

جمع آوری و معرفی گیاه زینتی *Scilla siberica* و بررسی کشت درون شیشه‌ای آن

نصراله سوری (۱)، محمدرضا حسندخت (۲)، محمدعلی پاداشت (۳) و ناصر صباغ‌نیا (۴)

۱- عضو هیأت علمی دانشگاه پیام نور لرستان- کوه‌دشت، ۲- استادیار گروه باغبانی پردیس کشاورزی دانشگاه تهران، ۳- عضو هیأت علمی ایستگاه تحقیقات گل و گیاه لاهیجان، ۴- دانشجوی دکترای اصلاح نباتات دانشگاه تربیت مدرس

چکیده

ایران با دارا بودن شرایط مختلف آب و هوایی از تنوع غنی در زمینه گونه‌های مختلف گیاهان برخوردار است. تنوع گیاهی ایران شامل تعداد گونه‌های فراوانی می‌باشد اما فرسایش ژنتیکی عامل از دست رفتن سریع این منابع غنی است. ارزش ژرم‌پلاسم ژنتیکی برای برنامه‌های اصلاحی، فرآیندهای بیوتکنولوژی و مهندسی ژنتیک بخاطر مخزن ژن‌های مطلوب می‌باشد. *Scilla* گیاهی زینتی از تیره *Liliaceae* بوده و دارای بیش از ۸۰ گونه اروپایی، آسیایی و آفریقایی است و حدود ۱۰ گونه از آن نیز در ایران مشاهده می‌شود که رنگ گل‌های آنها از سفید تا آبی و بنفش متفاوت می‌باشد. در این پژوهش به منظور تکثیر گیاه زینتی *Scilla siberica* در شرایط کشت درون شیشه‌ای و برای القای کالوس و باززایی، از برگ و شاخساره و فلس‌های پیاز آن به عنوان ریزنمونه استفاده گردید. جهت کنترل آلودگی از تیمارهای مختلف ضدعفونی و دو نوع آنتی‌بیوتیک استفاده شد. با توجه به بررسی‌های صورت گرفته و نحوه آلودگی‌ها در محیط کشت، مشخص شد که آلودگی موجود در نمونه‌های پیازی از نوع آلودگی داخلی می‌باشد. آنتی‌بیوتیک‌های مورد استفاده در آزمایش‌ها در کنترل آلودگی اثر چندانی نداشتند اما ماده کلرید جیوه در کنترل آلودگی دارای تأثیر نسبی بود.

مقدمه

گرچه دیر زمانی از پرورش و تولید گیاهان زینتی در ایران به صورت تجارتي نمی‌گذرد (حدود ۶۵ سال) اما با توجه به اینکه گل، یکی از بارزترین مظاهر زیبایی در طبیعت است، از دیرباز مورد توجه انسان بوده و همیشه از عطر و زیبایی آن به منظور رفع خستگی، شادی روح و تزئین محیط زندگی خود استفاده کرده است. امروزه که عوامل بسیاری نظیر پیشرفت صنعت و ماشینی شدن حیات در نتیجه دور افتادن انسان از دامان پر طراوت طبیعت، همچنین رشد بی‌رویه جمعیت، گسترده‌گی شهرها و تراکم شهرنشینی باعث شده‌اند که مردم نسبت به گذشته از گل و گلکاری بیشتر استقبال کنند و نیز برای زیباسازی فضای سبز و پارک‌ها، اهمیت خاصی قائل شوند. بر اثر این عوامل گلکاری نه تنها به صورت علم بلکه به صورت فن و از همه مهمتر، به صورت هنری ظریف و زیبا خودنمایی می‌کند. امروزه از گل در مراسم مختلف از سوگواری و عیادت بیماران گرفته تا جشنها و عروسی‌ها و اعیاد مذهبی و ملی استفاده می‌کنند و این خود نشانگر رابطه تنگاتنگ روحی انسان با گل است. گیاهان جنس *Scilla* از تیره لیلیاسه بوده و دارای بیش از ۸۰ گونه اروپایی، آسیایی و آفریقایی است. بیشتر گونه‌های آن در بهار گل می‌دهند و بعضی نیز در تابستان و پاییز گلشان ظاهر می‌شود (جدول ۱)، ولی اهمیت دسته اول بیشتر می‌باشد و گل‌های آنها جالب‌ترینند.

