بررسی اثر تیدیازرون (TDZ) بر پرآوری گیاه سیاه‌گیله (*Vaccinium arctostaphylos* L.) در شرایط درون شیشه‌ای

مهدی بخشی پور[۱*]، علی رمضانی صیاد[۲]
[۱و۲] کارشناس ارشد آزمایشگاه، مدیریت بیوتکنولوژی کشاورزی منطقه شمال کشور
نویسنده مسئول: M.bakhshipour.e@gmail.com

چکیده

این تحقیق به‌منظور تعیین محیط کشت مناسب جهت رشد و پرآوری گیاهچه‌های سیاه‌گیله (*V.arctostaphylos*L.) در شرایط درون‌شیشه‌ای در قالب فاکتوریل بر پایه طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار در آزمایشگاه کشت بافت پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی منطقه شمال کشور انجام شد. در این آزمایش از سه محیط کشت WPM ،MS و AN به همراه تنظیم کننده رشد تیدیازرون (TDZ) در چهار غلظت (۴، ۲، ۱، ۰) میلی گرم در لیتر استفاده شد. پس از ۸ هفته صفات طول شاخساره، تعداد شاخساره، وزن تر و وزن خشک شاخساره یادداشت‌برداری شدند. نتایج تحقیق نشان داد محیط کشت اندرسون در ترکیب با ۲ میلی‌گرم د لیتر تیدیازرون با ۶/۵ گیاهچه، محیط کشت مناسب‌تری نسبت به محیط کشت‌هایMS و WPM برای کشت سیاه‌گیله در شرایط کشت درون شیشه‌ای می‌باشد.

کلید واژه‌ها: **اندرسون، محیط‌کشت، کشت‌بافت، کشت درون شیشه‌ای، واکسینیوم**

مقدمه

قره‌قاط، سیاگیله، سیاه‌دار و قره‌گیله اسم محلی تنها گونه موجود از جنس واکسینیوم در ایران یعنی *Vaccinium arctostaphylos* L. می‌باشد. رویشگاه‌های طبیعی قره‌قاط (ارتفاعات۱۹۰۰-۱۱۰۰متری) در اقلیم معتدل جنگلی سرد قرار می‌گیرند. سیاگیله در راشستان‌ها به‌صورت درختچه حداکثر تا ارتفاع ۲/۵ متر رشد می‌کند .شاخه‌های آن نازک، بدون خار و به رنگ سبز تا قهوه‌ای ظاهر می‌شوند. برگ‌های متناوب آن، به شکل بیضی، به طول حداکثر ۱۰ سانتیمتر، نوک‌تیز، با کناره‌های صاف و دمبرگ‌های کوتاه می‌باشند. گل‌های نر و ماده این گیاه در خوشه‌های صورتی تا سفیدرنگ، تا اواسط خردادماه باز می‌شوند. گلبرگ‌های پیوسته روی گل‌آذین خوشه‌ای آویزان ظاهر می‌شود. ریشه‌های سطحی سیاه‌گیله در سطح زمین به همراه ریشه‌های ریزوم مانند آن در عمق خاک از مشخصات این گیاه است. میوه‌های این گیاه ستهای پر بذر بوده و روی شاخه‌های جوان و به‌صورت جانبی یا انتهایی تولید می‌شوند. تعداد بذر موجود در هر سته به‌طور متوسط ۴۵ عدد است که حداکثر ۵/۹ درصد وزن میوه را در برمی‌گیرد (Emad. 2012).

آنتوسیانوزید موجود در سیاه گیله موجب افزایش ویتامین c داخل سلولی، کاهش نفوذپذیری و پارگی مویرگ‌ها و مهار خون‌مردگی سریع شده و دارای خواص آنتی‌اکسیدانی قوی است. که این اثرات مخصوصاً در مهار عوارض دیررس بیماری دیابت مؤثر می‌باشد (Fallah hosseini *et al.*,2005). برگ‌های قره قاط را نیروبخش، مدر و ضدعفونی کننده می‌دانند. علاوه بر این قره‌قاط را در رفع ناراحتی‌های مخاطی مثانه و مجاری ادرار مفید معرفی کرده‌اند (Mirheydar. 1994)

عصاره متانولی و آبی تهیه شده از میوه گیاه واکسینیوم آرکتوستافیلوس بر روی بر روی رشد باکتری سالمونلا اثر مهار کنندگی دارد. ترکیبات فنلی ، آنتوسیانین، میریستین، کاروارکول و تیمول موجود در عصاره این گیاه می‌تواند از رشد پاتوژن های روده‌ای و عوامل ایجاد کننده عفونت ادراری ممانعت کند. فلاونوئید یکی از آنتی‌اکسیدان‌های قوی موجود در این گیاه است که دارای اثر ضدالتهابی ، ضد آلرژی، ضدسرطان و ضد میکروبی می‌باشد (Fallah hosseini *et al.*,2005).

