امکان‌سنجی استفاده از جوانه‌های گیاهی آسیاب شده با هدف تقویت محیط‌های کشت بافت گیاهی

مهدی علیزاده[1*]، سیما بادلی[2]، مریم دباغ[2]، میعاد کیا[3]

[1*] دانشیار گروه باغبانی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان.

[2] دانشجوی سابق کارشناسی ارشد باغبانی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان.

[3] دانشجوی دکتری، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری.

*نویسنده مسئول: mahdializadeh@gau.ac.ir

چکیده

کشت بافت گیاهی یک روش کارآمد برای ازدیاد رویشی گیاهان به شمار می‌رود. میزان موفقیت در این تکنولوژی به چند عامل خیلی ساده بستگی دارد. یک عامل بسیار مهم انتخاب صحیح اجزای محیط کشت می‌باشد. میزان رشد و باززایی بافت‌های گیاهی با افزودن مقدار کمی از ترکیبات آلی مانند پودر جوانه‌ی گیاهی بهبود پیدا می‌کند. علاوه بر یک منبع غنی از کربن، جوانه‌های گیاهی آسیاب شده ممکن است حاوی ویتامین‌های طبیعی، فنول، فیبر، هورمون و پروتئین باشند و بنابراین افزودن آن‌ها به محیط کشت نقش مثبت دارد. در پژوهش حاضر، توده‌های بذر سه گیاه گندم، یونجه و ماش پس از جوانه‌زنی و خروج ریشه‌چه در آون خشک و سپس آسیاب شد تا پودر همگنی به دست آمد. محیط‌های ریزافزایی که قبلاً برای گیاهان استویا و تمشک بهینه‌سازی شده بود تهیه و هرکدام با یک گرم از پودر موردنظر غنی سازی شد. میزان رشد و برخی صفات مرفوفیزیولوژیکی هر گیاه در محیط‌های حاوی پودر جوانه‌های گیاهی ارزیابی و ثبت گردید. نتایج نشان داد که واکنش هر نمونه گیاهی نسبت به محیط‌های غنی‌شده با پودر جوانه گیاهی متفاوت بود. نمونه‌های تمشک واکنش مثبتی به محیط حاوی پودر جوانه ماش نشان دادند به‌طوری‌که میزان ریشه‌زایی، شاخه‌زایی، تعداد برگ، تعداد ریشه و طول گیاهچه نسبت به شاهد بهبود یافت. گیاه استویا به محیط حاوی پودر جوانه ماش و نیز گندم واکنش مثبتی نشان داد. بلندترین طول گیاهچه‌های استویا در محیط حاوی پودر جوانه ماش مشاهده شد که البته با شاهد تفاوت معنی‌داری نداشت. با وجود مشاهده اثرات مثبت افزودن پودر جوانه‌های گیاهی به محیط کشت، توصیه آن‌ها به‌عنوان یک ترکیب ثابت در محیط کشت نیاز به مطالعات تکمیلی بیشتری دارد.

کلمات کلیدی: **جوانه‌ی گیاهی، کشت بافت، تمشک، استویا، محیط کشت**

مقدمه

میزان موفقیت در فنون کشت بافت گیاهی، به چند عامل خیلی ساده بستگی دارد. یک عامل بسیار مهم انتخاب صحیح نوع تنظیم‌کننده‌ی رشد و نوع اجزای محیط کشت می‌باشد(Khorsha, 2014). مواد تشکیل دهنده محیط کشت را می‌توان به چند دسته عناصر پرمصرف، کم‌مصرف، ترکیب‌ها آلی (هیدرات‌های کربن، ویتامین‌ها، میواینوزیتول، اسیدهای آمینه، مکمل‌های آلی)، تنظیم‌کننده‌های رشد و مواد دیگر تقسیم‌بندی کرد (Alizadeh, 2011). هریک از ترکیب‌های تشکیل دهنده محیط کشت دارای آثار فیزیولوژیکی و متابولیسمی خاص برای ریزنمونه است. در برخی از گونه‌های گیاهی علاوه بر ترکیب‌های ضروری محیط کشت، ممکن است از افزودنی‌های دیگری نیز استفاده شود که مرسوم‌ترین آن‌ها شیره نارگیل، عصاره گوجه‌فرنگی، پوره موز و مواد دیگر می‌باشد(khoshkhui, 2001).