جدول ۱) زمان گلدهی و ارتفاع گیاهان مقاوم به سرما *Scilla*

<i>Species</i>	<i>Time</i>	<i>Height (cm)</i>
<i>S. amoena</i>	April- May	15
<i>S. autumnalis</i>	August- September	22.5
<i>S. bifolia</i>	March- April	22.5
<i>S. hyacinthoides</i>	July- August	37.5
<i>S. italica</i>	April- May	37.5
<i>S. lilio-hyacinthus</i>	May- June	30
<i>S. monophylla</i>	May- June	15
<i>S. messanaica</i>	April- May	15
<i>S. odorata</i>	May- June	22.5
<i>S. peruviana</i>	May- June	22.5
<i>S. pratensis</i>	May- June	30
<i>S. sibirica</i>	March- April	15-20
<i>S. tubergeniana</i>	February- April	10-15
<i>S. verna</i>	April- May	15-20

کشت و پرورش

بعضی از گونه‌ها که بومی آفریقای جنوبی هستند به سرما مقاوم نبوده باید در گلخانه سرد پرورش داده شوند. به طور کلی پرورش این گیاهان بسیار آسان است. پیازها که فرم و رنگشان در گونه‌های مختلف فرق می‌کند باید در پاییز در زمینی سبک و هوموس‌دار به عمق ۱۰-۵ سانتیمتر کاشته شود. محل کاشت بایستی در زمستان آفتابی باشد. پیازها را پس از پایان گل می‌توان در محل باقی گذاشت. وقتی گلها شروع به باز شدن می‌کنند باید مرتب آنها را آبیاری نمود و خاک را همیشه مرطوب نگه داشت.

پیازهای گیاه *Scilla sibirica*

(محل جمع‌آوری: منطقه خاس‌خانی شهرستان سیاهکل)



وضعیت ساقه گلدهنده و گل‌های *Scilla siberica*

(محل جمع‌آوری: منطقه خاس‌خانی شهرستان سیاهکل)

ازدیاد

۱) پیازچه: گیاهان را هر سه یا چهارسال یکبار در اواخر خرداد از زمین در آورده و پیازچه‌ها را از پیاز مادری جدا می‌کنند. این کار باید پس از زرد شدن برگها انجام گیرد یعنی برای گونه‌هایی که در بهار گل می‌دهند در آخر تابستان و برای گونه‌های پاییزه در بهار پیازچه‌ها را جدا می‌کنند. پیازچه‌ها را در هوای آزاد در زمین شنی به عمق ۵ سانتیمتر و به فاصله ۲/۵ سانتیمتر از یکدیگر می‌کارند و پس از ۲ سال درشت شده قادر به گل کردن می‌شوند.

۲) کشت بذر: بذر را مهرماه در جعبه در خاک شنی می‌کارند و در زیر شاسی قرار می‌دهند تا سبز شوند و سپس جعبه‌ها را به محلی سایه در هوای آزاد منتقل می‌کنند، پیازها ۲ سال را درون جعبه می‌گذرانند و در دوران رشدشان احتیاج زیادی به آب دارند، پس از ۲ سال پیازهای حاصله قطرشان به یک سانتیمتر می‌رسد که آنها را از خاک بیرون آورده خشک می‌کنند و سپس در پاییز می‌کارند، ۲ سال دیگر وقت لازم است تا پیازها به گل بنشینند. بدین ترتیب ۵ سال بعد از کشت بذر گیاهان گل می‌دهند.

