بررسی اثر محیط کشت پایه، نوع و غلظت قند و ترکیبات مختلف تنظیم کننده‌های رشدی بر ریزازدیای گیاه بذرالبنج مشبک (*Hyoscyamus reticulates*L.)

رقیب بالقچی [۱]، بهمن حسینی [۲]، علیرضا فرخزاد [۲]

گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه

[۱]دانش‌آموخته کارشناسی ارشد گیاهان دارویی

[۲] گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه

[*]نویسنده مسئول: b.hosseini@urmia.ac.ir

چکیده:

گیاهان متعلق به جنس بذرالبنج (*Hyoscyamus*) برخی از ترکیبات مهم از جمله هیوسیامین و آسکوپولامین را به عنوان متابولیت‌های ثانویه تولید می‌کنند که طیف وسیعی از فعالیت‌های دارویی و سمی را نشان می‌دهند. بذرالبنج مشبک (*H.. reticulatus*) یکی از گیاهان دارویی است که از منابع اصلی تروپان آلکالوئیدهایی مثل هیوسیامین و آسکوپولامین شناخته می‌شود. باززایی درون شیشه‌ای از پتانسیل بالایی جهت تولید پایه‌های برتر گیاهان دارویی با کیفیت بالا برخوردار است. پژوهش حاضر به منظور شناسایی بهترین نوع محیط کشت، بهترین غلظت قند و شرایط مناسب محیطی جهت کشت درون شیشه‌ای طراحی گردید. در این تحقیق باززایی شاخه و درصد جوانه‌زنی در محیط کشت‌های مختلف (MS، MS 1/2، MS Modified و B_5) تکمیل شده با ۲ میلی‌گرم در لیتر ۶- بنزیل آدنین (BA) در ترکیب با ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر ایندول ۳- استیک اسید (IAA) و کربوهیدرات‌های مالتوز، ساکارز و گلوکز در غلظت-های ۲۰، ۳۰و ۴۰ گرم در لیتر مورد مطالعه قرار گرفت. در بررسی اثر نوع محیط کشت بیشترین شاخه باززایی شده و بیشترین درصد جوانه‌زنی به ترتیب با میانگین ۱۷/۰۶ شاخه در هر تیمار، ۸۸/۳۳ درصد در محیط کشت B_5 و کمترین باززایی شاخه با میانگین ۴/۲۷ در محیط کشت MS ½ بدست آمد. شاخه‌های باززاشده در محیط کشت 1/2MS و MS تکمیل شده با غلظت‌های مختلف IAA و IBA (۰، ۰/۵ و ۱ میلی‌گرم در لیتر) در طی ۴ هفته، ریشه دار شدند. مقایسه میانگین داده‌ها نشان داد که حداکثر میانگین القای ریشه در محیط کشت MS حاوی هورمون IBA با غلظت‌های ۱/۱ و ۲/۲ میکرومول با میانگین ۸۵/۵۰ ریشه مشاهده گردید.

کلمات کلیدی: بذرالبنج مشبک، محیط کشت، کربوهیدرات و تنظیم کننده‌های رشد گیاهی.

مقدمه:

بذرالبنج مشبک (*Hyoscyamus reticulatus*) ازجمله گیاهان دارویی مهم و متعلق به تیره Solanaceae می‌باشد کهبومی مناطقاروپا،علفی،دوسالهبوده و دارای ترکیبات دارویی نظیر تروپان آلکالوئیدهای هیوسیامین و اسکوپولامین می‌باشدکه درتهیه داروهای ضدتشنج، بی‌حسی،مسکن و تب‌بر استفاده می‌شود (Oto *et al.*, 2013). فاکتورهای متعددی نظیر نوع محیط کشت پایه، تنظیم‌کننده‌های رشد، غلظت کربوهیدرات‌ها و شرایط محیطی بر موفقیت تکثیر درون‌شیشه‌ای گیاهان دارویی تأثیر می‌گذارند. آزمایشات مختلف در مورد اثر نوع محیط کشت بر باززایی گیاهان نشان