هزینه تولید بالا یکی از معایب فنون کشت بافت گیاهی بوده که بخشی از آن مربوط به ترکیب‌های محیط کشت است. بنابراین به دلیل کاربرد مواد شیمیایی گران‌قیمت، کاربرد گسترده‌ی این روش‌ها در کشورهای درحال‌توسعه ازجمله ایران محدود می‌باشد (Omidi and Tabatabei, 2011). بررسی امکان استفاده از پودر جوانه‌های گیاهی مختلف ، در صورت ایجاد واکنش رشدی مطلوب، می‌تواند در آینده ترکیب‌های جدید و ارزان‌قیمتی را برای غنی‌سازی محیط کشت بافت گیاهی معرفی نماید.

مواد و روش‌ها

پژوهش حاضر، در سال ۱۳۹۵ در قالب یک طرح پژوهشی درون دانشگاهی اجرا شد که امکان استفاده از جوانه های گیاهی آسیاب شده (گندم *Triticum* aestivum، یونجه *Medicago sativa*، ماش *Vigna radiata*) جهت تقویت محیط‌های کشت بافت چند گیاه مختلف ارزیابی شد که در مقاله حاضر فقط نتایج مربوط به دو گیاه استویا و تمشک گزارش می‌گردد. محیط‌های کشت پرآوری شاخه که طی آزمایش‌های قبلی برای دو گیاه استویا و تمشک بهینه‌سازی شده بود، با افزودن پودر جوانه‌های گیاهی آسیاب شده تقویت شد و واکنش نمونه‌های فوق در این محیط کشت‌های حاوی پودر جوانه گیاهی ارزیابی گردید. ابتدا بذر گیاهان گندم، یونجه، ماش تهیه شده و پس از شستشو به مدت یک شب (۱۲ ساعت) در آب خیسانده شد تا متورم شوند. سپس آب اضافی خارج شده و بذور بین پارچه مرطوب پیچیده شده و در دمای اتاق جهت جوانه‌زنی قرار گرفت. بذرها بین ۵ تا ۷ روز جوانه‌زده و خروج ریشه‌چه مشاهده شد. هنگامی‌که طول ریشه‌چه به ۱ سانتی‌متر رسید، جوانه‌ها به آون منتقل شده و در دمای ۵۵ درجه سانتی‌گراد خشک و سپس آسیاب شد تا پودر همگنی حاصل شد. پودر جوانه در بطری‌های شیشه‌ای ذخیره شد و در یخچال قرار گرفت تا به هنگام تهیه محیط کشت استفاده شوند (پودر جوانه همزمان با مراحل تهیه محیط کشت، قبل از افزودن آگار به اجزای محیط کشت اضافه شد).

در هر دو گیاه از محیط پایه MS (Murashige and Skoog, 1969) استفاده شد با این تفاوت که محیط کشت حاوی بنزیل آدنین (۱ میلی‌گرم در لیتر) و نفتالین استیک اسید (۲ میلی‌گرم در لیتر) برای نمونه‌های استویا و محیط کشت حاوی ایندول بوتیریک اسید (۱میلی‌گرم در لیتر) برای گیاه تمشک تهیه شد. این دو محیط کشت قبلاً در آزمایشگاه برای پرآوری شاخه (مرحله دوم ریزافزایی) در این دو گیاه بهینه شده بود. بنابراین، به هنگام تهیه محیط کشت یک گرم از پودر جوانه گیاهان ماش، گندم و یا یونجه به محیط کشت منتخب که در بالا بیان شد، افزوده شد. به‌عنوان شاهد تمام نمک‌های محیط کشت حذف و با یک گرم از پودر جوانه گیاهی جایگزین شد.