مواد و روش‌ها

پیازهای *Scilla* از ارتفاعات استان گیلان، جاده سیاهکل به دیلمان، بالاتر از لونک (۲۰ کیلومتر بعد از سیاهکل) در منطقه خاس‌خانی به کمک مرکز تحقیقات گل و گیاه شهرستان لاهیجان جمع‌آوری گردیدند. از گیاهانی که در مجاورت این گیاه رویش داشتند می‌توان به تمشک، خاس، کوله‌خاس، ازگیل وحشی، سرخس‌های وحشی در جنگل‌های مملو از راش اشاره نمود. جهت تابش نور طوری بود که در صبح‌ها به گیاهان موردنظر آفتاب می‌خورد و بعد از ظهرها در سایه تپه‌ها و درختان واقع بودند. خاک محل رویش خاکی آلی با بافت سبک و با خاک زیرین معمولی با مواد آلی کم بود. محیط پیازها از ۱/۲ تا ۲/۷ سانتیمتر متفاوت و فلس بیرونی آنها به رنگ قهوه‌ای بود. پیازها پس از جمع‌آوری در یخچال معمولی نگهداری شدند. به منظور القای کالوس و بازایی، برگ و شاخساره و فلس‌های پیاز به عنوان ریزنمونه استفاده گردید. در تمام آزمایش‌ها تمام نمونه‌های پیازی پس از شستشو به مدت یک ساعت در زیر آب شیر قرار گرفتند. سپس پیازها به مدت ۳۰ دقیقه در آب گرم ۴۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. سپس ۲ تیمار بر روی آنها اعمال گردید: تیمار ۱) پیازها به مدت ۴۰ ثانیه در الکل متیلیک و بعد به مدت ۱۰ دقیقه در هیپوکلریت سدیم ۵ درصد ضدعفونی شدند و پس از آن، با آب مقطر استریل شده ۳ بار شستشو شدند و سپس در محیط‌کشت تهیه شده برای پیازها، کشت گردیدند. تیمار ۲) پیازها به مدت ۴۰ ثانیه در الکل متیلیک و بعد به مدت ۱۰ دقیقه در هیپوکلریت کلسیم ۵ درصد ضدعفونی شدند و پس از آن، با آب مقطر استریل شده ۳ بار شستشو شدند و سپس در محیط‌کشت تهیه شده برای پیازها، کشت گردیدند. برای ضدعفونی برگها نیز پس از شستشوی آنها با آب از هیپوکلریت سدیم ۱ درصد استفاده گردید و با آب مقطر استریل شده ۳ بار شستشو گردیدند و سپس در محیط‌کشت تهیه شده برای برگها و شاخساره‌ها، کشت گردیدند.

شرایط کشت درون‌شیشه‌ای

pH محیط‌کشت برابر ۵/۸ و میزان آگار به مقدار ۶ درصد تنظیم گردید. محیط‌های کشت برای موادی که قابل اتوکلاو بودند به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۱۲۱°C اتوکلاو گردیدند. در مورد موادی که قابل اتوکلاو نبودند مثل ماده باکتری‌کش سولفات

استرپتومایسین عمل فیلترکردن انجام شد. ریز نمونه‌های کشت شده را در انکوباتور با دمای 25°C و رطوبت نسبی ۵۰ درصد با تیمارهای نوری ۱۶ ساعت نور و ۸ ساعت تاریکی و تاریکی کامل قرار داده شد.

کشت ریزنمونه‌ها

محیط کشت مورد استفاده برای کشت ریزنمونه‌ها MS بود اما ترکیبات هورمونی موجود در آن برای ریزنمونه‌های پیازی و برگه و شاخساره‌ای متفاوت بود. برای کالوس‌زایی پیازها از هورمونهای توفوردی (D-2.4) با غلظت ۱ میلی‌گرم در لیتر و کینتین با غلظت ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر استفاده گردید. در این آزمایش‌ها برای باززایی مستقیم از برگه‌ها و شاخساره‌ها نیز از هورمون BAP با غلظت ۱ میلی‌گرم در لیتر استفاده شد. در عملیات کشت ریزنمونه‌ها، برای کشت پیازها، آنها را بوسیله ۲ برش عمودی که از بالا انجام می‌شد به ۴ قسمت تقسیم و به همراه هر قسمت مقداری از قاعده پیاز نیز همراه گردید. بعضی از پیازها به دلیل کوچکی به طور سالم کاشت گردیدند و یا نصف شدند. در مورد ریزنمونه‌های برگه هم از برگه‌ها و هم از شاخساره استفاده گردید. در شاخساره از قسمت سفید بین پیاز و برگه‌های سبز (غلاف) استفاده شد و در مورد برگه‌ها نیز هم از قسمت پایینی و هم از قسمتهای بالاتر استفاده شد.