IrHC2019

داد که بیشترین میزان تولید شاخه در *Hyoscyamusniger* در محیط کشت MS، در *Solanum trilobatum* L. در محیط کشت LS و در *Menthapiperita* در محیط کشت MS1/2 بوده است. منبع کربن مورد استفاده در محیط کشت در شرایط درون شیشه بر روی شاخه‌زایی، جنین‌زایی، القای ریشه و اندم زایی و بیان ژن موثر بوده و برای بقای گیاه ضروری می‌باشد (Calamar and De Klerk, 2002). تحقیقات متعددی در مورد اثرات مثبت کربوهیدرات‌ها در کشت بافت گیاهان *Solanumnigrum*، *Solanum*tuberosum، *Ecliptaalba* و نیشکر در *Pogestmon cablin* (۲۰٪) صورت گرفته است (Swamy *etal.*, 2010). تشکیل ریشه یکی از مراحل مهم در ازدیاد گیاهان در شرایط درون شیشه‌ای است. اکثر گیاهان برای باززایی مؤثر ریشه به اکسین نیازمند هستند. بالاترین میزان ریشه زایی در بذرالبنج (*Hyoscyamus niger*) درمحیط کشت MS تغییر یافته حاوی یک میلی‌گرم در لیتر Kin و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر IBA ثبت گردید (Ghorbanpour *et al.*, 2013). با توجه به اهمیت گیاه دارویی بذرالبنج مشبک و با در نظر گرفتن این نکته که هیچ مطالعه‌ای در مورد کشت درون شیشه‌ای آن تا به امروز گزارش نشده است، این تحقیق به منظور بررسی اثر محیط کشت پایه، نوع و غلظت قند و ترکیبات مختلف تنظیم کننده‌های رشدی بر ریزازدیای این گیاه انجام گردید.

موادوروش‌ها

مواد گیاهی، ضدعفونی سطحی و شرایط نگهداری:

بذ رمورد نیاز جهت کشت درون شیشه‌ای در شرایط استریل به منظورتهیه‌ی ریزنمونه‌ی استریل از باغ گیاهان دارویی دانشکده کشاورزی دانشگاه ارومیه تهیه و تحقیق در پژوهشکده زیست فناوری پردیس دانشگاه ارومیه انجام گردید. جهت ضدعفونی سطحی بذرها از اسیدسولفوریک ۱۰٪ به مدت ۷ دقیقه، هیپوکلریت سدیم ۵٪ به مدت ۱۰ دقیقه و ۳ بار غوطه وری درآب مقطر به مدت ۱۰ دقیقه استفاده گردید. پس ازضد عفونی سطحی بذور استریل در محیط کشت پایهMS تکمیل شده با ساکارز ۳ درصد حجمی و آگار ۰/۸ درصدبا pH=۵/۷ کشت شدند. جهت کشت کلیه مواد گیاهی در اتاق رشد با دمای $۲۴\pm۲^{\circ}C$و با فتوپریود ۱۶ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی قرارگرفتند.ریز نمونه‌های نوک شاخه ۲۰ روز پس از کشت بذر از گیاهچه‌های حاصل تهیه شدند.

بررسی اثر نوع محیط کشت پایه و نوع و غلظت قند بر باززایی:

