro-nutrients. Plant propagation by tissue culture. Springer. pp. 65-113.
8. Hansel, R. and Sticher, O. (2007). Pharmakognosie - Phytopharmazie, 8th ed.; Springer Verlag: Heidelberg..
9. Loyd, G. and McCown, B. (1980). Commercially-feasible micropropagation of *mountain laurel, Kulmiu lacoliu*, by use of shoot-tip culture. Proceedings the International Plant Propagation Society. 3:420-427.
10. Taiz, L. and E. Zeiger.(2002). Plant Physiology. 3rd edition. Sinauer Associates, Inc., Sunderland, MA.
11. Vedel, H. and Lange, J.(1960). Trees and Bushes in Wood and Hedgerow. Methuen & Co Ltd.
12. Stef, D. S., Gergen, I., Trascaa, T. I., Haarmaanescu, M., Lavinia, S. and Ramona, B. (2009). Total antioxidant and radical scavenging capacities for different medicinal herbs.Romanian Biotechnological Letters, 14, 4704–4709.

Investigation on effect of Benzyladenine and Kinetin with Indole-3-acetic acid on *in vitro* Proliferation of *Frangula alnus* L. (medicinal plant)

M. Bakhshipour[1*], Y. Hamidoghli[2], S. Bohlouli Zanjani[3]

1-M. Sc of Horticultural Science, Guilan University of Rasht 2- Associate Professor, Dep. of Horticultural Science, Guilan University of Rasht 3- Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran (North Region), Rasht, Guilan, Iran

*Corresponding author: M.BAKHSHIPOUR.E@GMAIL.COM

Abstract

Frangula alnus is the main source of anthraquinone (AQ) drugs. This plant grows as wild type in the forests of northern Iran. The bark is used as a source of AQ drugs. This study aimed to investigate effect of BA and Kinetin with IAA for mass production of *Frangula alnus* L. through *in vitro* culture. Explants sterilized and were cultured on MS basal medium with 4 different concentrations of growth regulators BA and Kinetin (0, 0.5, 1,2 $mg.l^{-1}$) with 0, 0.1 $mg.l^{-1}$ IAA. After 8 weeks, results showed that the BA concentration of 2$mg.l^{-1}$and IAA concentration of 0.1 $mg.l^{-1}$ with a mean shoot number of 7.1 had the highest effect on shoot number. The BA concentration of 0.5 $mg.l^{-1}$ and IAA concentration of 0.1 $mg.l^{-1}$ had the highest effect on shoot height (7 cm). Nevertheless, composition of IAA with low concentration of BA had highest effect on shoot height but with high concentration of BA shoot proliferation was higher.

Key words: *Frangula alnus*, Micropropagation, IAA, BA, Kinetin