نتایج و بحث آزمایش‌های اولیه

در آزمایش‌های اولیه، تمام نمونه‌های کشت شده یکی پس از دیگری آلوده شدند. آزمایش‌ها بار دیگر تکرار شدند و باز هم چیزی جز آلودگی مشاهده نگردید. مبرهن است که شرط لازم برای یک آزمایش موفق در کشت بافت در ابتدا نداشتن آلودگی می‌باشد، لذا باید در درجه اول به فکر رفع آلودگی بود. بدین ترتیب آزمایش‌هایی جهت رفع آلودگی‌ها طراحی گردید. لذا در این زمینه آزمایشاتی انجام پذیرفت که قبل از پرداختن به آنها ابتدا لازم است در مورد آلودگی و ضدعفونی مواد گیاهی توضیحاتی داده شود. اساساً چهار منبع آلودگی وجود دارد: گیاه (آلودگی داخلی و خارجی)، محیط کشت (به اندازه کافی ضدعفونی نشده باشد)، هوا و عدم دقت محقق. مهمترین اینها خود گیاه است که مواد گیاهی بایستی به خوبی قبل از قرار گرفتن در محیط کشت، ضدعفونی شوند. باید در نظر داشت کشت‌هایی که به صورت استریل انجام می‌شوند و به نظر استریل می‌آیند، ممکن است کاملاً استریل نباشند. اگر منشأ آلودگی در داخل بافت‌های گیاهی باشد، آلودگی معمولاً هنگامی ظاهر می‌شود که محل آلوده قطع شده و در هنگام تهیه واکشت، امکان باز شدن و تماس با محیط کشت فراهم گردد. آلودگی داخلی می‌تواند مشکل‌آفرین باشد و اغلب به علت وجود میکرواورگانیزم‌هایی اتفاق می‌افتد که در داخل گیاه هستند و نمی‌توان آنها را از طریق مواد ضدعفونی‌کننده خارجی دفع نمود. به طور کلی دو راه برای مبارزه با این مشکل وجود دارد: (۱) کشت مرستم و (۲) اضافه کردن آنتی‌بیوتیک به محیط کشت. از آنجا که کشت مرستم خیلی پیچیده است و اضافه کردن آنتی‌بیوتیک به محیط کشت کمتر موثر است، ساده‌ترین راه، استفاده از مواد گیاهی غیرآلوده می‌باشد. اضافه کردن آنتی‌بیوتیک‌ها اغلب باعث پدیده فیتوتوکسیک (سمیت گیاهی) می‌شود به طوری که غلظت‌های زیاد آنتی‌بیوتیک مانع رشد و نمو گیاهان عالی و باعث ایجاد مقاومت در باکتری‌ها می‌شوند. استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها سبب گزینش میکرواورگانیزم‌های مقاوم نیز می‌شود.

آزمایشات جهت رفع آلودگی

در آزمایشات برای کنترل آلودگی به خاطر از دست دادن نمونه‌های برگ‌ی و شاخساره‌ای و همچنین سپری شدن دوره رشد رویشی گیاه مورد آزمایش فقط آزمایش‌ها بر روی پیازها انجام گردید. در این آزمایش‌ها از تیمارهای مختلف ضدعفونی و همچنین از آنتی‌بیوتیک‌های قابل دسترس برای کنترل آلودگی استفاده گردید. تیمارهای که انجام شد عبارت بودند از:

آنتی‌بیوتیک سولفات استرپتومایسین

(۱) کشت پیازها در محیط‌کشت آزمایش اولیه به عنوان تیمار شاهد: پیازها به مدت ۴۰ ثانیه در الکل متیلیک و بعد به مدت ۱۰ دقیقه در هیپوکلریت سدیم ۵ درصد ضدعفونی شدند و پس از آن، با آب مقطر استریل شده ۳ بار شستشو شدند و سپس در محیط‌کشت تهیه شده برای پیازها کشت گردیدند، (۲) کشت پیازها در محیط‌کشت حاوی آنتی‌بیوتیک سولفات استرپتومایسین به میزان ۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر با تیمار ضدعفونی تیمار ۱، (۳) کشت پیازها در محیط‌کشت حاوی آنتی‌بیوتیک سولفات استرپتومایسین به میزان ۲۵۰ میلی‌گرم در لیتر با تیمار ضدعفونی تیمار ۱
نتایج تیمار با آنتی‌بیوتیک سولفات استرپتومایسین: (۱) تقریباً تمام نمونه‌های کشت شده آلوده گردیدند و (۲) تفاوتی بین تیمارهای سولفات استرپتومایسین با غلظت ۲۰۰ و ۲۵۰ میلی‌گرم در لیتر مشاهده نگردید.

آنتی‌بیوتیک کلرامفنیکل

(۱) کشت پیازها در محیط‌کشت آزمایش اولیه به عنوان تیمار شاهد: پیازها به مدت ۴۰ ثانیه در الکل متیلیک و بعد به مدت ۱۰ دقیقه در هیپوکلریت سدیم ۵ درصد ضدعفونی شدند و پس از آن، با آب مقطر استریل شده ۳ بار شستشو شدند و سپس در محیط‌کشت تهیه شده برای پیازها کشت گردیدند، (۲) کشت پیازها در محیط‌کشت حاوی آنتی‌بیوتیک کلرامفنیکل به میزان ۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر با تیمار ضدعفونی تیمار ۱، (۳) کشت پیازها در محیط‌کشت حاوی آنتی‌بیوتیک کلرامفنیکل به میزان ۲۵۰ میلی‌گرم در لیتر با تیمار ضدعفونی تیمار ۱.
نتایج تیمار با آنتی‌بیوتیک کلرامفنیکل: (۱) تقریباً تمام نمونه‌های کشت شده آلوده گردیدند و (۲) تفاوتی بین تیمارهای کلرامفنیکل با غلظت ۲۰۰ و ۲۵۰ میلی‌گرم در لیتر مشاهده نگردید.

کلرید جیوه

(۱) کشت پیازها در محیط‌کشت فاقد کلرید جیوه: پیازها به مدت ۳۰ دقیقه در آب گرم 45°C و بعد به مدت ۱ دقیقه در الکل متیلیک و بعد به مدت ۱۵ دقیقه در هیپوکلریت سدیم ۵ درصد ضدعفونی شدند و پس از آن، با آب مقطر استریل شده ۳ بار شستشو شدند و سپس در محیط‌کشت تهیه شده برای پیازها کشت گردیدند. این تیمار به عنوان تیمار شاهد در نظر گرفته شد.
(۲) کشت پیازها در محیط‌کشت دارای کلرید جیوه: پیازها به مدت ۳۰ دقیقه در آب گرم 45°C و بعد به مدت ۱ دقیقه در الکل متیلیک و بعد به مدت ۱۵ دقیقه در هیپوکلریت سدیم ۵ درصد و سپس به مدت ۱۰ دقیقه در کلرید جیوه ۰/۱ درصد ضدعفونی شدند و پس از آن، با آب مقطر استریل شده ۳ بار شستشو شدند و سپس در محیط‌کشت تهیه شده برای پیازها کشت گردیدند.

نتایج تیمار با کلرید جیوه: (۱) تقریباً ۵۰ درصد از نمونه‌های تیمار شده با کلرید جیوه با شرایط گفته شده در آزمایش بالا سالم و ۵۰ درصد دیگر آلوده گردیدند و (۲) احتمالاً علاوه بر تأثیر کلرید جیوه، زمان تیمار با الکل و هیپوکلریت سدیم نیز در کنترل نسبی آلودگی مؤثر بوده است.