این آزمایش به منظور بررسی اثر نوع محیط کشت پایه بر میزان باززایی ریزنمونه نوک شاخساره در قالب طرح آماری کاملاً تصادفی با شش تکرار انجام گردید. تیمارهای مورد استفاده شامل ۴ محیط کشت MS(T_1)، (T_2) 1/2MS، ModifiedMS (T_3) و B_5 (T_4) (هر ۴ محیط کشت حاوی ۲ میلی‌گرم در لیتر BA در ترکیب با ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر IAA می‌باشند) بودند. واکشت ریزنمونه‌هاهر ۳ هفته یک‌بارانجام گردیدو پس ازسه بار واکشت، درصد جوانه‌زنی و تعداد شاخه‌های باززایی شده در هرتیمار و در هر تکرار محاسبه گردید.ب رای بررسی اثر نوع و غلظت منبع کربوهیدرات بر باززایی شاخه و درصد جوانه زنی از محیط کشت B_5 تکمیل شده با ۲ میلی‌گرم در لیتر BA و ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر IAA همراه با سه نوع قند (ساکارز، گلوکز و مالتوز) در سه غلظت (۲۰، ۳۰ و۴۰ گرم در لیتر) استفاده گردید. آزمایش بصورت فاکتوریل در قالب طرح آماری کاملا تصادفی با سه تکرار انجام گردید. داده‌برداری بعد از ۹ هفته و انجام سه بار واکشت انجام گرفت.

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

این آزمایش به منظور بررسی تأثیر نوع محیط کشت (MS و 1/2MS) و غلظت‌های ۱/۱ و ۲/۲ میکرومولار IAA و IBA بر میزان ریشه‌زایی گیاهچه‌های باززایی شده، مورد ارزیابی قرار گرفت. آزمایش به صورت فاکتوریل در قالب

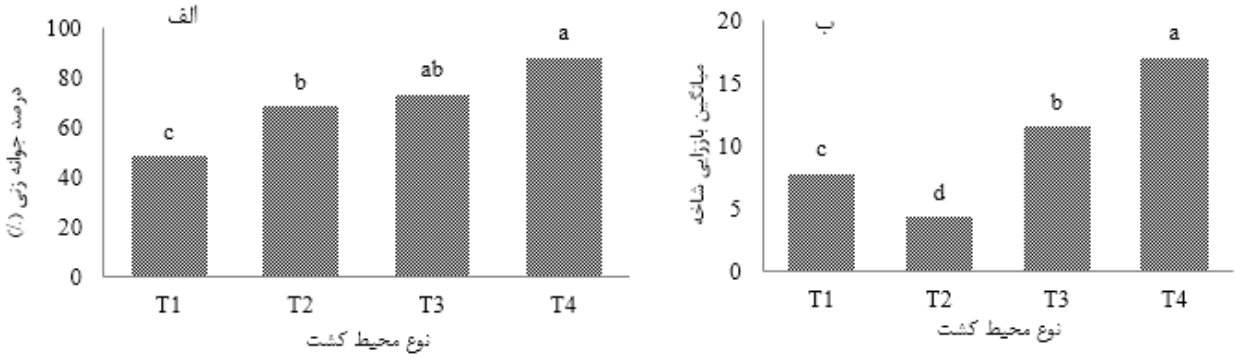
IrHC2019

طرح کاملاً تصادفی در چهار تکرار صورت پذیرفت. در پایان واکشت‌ها میانگین القای ریشه اندازه گیری گردید.