بلوبری‌ها عموماً از طریق کشت‌درون‌شیشه‌ای ازدیاد می‌شوند. برای تکثیر سریع رقم‌های مرغوب اصلاح‌شده از کشت درون شیشه‌ای استفاده می‌شود (Hartmann *et al.* 1997). در گزارشی کوکه و همکاران محیط کشت WPM در ترکیب با ۱

میلی‌گرم در لیتر تیدیازرون با تعداد۴/۶۷ شاخساره و ۳/۷۲ سانتی‌متر طول شاخساره از هر نمونه کشت شده سیاه‌گیله را بهتر از سایر غلظت‌های تیدیازرون معرفی کردند (Cuce et al. 2013).

مواد و روش‌ها

گیاه موردنظر از ارتفاعات شهرستان رودسر استان گیلان جمع‌آوری و به گلخانه پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی شمال کشور منتقل و در گلخانه به مدت ۳ ماه نگهداری و تغذیه شد، ریز نمونه‌هایی که از جوانه‌های جانبی جدید تهیه شده بودند ابتدا به مدت ۳۰ دقیقه در زیر آب جاری شستشو شدند. عملیات ضدعفونی سطحی با الکل ۷۰٪ به مدت ۲۵ الی ۳۰ ثانیه و پس از آن به مدت ۱۵ دقیقه در محلول ۱/۵ درصد هیپوکلرید سدیم قرار گرفتند. سپس نمونه‌ها با آب استریل در زیر ایرفلو شستشو داده شدند. در این آزمایش نمونه‌های گندزدایی شده در شیشه‌های شفاف حاوی محیط‌های پایه کشت شد که این محیط‌ها حاوی مقادیر۳ درصد ساکارز و ۷/ درصد۰آگار (مرک، آلمان) می‌باشد. pH محیط به میزان۱±۵/۱ تنظیم گردید. پس از کشت، ریزنمونه‌ها به اتاق رشد با دمای۱±۲۴ و دوره‌ی نوری ۱۶ ساعت روشنایی با شدت نور ۱۵۰۰ لوکس و ۸ ساعت تاریکی منتقل شدند.

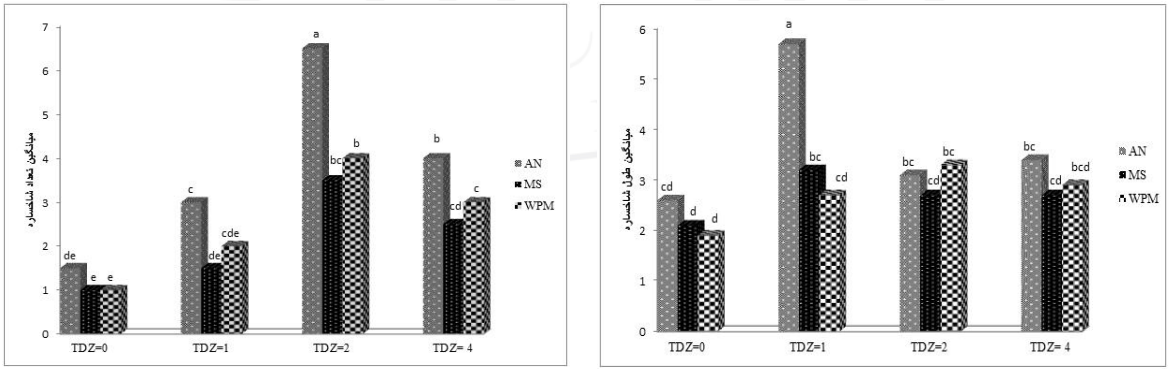
به‌منظور تعیین بهترین محیط کشت پایه و تعیین غلظت بهینه‌ی تیدیازرون، این تحقیق به‌صورت آزمایش فاکتوریل با دو فاکتور محیط کشت، شامل سه محیط اندرسون (AN)، گیاهان چوبی (WPM) و موراشیک و اسکوگ (MS) و تنظیم کننده رشد تیدیازرون (TDZ) در چهار سطح (۰، ۱، ۲ و ۴ میلی‌گرم در لیتر) بر پایه طرح کاملاً تصادفی و در سه تکرار اجرا شد.