نمونه‌ها به مدت چهار هفته در شرایط استاندارد اتاق رشد قرار گرفته تا پرآوری نمایند. سپس صفاتی نظیر وضعیت ظاهری رشد نمونه‌ها (ارزیابی مشاهده‌ای)، ارتفاع گیاه، تعداد شاخه، ریشه و برگ، وزن تر نمونه‌ها اندازه‌گیری و ثبت گردید. داده‌های به دست آمده از این آزمایش به‌صورت طرح کاملاً تصادفی با چهار تکرار تجزیه و تحلیل شد. مقایسه میانگین داده‌ها با استفاده از آزمون LSD در سطح احتمال ۵ درصد با استفاده از نرم‌افزار آماری SAS انجام شد.

نتایج و بحث

در کشت بافت و مطالعات درون‌شیشه‌ای، محیط کشت نقش تعیین‌کننده‌ای در میزان رشد، پرآوری و باززایی درون‌شیشه‌ای نمونه‌های گیاهی دارد. افزودن برخی ترکیب‌های آلی (غنی‌سازی محیط کشت) موجب رشد و ریخت زایی بهتر برخی نمونه‌های گیاهی می‌شود. در پژوهش حاضر، افزودن جوانه‌های گیاهی آسیاب شده (پودر جوانه) به محیط کشت گیاهان، تغییراتی را نشان داد که برخی از آن‌ها قابل توجه است. نتایج پژوهش حاضر به‌وضوح نقش مثبت پودر جوانه‌های گیاهی را در بهبود صفات رشدی گیاهان آزمون شده نشان می‌دهد. برخی از داده‌های مربوط به

صفات رشدی گیاهان استویا و تمشک پس از غنی‌سازی محیط کشت با پودر جوانه، به ترتیب در جداول ۱ و ۲ نشان داده شده است.

جدول ۱. مقایسه میانگین کاربرد پودر جوانه‌های گیاهی بر برخی صفات رشدی گیاه استویا (*Stevia rebaudiana*).

تیمار*	تعداد شاخه	تعداد ریشه	تعداد برگ	سطح برگ cm^2	طول ریشه mm	وزن تر mg
MS	۱/۸^{a}	۴/۰^{a}	۴/۹^{a}	۰/۶۹^{a}	۲/۳^{a}	۰/۸۴^{a}
M	۱/۹^{a}	۳/۲^{c}	۵/۰^{a}	۰/۵۸^{a}	۲/۲^{a}	۰/۸۲^{a}
Y	۱/۳^{a}	۱/۸^{d}	۳/۸^{ab}	۰/۵۸^{a}	۰/۴^{c}	۰/۴۱^{b}
G	۱/۸^{a}	۳/۶^{ab}	۴/۲^{bc}	۰/۶۳^{a}	۱/۵^{b}	۰/۸۲^{a}
H	۱/۰^{b}	۲/۷^{dc}	۳/۲^{c}	۰/۷۶^{a}	۰/۷^{c}	۰/۴۲^{b}

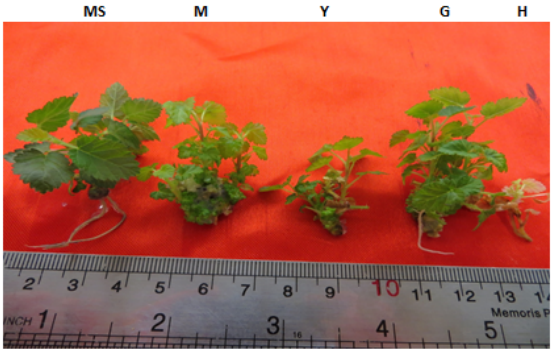
*محیط کشت استاندارد (MS)، محیط کشت MS غنی‌شده با پودر جوانه ماش (M)، یونجه (Y)، گندم (G) و محیط کشت فاقد نمک‌های MS ولی دارای پودر جوانه (H) که به‌عنوان شاهد استفاده شده است.