نتایج و بحث

اثر نوع محیط کشت پایه بر درصد جوانه‌زنی و باززایی شاخه

تجزیه واریانس تاثیرنوع محیط کشت بر درصد جوانه‌زنی در بذرالبنج مشبک نشان داد که نوع محیط کشت در سطح احتمال ۵ درصد بر درصد جوانه زنی معنی‌دار بود. بیشترین درصد جوانه‌زنی به ترتیب در محیط کشت B_5 (۸۸/۳۳ درصد)و محیط کشت Modified MS(۷۳/۳۳ درصد) و کمترین درصد جوانه‌زنی در محیط کشت MS (۴۸/۳۳ درصد) بدست آمد (نمودار۱- الف). همچنین نتایج تجزیه واریانس نشان داد که تاثیر نوع محیط کشت در سطح احتمال ۱ درصد بر میزان پرآوری ریزنمونه‌های نوک شاخه بذرالبنج مشبک معنی‌دار بود. بیشترین میانگین باززایی شاخه در محیط کشت B_5 با میانگین ۱۷/۰۶ شاخه باززایی شده، و کمترین میانگین باززایی در محیط کشت1/2 MSبا میانگین ۴/۲۸ شاخه باززایی شده بدست آمد (نمودار ۱- ب). نتایج حاصل نشان داد که محیط‌های مختلف پاسخ‌های متفاوتی در جهت باززایی ایجاد می‌کنند. در اکثر تیمارها در محیط کشت B_5 باززایی بهتر از سایر محیط‌ها صورت گرفته بود.این تفاوت‌ها را می‌توان به وابسته بودن رشد سلول گیاهی به غلظت و تعامل موادغذایی موجود در محیط کشت نسبت داد. استنباط شده است که تفاوت در میزان یون‌های محیط کشت، اولین فاکتور مؤثر بر میزان رشد ریزنمونه‌ها و افزایش درصد باززایی می‌باشد. تغییر منبع نیتروژن و فقدان فسفر، کلسیم و کبالت و افزایش در غلظت قندها و همچنین نوع تنظیم کننده‌های رشد در محیط کشت نتایج متفاوتی را در میزان باززایی و پرآوری گیاهان در کشت بافت نشان داده است (Wu, 2007).



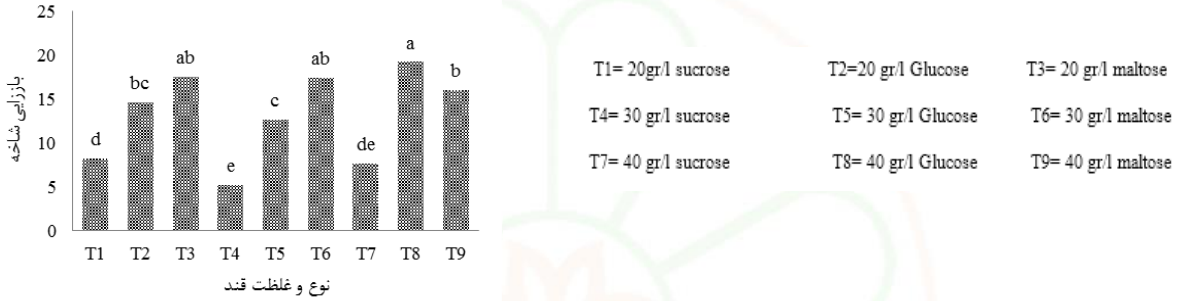
نمودار«۱» مقایسه میانگین اثر نوع محیط کشت بر درصد جوانه‌زنیبذور (الف) و میانگین باززایی (ب) بذرالبنج مشبک. حروف غیر مشابه نشان دهنده تفاوت معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد در بین میانگین‌ها در آزمون دانکن می‌باشد.

اثر ترکیبات و غلظت‌های کربوهیدرات‌ها بر میانگین باززایی شاخه

تجزیه واریانس تاثیرنوع و غلظت‌های مختلف کربوهیدرات نشان داد که که اثرات متقابل غلظت و نوع قند بر میانگین باززایی شاخه در سطح احتمال ۱ درصد معنی‌دار بود. بیشترین میانگین باززایی در محیط کشت حاوی ۴۰ گرم در لیتر گلوکز با میانگین ۱۹/۲۳ و در محیط کشت تیمار شده با مالتوز در غلظت‌های ۳۰ و ۴۰ گرم در لیتر با میانگین ۱۷/۵۲ بدست آمد. کمترین میانگین باززایی در محیط کشت بیشترین میانگین باززایی در محیط کشت