نتایج و بحث

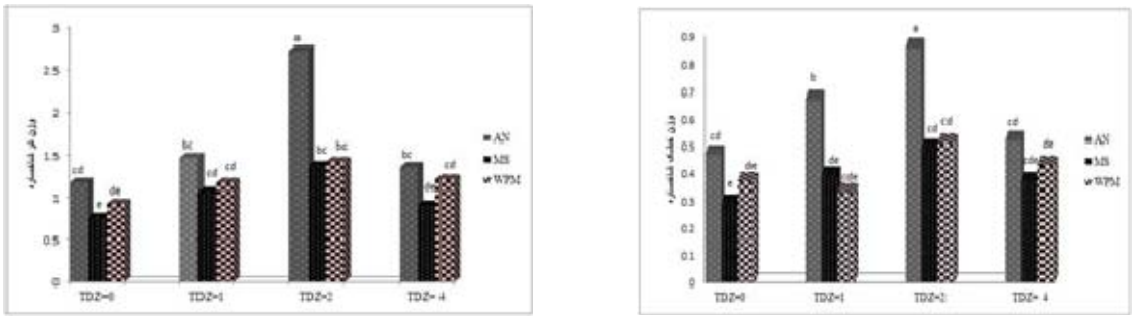
نمودارهای مقایسه میانگین تأثیر تیمارهای سه محیط کشت پایه به همراه غلظت‌های مختلف تیدیازرون را نشان می‌دهند. در این آزمایش بیشترین تعداد شاخساره پرآوری شده در تیمار محیط کشت اندرسون در ترکیب با ۲ میلی‌گرم در لیتر تیدیازرون با میانگین ۶/۵ شاخساره در هر ریزنمونه حاصل گردید. تیمار ۱ میلی‌گرم در لیتر تیدیازرون در ترکیب با محیط کشت اندرسون با میانگین۵/۷ سانتیمتر بیشترین ارتفاع شاخساره را ایجاد کرد.

تیمار ۲ میلی‌گرم برلیتر تیدیازرون در ترکیب با محیط کشت اندرسون با میانگین ۲/۷ گرم بیشترین وزن‌تر را داشت که با شاهد در سطح ۱ درصد تفاوت معنی‌دار داشت.

در این آزمایش‌ها بررسی میانگین تعداد شاخساره‌ای که از هر ریزنمونه تولید گردیده مورد ارزیابی قرار گرفت که تحت تأثیر نوع محیط و غلظت تنظیم کننده رشد به کار رفته می‌باشد به‌گونه‌ای که ترکیب محیط کشت اندرسون و غلظت ۲ میلی‌گرم در لیتر تیدیازرون به کار گرفته شده بیشترین تأثیرگذاری را داشت. سایتوکنین‌ها عامل اصلی تقسیم سلولی هستند که با تأثیر بر جوانه انتهایی و غلبه بر اکسین باعث از بین رفتن چیرگی انتهایی شده و باعث رشد جوانه‌های جانبی می‌شوند (Taiz and Zeiger 2002).



مقایسه میانگین اثر محیط کشت AN, MS, WPM و غلظت‌های تیدیازرون بر طول و تعداد شاخساره سیاه‌گیله
میانگین‌ها در هرستون که حداقل دارای یک حرف مشابه هستند بر مبنای آزمونLSD در سطح ۱٪ تفاوت معنی‌دار ندارند



مقایسه میانگین اثر محیط کشت AN, MS, WPM و غلظت‌های تیدیازرون بر وزن‌تر و وزن خشک شاخساره سیاه‌گیله
میانگین‌ها در هر ستون که حداقل دارای یک حرف مشابه هستند بر مبنای آزمون LSD در سطح ۱٪ تفاوت معنی‌دار ندارند

غلظت‌های متوسط و کم از سایتوکنین‌ها مهم‌ترین عامل القای رشد طولی شاخساره هستند. میانگین ارتفاع شاخساره بستگی به غلظت‌های مختلف از تنظیم کننده‌های رشد دارد. به‌گونه‌ای که در غلظت‌های بالا پرآوری افزایش یافته و از میانگین ارتفاع شاخساره کاسته شد. یکی از اثرهای بارز و شناخته شده غلظت‌های بالای سایتوکینین‌ها در محیط کشت کاهش طول شاخساره است (Comloh *et al*., 1989). کاهش ارتفاع شاخساره به دلیل تأثیر سایتوکنین‌ها بر افزایش تعداد جوانه‌های نابجا می‌باشد. درحالی‌که در محیط بدون سایتوکنین شاخساره‌ها به‌صورت تکی و یا با تعداد کمی شاخساره جانبی شروع به رشد می‌کنند (Abu-Qaoud *et al*., 2010).