گزارش‌هایی وجود دارد که مواد آلی افزوده شده به محیط کشت، علاوه بر اینکه یک منبع طبیعی کربن است، حاوی ویتامین‌های طبیعی، فنل‌ها، فیبر، هورمون‌ها و همچنین پروتئین می‌باشند (Khorsha, 2014). نتایج پژوهش حاضر نشان داد که، در گیاه استویا در همه‌ی تیمارها ریشه‌زایی مشاهده شده است و بیشترین تعداد ریشه در محیط استاندارد MS مشاهده شد. در گیاه تمشک ریشه‌زایی در محیط‌های حاوی پودر جوانه گندم، یونجه و شاهد نسبت به سایر تیمارها تغییر معنی‌داری نداشته است ولی محیط حاوی پودر جوانه ماش بیشترین تعداد ریشه و محیط استاندارد MS بیشترین طول ریشه را داشته است. بیشترین طول ریشه نیز در محیط MS و همچنین محیط غنی‌شده با پودر جوانه ماش ثبت شد. طول گیاهچه تمشک و استویا در محیط کشت حاوی پودر جوانه ماش بالاترین میزان را به نسبت به سایر محیط‌های غنی‌شده با پودر جوانه به خود اختصاص داد (داده‌ها نشان داده نشده است). بیشترین تعداد برگ در محیط کشت حاوی پودر جوانه ماش در گیاه تمشک و استویا مشاهده شد. در گیاه تمشک بیشترین تعداد میانگره و بلندترین فواصل میانگره در گیاهان تیمار شده با پودر جوانه ماش مشاهده شد(نتایج نشان داده نشده است). در گیاه تمشک تعداد شاخه فرعی در محیط کشت حاوی پودر جوانه ماش و در گیاه استویا محیط کشت MS و محیط‌های حاوی پودر جوانه ماش و گندم بیشترین و شاهد کمترین میزان گزارش شد. در گیاه تمشک بین محیط‌های حاوی پودر جوانه ماش و گندم با محیط پایه از نظر سطح برگ تفاوت معنی‌داری از نظر آماری وجود ندارد. تمامی این نتایج حاکی از آن است که گیاهان درون شیشه‌ای از قندها و هورمون‌های موجود در ماده آلی پودر جوانه‌های گندم و ماش برای فرآیند رشد و نمو استفاده کرده است و سرعت این فرآیندها به دلایل ذکر شده در بالا افزایش پیدا کرده است.

جدول ۲. مقایسه میانگین کاربرد پودر جوانه‌های گیاهی بر برخی صفات رشدی گیاه تمشک (*Rubus sp.*).

تیمار*	تعداد شاخه	تعداد ریشه	تعداد برگ	سطح برگ cm^2	طول ریشه mm	وزن تر mg
MS	۱/۴۷^{b}	۰/۹^{ab}	۴/۰۰^{bc}	۱/۱۰^{a}	۲/۴۸^{a}	۰/۶۸^{b}
M	۲/۶۴^{a}	۱/۴^{a}	۶/۴۱^{a}	۰/۹۲^{a}	۱/۳۶^{b}	۱/۲۱^{a}
Y	۲/۲۷^{ab}	-	۵/۲۴^{ab}	۰/۷۶^{ab}	-	۰/۵۹^{b}
G	۲/۰۶^{ab}	-	۴/۹۰^{ab}	۰/۹۵^{a}	-	۱/۱۸^{a}
H	۱/۴۷^{b}	-	۲/۹۳^{c}	۰/۵۶^{b}	-	۰/۳۶^{c}

*محیط کشت استاندارد (MS)، محیط کشت MS غنی‌شده با پودر جوانه ماش (M)، یونجه (Y)، گندم (G) و محیط کشت فاقد نمک‌های MS ولی دارای پودر جوانه (H) که به‌عنوان شاهد استفاده شده است. داده‌هایی که با علامت - نشان داده شده، قابل‌اندازه‌گیری نبوده است.



شکل ۱. تصویری از رشد گیاهچه‌های درون‌شیشه‌ای تمشک، ۴ هفته پس از واکشت روی محیط کشت‌های منتخب. محیط کشت استاندارد (MS)، محیط کشت MS غنی‌شده با پودر جوانه ماش (M)، یونجه (Y)، گندم (G) و محیط کشت فاقد نمک‌های MS ولی دارای پودر جوانه (H) که به‌عنوان شاهد استفاده شده است.