IrHC2019

حاوی ۳۰ گرم در لیتر مشاهده شد (نمودار۲).تکثیر درون شیشه‌ای به وسیله فاکتورهای زیادی تحت تاثیر قرار می-گیرد، یک از فاکتورهای بسیار مهم نوع و غلظت منبع قندی محیط کشت می‌باشد (Gaj, 2004). ریزنمونه‌های نوک شاخساره در محیط بهینه شده B_5 حاوی غلظت‌های ثابت از IAA وBA به همراه ۴۰ گرم بر لیتر گلوکز بیشترین درصد پرآوری را نشان دادند. این نتیجه حاکی از آن است که گلوکز به عنوان منبع قندی مناسب جهت باززایی بهتر گیاه بذرالبنج مشبک در محیط کشت می‌باشد.یکی از دلایلی که در این تحقیق می‌تواند گلوکز را به عنوان بهترین منبع قند محسوب کند، جذب کافی این قند در طول غشای پلاسمایی و ایجاد پتانسیل اسمزی بالقوه در محیط کشت می‌باشد.گیاهان مختلف پاسخ‌های متفاوتی را در مواجه با نوع و غلظت قندها در محیط کشت و شرایط *in vitro* از خود نشان می‌دهند. به دلیل اینکه ریزنمونه‌های مورد استفاده در کشت بافت ازنظرفتوسنتزی فعال نبوده، منبع قندی مناسب می‌تواند فاکتور مناسبی برای افزایش درصد باززایی باشد (Fatima *et al*; 2009).



نمودار«۲» مقایسه میانگین اثرات متقابل نوع و غلظت بر باززایی شاخهدر بذرالبنج مشبک. حروف غیر مشابه نشان دهنده تفاوت معنی‌دار در سطح احتمال۱ درصد در بین میانگین‌ها در آزمون دانکن می‌باشد.

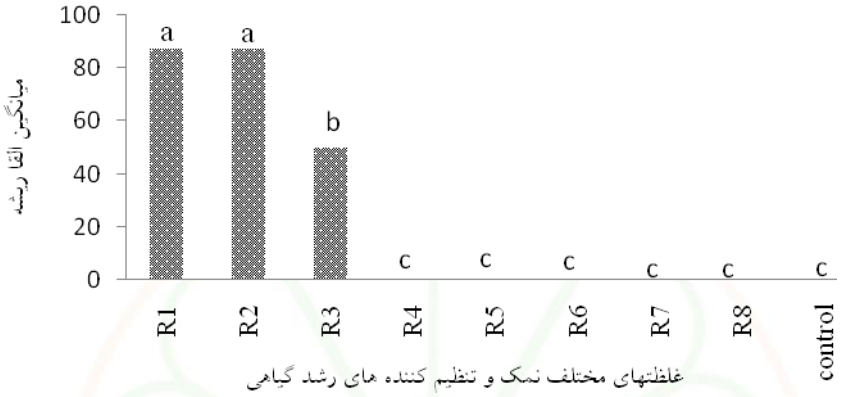
بررسی اثرات غلظت نمک (MS) و تنظیم کننده‌های رشد IAA و IBA بر ریشه‌زایی گیاهچه‌های باززایی شده

حدود ۴ هفته بعد از قرار گرفتن گیاهچه‌های حاصل از باززایی در محیط ریشه‌زایی، گیاهچه‌های ریشه دار شده با دقت از شیشه‌ها خارج و ریشه‌های القا شده شمارش شدند. نتایج تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که اثرات ساده و متقابل نوع محیط کشت و هورمون بر القا ریشه در سطح احتمال ۱ درصد معنی‌دار بود.مقایسه میانگین اثرات متقابل هورمون و محیط کشت بر القا ریشه نشان داد که محیط کشت MS حاوی 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 ½ و حاوی ۱/۱ میکرومول IBA، ۵۰ بود و در سایر تیمارها ریشه‌زایی صورت نگرفت (نمودار۳). 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).ریشه‌زایی بوسیله عوامل مختلفی مانند وجود تنظیم کننده‌های رشد در محیط، ترکیب نمک‌های پایه، ژنوتیپ و شرایط کشتی تحت تاثیر قرار می‌گیرد. اکسین‌ها نقش مهمی در ریشه‌زایی دارند و برای بیشتر گونه‌ها وجود اکسین برای انگیزش ریشه‌زایی لازم است (Nandagopal and RanjithaKumari, 2007).