کلرید جیوه و آنتی‌بیوتیک کلرامفنیکل

۱) کشت پیازها در محیط کشت آزمایش اولیه به عنوان تیمار شاهد: پیازها به مدت ۴۰ ثانیه در الکل متیلیک و بعد به مدت ۱۰ دقیقه در هیپوکلریت سدیم ۵ درصد و سپس به مدت ۱۰ دقیقه در کلرید جیوه ۰/۱ درصد ضدعفونی شدند و پس از آن، با آب مقطر استریل شده ۳ بار شستشو شدند و سپس در محیط کشت تهیه شده برای پیازها کشت گردیدند. ۲) کشت پیازها در محیط کشت حاوی آنتی بیوتیک کلرامفنیکل به میزان ۲۰۰ میلی گرم در لیتر با تیمار ضدعفونی تیمار ۱، و ۳) کشت پیازها در محیط کشت حاوی آنتی بیوتیک کلرامفنیکل به میزان ۲۵۰ میلی گرم در لیتر با تیمار ضدعفونی تیمار ۱. نتایج تیمار با کلرید جیوه و آنتی بیوتیک کلرامفنیکل: ۱) تقریباً تمام نمونه های کشت شده آلوده گردیدند، ۲) تفاوتی بین تیمارهای کلرامفنیکل با غلظت ۲۰۰ و ۲۵۰ میلیگرم در لیتر مشاهده نگردید و ۳) احتمالاً عدم اثر تیمار کلرید جیوه به خاطر مدت زمان کمتر تیمار با آن نسبت به تیمار قبلی بوده است.

بحث

۱) با توجه به بررسی های صورت گرفته و نحوه آلودگی ها در محیط کشت احتمالاً آلودگی موجود در نمونه های پیازی از نوع آلودگی داخلی می باشد. ۲) بر اساس مذاکرات حضوری با اساتید گروه بیماری شناسی گیاهی دانشگاه تربیت مدرس تهران، احتمالاً آلودگی از نوع یا انواع باکتری های ساپروفیت می باشد. ۳) آنتی بیوتیک های مورد استفاده در آزمایش ها در کنترل آلودگی اثر چندانی نداشتند. ۴) ماده کلرید جیوه در کنترل آلودگی دارای تأثیر نسبی بود. ۵) مدت زمان ضدعفونی نمونه های پیازی با مواد ضدعفونی کننده در کنترل نسبی آلودگی بسیار مهم است.

منابع

- ۱- اکریمی، ت. ۱۳۵۹. گیاهان پیازی زینتی. انتشارات دانشگاه تهران، تهران. ۲۹۸ ص.
- ۲- باقری، ع. ۱۳۷۶. مبانی کشت بافت گیاهی (ترجمه). انتشارات دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد. ۴۰۶ ص.
- ۳- باقری، ه و پ. آزادی. ۱۳۸۱. کشت بافت گیاهی- تکنیک ها و آزمایش ها (ترجمه). انتشارات جهاد دانشگاهی مشهد، مشهد. ۱۵۴ ص.
- ۴- پروند لبو. لاله ها و زنبق های ایران و گونه های مجاور (ترجمه). موسسه گیاه شناسی ایران. تهران.
- ۵- مهرآوران، ح. ۱۳۷۶. آسیب شناسی گیاهی- کلیات بیماری شناسی آسیب های زیست محیطی (ترجمه). انتشارات دانشگاه ارومیه. ۴۰۳ ص.
- 6- Chaudhuri, D and S. Sen, (2002). *In vitro* response of *Scilla siberica*. Scientia Horticulturae; 95: 51- 62.

Collection and Introduction of Ornamental Plant (*Scilla siberica*) and *In vitro* culture Evaluation

Abstract

With its varied climatic zones, Iran has a rich diversity of different plant species and natural herbs. The natural harbour a large number of plant species, but genetic erosion has been responsible for the rapid loss of these rich resources. The value of genetic germplasm is identified for breeding programs, biotechnology process and genetic engineering because of favorable gene pool. *Scilla siberica* is an ornamental plant from Liliaceae and has more than 80 European, Asian and African species and there is about ten species in Iran which there flowers colors varies from white to blue and violet. In this

research for propagation of *Scilla siberica* ornamental plant in *in vitro* culture condition and for callus induction and regeneration from leaf, shoot and bulb explants. For control of contamination, different sterilization treatments and two antibiotic types were used. In attention to, contamination type evaluation in the media, it found that the bulbs had internal contaminations. The used antibiotics in this experiment were not effect in contamination control, but the mercuric chloride ($HgCl_2$) had relative effect on contamination control.