تیمارهایی که بیشترین تعداد شاخساره را تولید کرده‌اند بیشترین وزن تر را نیز دارند. افزایش اندازه و طول سلول‌ها شامل چندین برابر شدن حجم واکوئل و گسترش دیواره‌های سلول است. با ادامه طویل شدن سلول‌ها رسوب سلولز بر روی دیواره‌ها ادامه یافته و دیواره‌های اسکلتی کامل می‌شوند. در سلول‌های بالغ گیاهی آب و نیز ماده خشک موجود بر دیواره‌ها زیاد است که عمده وزن سلول‌ها مربوط به سلولز موجود در دیواره‌های آن‌هاست. در این آزمایش تیماری که بالاترین وزن تر را داشت، بیشترین وزن خشک را نیز دارا بود. این همبستگی به علت فراهم بودن منابع کافی غذایی برای رشد، تقسیم سلولی و بیوسنتز مواد است که باعث شده ماده خشک نیز افزایش یابد (Lesani. and Mojtahedi 2000).

نتیجه‌گیری

اهمیت بسیار زیاد میوه سیاه‌گیله در زمینه دارویی باعث برداشت بی‌رویه این گیاه از طبیعت شده به‌طوری‌که امروزه رویشگاه آن بسیار محدود و گیاه رو به انقراض است. از طرفی وجود شرایط طبیعی و اقلیمی مناسب برای کشت و تولید این گیاه در استان‌های شمالی کشور، تولید این گیاه ضروری و دارای اهمیت است. بنابراین نیاز است از ابزارهای به روز نظیر کشت درون شیشه‌ای جهت تکثیر این گیاه با ارزش استفاده شود. در این راستا با انجام آزمایش‌هایی برای کشت درون شیشه‌ای این گیاه مورد آزمون قرار گرفت که بهترین نتایج به دست آمده مربوط به محیط کشت اندرسون به همراه ۲ میلی گرم در لیتر تیدیازرون است.

منابع

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.

Comloh, M., Gogala, N. and Ruzic, R. (1989). The micropropagation of Nephrolepis exalata, Bioloski - Vestnik. 37:23-33.

Cuce M, Bektaş E, Sokmen A (2013). Micropropagation of *Vacciniumarctostaphylos*L. via lateral-bud culture. Turk J Agric For 37:40–44.

Emad, M. 2012. *Vaccinium arctostaphylos* L., the medicinal-industrial plant. P. 40. Puneh publishing, Tehran.

Fallah hosseini, H., Fakhrzadeh, H., Larijani, B. and Sheikhsamani, A. 2005. A review of the herbs used in Diabetes. Journal of medicinal plants.

Hartmann, H.T., Kester, D.E., Davies, F.T. and. Geneve, R.L. (1997). *Plant propagation:Principles, and practices*. Prentice Hall, Upper Saddle River, NJ.

Lesani, H. and Mojtahedi, M. (2000). Essential of plant physiology. Tehran university publishing.

Mirheydar, H. 1994. Plant education (Application of plants in the prevention and treatment of diseases). Volume four. Islamic culture publishing office.

Sepehri, R. and Hasanlou, T. 2009. Study of polyphenolic compounds, total Anthocyanins and Antioxidant properties of *Vaccinium arctostaphylos* L. medicinal plant collected from four different regions of Iran. Journal of medicinal plants.

Taiz, L. and Zeiger, E. (2002). Plant Physiology. 3rd edition. Sinauer Associates, Inc., Sunderland, MA.

Investigation On Effect Of Thidiazuron On *In Vitro* Proliferation Of *Vacciniumarctostaphylos*l

Mehdi Bakhshipour[1*],Ali Ramezani Sayad[2]
[1, 2] M.Sc. in laboratory medicine in agriculture biotechnology management of north Iran
*Corresponding author: M.bakhshipour.e@gmail.com

Abstract
In order to determine the proper medium to grow and proliferation of *Vaccinium arctostaphylos* L. explants under the in vitro condition an experiment based on factorial experiment in completely randomized design with three repetitions in the institute of agriculture biotechnology in thenorth of countrywas conducted. In this experiment three growth medium WPM, MS and AN in combination with plant growth regulator Thidiazuron in 4 concentrations (0, 1, 2, 4 mg/l) were applied. After 8 weeks traits include shoot length, shoot number, fresh and dry weight of shoots recorded. The result of this study indicated AN medium in combination 2 mg/l Thidiazuron with 6.5 shoot in each explant is better medium to propagate of *Vaccinium arctostaphylos* L. under in vitro condition in compare with MS and WPM medium.
***Key words*: Anderson, culture media, in vitro culture, tissue culture, Vaccinium,**