IrHC2019

سازگاری

موفقیت هر پروتکل کشت بافت بستگی به سازگاری موفق گیاهچه‌های بدست آمده از کشت درون شیشه‌ای در شرایط گلخانه و مزرعه دارد (Nejadhabibvash*et al*., 2012). درتحقیق حاضر گیاهچه‌های بدست آمده از کشت درون شیشه‌ای، 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.می‌توان چنین نتیجه گرفت که با استفاده از تکنیک کشت بافت و با ریزنمونه 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.



R1=MS+ 1.1µM IBA, R2= MS+2.2µM IBA, R3= 1/2MS+ 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

نمودار «۳» مقایسه میانگین اثرات متقابل نوع محیط کشت و تیمار هورمونی بر میانگین ریشه‌های تولید شده در بذرالبنج مشبک

. حروف غیر مشابه نشان دهنده تفاوت معنی‌دار در سطح احتمال۵ درصد در بین میانگین‌ها در آزمون دانکن می‌باشد.

منابع

Calamar, A. and De Klerk, GJ. 2002. Effect of sucrose on adventitious root regeneration in apple. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 70(2): 207–212.

Fatima, Z., Mojib, A., Fatima, S., Arshi, A. and Umar, S. 2009. Callus induction,biomass growth and regeneration in *Digitalis lanata* Ehrh: influence of plant growthregulators and carbohydrates. Journal of Biotechnology, 33: 1-13.

Gaj, MD. 2004. Factors influencing somatic embryogenesis inductionand plant regeneration with particular reference to *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. Plant Growth Regul, 43: 27-47.

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.

Nandagopal, S. and RanjithaKumari, B.D. 2007. Effectiveness of auxin induced *in vitro* root culture in *Chicory*. Centrol European Agriculture, 8: 73- 79.

IrHC2019

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.

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, 177-123.

Swamy, MK., Balasubramanya, S. and Anuradha, M. 2010. *In vitro*multiplication of *Pogostemon cablin* Benth. Through directregeneration. African Journal of Biotechnology, 9(14):2069–2075.

Wu, X. 2007. Establishment and chemical analysis of hairy root of *Eucommia ulmoides*. Doctoral thesis. China, 65 pp.

Effect of basal media culture, sugar type and concentration and different hormonal combinations on micropropagation of *Hyoscyamus reticulatus* L.

Raghib Baleghchi[1], Bahman Hosseini[2], Alireza Farokhzad[2]

[1] Master science of medicinal plant

[2] Department of Horticultural Sciences, Faculty of Agriculture, Urmia University

[*]*Corresponding Author: b.hosseini@urmia.ac.ir*

Abstract

Hyoscyamus genus Plants produces some important compounds such as hyoscyamine and scopolamine as secondary metabolites, which exhibits a wide range of pharmacological and toxic activity. *H. reticulatus*is a medicinal plant known as main source of tropane alkaloids such as hyoscyamine and scopolamine.Given the importance of *H. reticulatus* L. optimization of proliferation under *in vitro* condition is necessary. Present study designed to determine the best medium, the best sugar concentration and environmental conditions suitable for cultivation under *in vitro* condition. On this research shoot regeneration and germination of *Hyscyamus reticulatus* L. under *in vitro* condition was investigated using different media (MS, ½ MS, MS Modified and B_5) enriched with 2 mg/l Benzyladenine (BA) in combination with 0.1 mg/l Indole-3 acetic acid (IAA) and different carbon sources (maltose, glucose, sucrose) with various concentrations 20, 30, 40 mg/l. the maximum shoots regeneration (average of 17.06 shoots per treatment) and germination (88.33 percent) were achieved in B5 medium. The regenerated shoots were transferred to root induction media including, MS and ½ MS media whit different concentration of IAA and IBA (0, 1.1 and 2.2 µM) during four weeks. The maximum average of root induction (87.50 roots) were obtained in MS medium (1.1, 2.2 µM) IBA.

Key words: Carbohydrate, Culturemedium, *Hyscyamus reticulatus* L.,Plant growth regulators.

IrHC2019