اثرات مثبت مشاهده شده در این پژوهش با آنچه قبلاً توسط برخی پژوهشگران گزارش شده است همخوانی دارد. مثلاً افزودنی‌های آلی به محیط کشت گیاهان ارکید سبب افزایش تعداد برگ و شاخه آن‌ها شد (Akter *et al*., 2007) و یا در نمونه‌های نخل خرما (Al-khateeb, 2008a,b) اندازه جنین رویشی در اثر کاربرد این گونه مواد بزرگ‌تر گزارش شده است. درمجموع پژوهش حاضر نشان داد که افزودن پودر جوانه به محیط کشت اثرات مثبتی دارد که با توجه به نوع جوانه مورداستفاده متفاوت است. درمجموع در پژوهش اولیه حاضر، کاربرد پودر جوانه‌ی ماش و گندم اثرات مثبت برتری داشت که به‌منظور بهینه‌سازی یک محیط کشت پایدار، مطالعه آن‌ها در سایر گیاهان در حال ارزیابی است.

منابع

Akter, S., Nasiruddin, K.M., Khaldun, A.B.M., 2007. Organogenesis of *Dendrobium* orchid using traditional media and organic extracts. Journal of Agriculture and Rural Developement. 5(1&2): 30-35.

Alizadeh, M. 2011. A user manual on plant tissue culture and micropropagation. Nowrozi Publications, Gorgan, Golestan, Iran. (In Persian).

Al-khateeb, A.A. 2008a. Comparison effects of sucrose and date palm syrup on somatic embryogenesis of date palm (*Phoenix dactylifera* L.). American Journal of Biotechnology and Biochemisty. 4(1):19–23.

Al-Khateeb, A.A., 2008b. Regulation of *in vitro* bud formation of date palm (*Phoenix dactylifera* L.) cv. Khanezi by different carbon sources. Bioresourse Techniques. 99 (14): 6550-6555.

Khoshkhui, M. 1999. Plant tissue culture techniques for horticultural crops. Shiraz University, Shiraz, Iran.(In Persian).

Khorsha, S., 2014. Feasibilty of application of apricot gum in grapevine tissue culture and micropropagation media. MSc thesis, College of Plant Production, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural resources, Gorgan, Iran.

Murashige, T., Skoog, F., 1962. A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant. 15: 473-497.

Omidi, M., Tabatabaei, B. 2011. Plant Cell and tissue culture, Tehran University, Tehran, Iran. (In Persian).

The Feasibility of Application of Plant Sprout Powders with the Goal of Enrichment of Plant Tissue Culture Media

Mahdi Alizadeh[1]*, Sima Badeli[2], Maryam Dabbagh[2], Miaad Kia[3]
[1*] Associate Prof., Horticulture Department, Gorgan University of Agricultural sciences & Natural Resources.
[2] Former MSc student, Gorgan University of Agricultural sciences & Natural Resources.
[3] PhD student, Sari University of Agricultural sciences & Natural Resources.
[*]*Corresponding Author: mahdializadeh@gau.ac.ir*

Abstract

Plant tissue culture is considered as an efficient method for plant propagation. The success in this technology is affected by few simple factors, in which the choice of proper media culture and its ingredients is very considerable. The growth and morphogenesis of cultured plant tissues can be improved by addition of small amounts of some organic elements. Besides a natural source of carbon, plant sprout powders (PSP) may contain natural vitamins, phenols, fiber, hormones and also proteins. Hence, their addition to the media may have a positive role. In the present study, the germinated seed lots of wheat, alfalfa and vetch were oven-dried and then milled to evolve a uniform powder. The multiplication media that previously standardized for stevia and raspberry were prepared and enriched with 1g of PSP. The growth and morpho-physiological traits of each plant in PSP-enriched media were evaluated and recorded. The results revealed a different response of each plant sample to a particular PSP-enriched media. The raspberry samples showed a positive response to vetch powder and the rooting, shooting, number of leaves and plantlet length were enhanced as compared to control. The stevia plant showed a positive response to both vetch and wheat sprout powders. The highest stevia plant length was recorded in vetch sprout powder enriched medium but it was not statistically different with control. Though observation of positive effects of PSP-enriched media in the present study, recommendation for application of such ingredients as a constant part of media culture needs to further complementary experiments.

***Keywords*: Plant sprout, Tissue culture, Raspberry, Stevia, medium.**