مطالعه تاثیر ترکیبات هورمونی مختلف بر کالوس زایی از طریق کشت بساک در گیاه دارویی ریحان (*Ocimum basilicum* L.)

گلیا روشنی (۱)، محمد اسماعیل حسنی (۲) و روح انگیز نادری (۲)

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد گروه علوم باغبانی پردیس کشاورزی دانشگاه تهران، ۲- اعضای هیئت علمی گروه علوم باغبانی پردیس کشاورزی دانشگاه تهران

چکیده

در این تحقیق اثرات مقادیر مختلف هورمونی در فراوانی تولید کالوس از طریق کشت بساک در گیاه دارویی ریحان مورد بررسی قرار گرفت. ابتدا ارزیابی بساک ها و دانه های گرده جهت تشخیص بهترین مرحله در زیر میکروسکوپ و مرحله رشدی گلچه ها از نظر مرفولوژیکی تعیین شد. بساک ها در مرحله uninucleate از گیاه جمع آوری شده و سپس به آزمایشگاه منتقل شدند. گلچه ها ابتدا تحت یک دوره سرمادهی مرطوب در دمای ٤ درجه سانتیگراد در تاریکی و به مدت ٤٨ ساعت قرار گرفتند، سپس با اتانول و هیپوکلرید کلسیم استریل سطحی شده و در محیط کشت شدند. در ادامه، پتری دیش ها به اتاقک رشد با دمای ۲۵ درجه سانتیگراد و در تاریکی به مدت ۳ هفته قرار گرفتند. پس ار ٤ هفته پتری دیش ها به روشنایی انتقال داده شدند. سپس آزمایشی با ۳ تکرار به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی انجام گرفت که محیط کشت انتخابی N6، با مقادیر متفاوتی از هورمون های NAA و BA بود. محیط کشت بدون هورمون به عنوان شاهد در نظر گرفته شد که هیچ گونه کالوس زایی در این محیط صورت نگرفت. بیشترین میزان کالوس زایی در تیمار ۳ میلی گرم در لیتر NAA و ٦ میلی گرم در لیتر BA مشاهده شد و کمترین میزان کالوس زایی در تیمار ۱ میلی گرم در لیتر NAA و ۳ میلی گرم در لیتر BA به دست آمد.

مقدمه

ریحان گیاهی از خانواده نعناعیان است که از آن به عنوان گیاهی دارویی، ادویه ای و نیز به عنوان سبزی استفاده می شود. ریحان در اکثر فارماکوپه ها به عنوان یک گیاه دارویی معرفی شده است. مواد مؤثره پیکر رویشی این گیاه اشتها آور است و برای معالجه نفخ شکم و کمک به هضم غذا استفاده می شود. از این گیاه برای معالجه برخی ناراحتی های قلبی و همچنین برای مداوای بزرگ شدن طحال می توان استفاده کرد. اسانس ریحان، خاصیت ضد قارچی و باکتریائی دارد. از این اسانس در صنایع آرایشی و بهداشتی نیز استفاده می شود (امیدبیگی ۱۳۸۵). کشت بساک برای تولید گیاهان هاپلوئید مورد استفاده قرار می گیرد. هاپلوئید اصطلاحی است که به گیاهی گفته می شود که دارای یک مجموعه کرموزومی باشد (فارسی ۱۳۸٦). این امر ممکن است به صورت خود به خودی صورت بگیرد و یا توسط روش های خاصی و به صورت مصنوعی انجام بگیرد (Kurt 1998). هدف از مطالعه حاضر آزمایش اثر علظت های مختلف دو هورمون BA و NAA و اثر متقابل آنها بر کالوس زایی در ریحان بود.

مواد و روش‌ها

برای تعیین سطح مناسب رشدی، بساک ها بر روی لام و در استوکارمین له شدند و سطح رشدی مناسب دانه های گرده (uninucleate) در زیر میکروسکوپ تعیین شد. جوانه های گل سالم، دارای قدرت رشدی مناسب و در مرحله رشدی

مناسب از گیاهان بخشنده جمع آوری شده و توسط آب مقطر شستشو داده شدند. سپس گلچه ها در ظروف شیشه ای اتو کلاو شده که حاوی آب مقطر بودند به مدت ٤٨ ساعت در دمای ٤ درجه سانتیگراد و تاریکی پیش تیمار سرمایی بر روی آنها اعمال شد. قبل از کشت، سطح جوانه های گل با اتانول ۷۰٪ به مدت ۲ دقیقه و سپس در محلول هیپوکلرید کلسیم ۵٪ به مدت ۱۵ دقیقه استریل سطحی شدند و سپس درآب مقطر ستشو داده شدند. بساک های جدا شده در محیط کشت (Chu N6, (1978حاوی ۷ گرم در لیتر آگار و ۵۰ گرم درلیتر ساکارز در درون پتری دیش های استریل کشت شدند. pH محیط بر روی ۵/۸ تنظیم شد. از هورمون های NAA و BA به ترتیب با سطوح غلظت ۰,۰ به عنوان شاهد،۳,۱، ۳,۳، ۳,٦، ۶,۳ و ٦,٦ میلی گرم در لیتر استفاده شد. سپس پتری ها با پارا فیلم بسته شدند و به اتاق کشت با دمای ٢٤ درجه سانتیگراد و تاریکی منتقل شدند. پس از ۳ هفته پتری ها را به محیط با روشنایی منتقل نمودیم. ٤ هفته بعد از کشت کالوس ها به محیط کشت جدید حاوی هورمون های BA به مقدار ۱ میلی گرم در لیتر و NAA به مقدار ۲ میلی گرم در لیتر منتقل شدند. آزمایش با ۳ تکرار به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی انجام گرفت. تجزیه واریانس با نرم افزار SAS و برای مقایسه میانگین ها از آزمون مقایسه ای دانکن استفاده شد.

نتایج و بحث

محیط غذایی یکی از فاکتورهای کلیدی در القای کالوس است (Hoque 2007). اولین نشانه های تولید کالوس ۲ هفته پس از کشت بساک ها در محیط کشت مشاهده شد. رنگ کالوس ها از کرم روشن تا زرد کمرنگ متغیر بودند. در محیط کشت بدون هورمون که به عنوان شاهد در نظر گرفته شده بود هیچ گونه کالوس زایی مشاهده نشد. بیشترین میزان کالوس زایی در تیمارmg/l NAA ۳ وmg/l BA ٦ مشاهده شد که با تیمارmg/l NAA ۳ و mg/l BA ۳ تفاوت معنی داری را نشان نداد. کمترین میزان کالوس زایی در تیمار mg/l NAA ۱ وmg/l BA ۳ به دست آمد که با تیمارهای mg/l NAA ٦ وmg/l BA ٦ و نیزmg/l NAA ٦ وmg/l BA ۳ تفاوت معنی داری نشان نداند. در تیمارهای mg/l NAA ٦ و mg/l BA ٦ و تیمار mg/l NAA ٦ وmg/l BA ۳ به دلیل میزان بالای هورمون NAA مقداری ریشه زایی مشاهده شد. شرایط رشدی گیاه بخشنده می تواند در عدم نتیجه دهی تاثیر داشته باشد و نیز ممکن است در پاسخ کالوس زایی در کشت بساک مؤثر باشد. سایر فاکتورها مانند خود گونه، ژنوتیپ و محیط باززایی می توانند تاثیر گذار باشند (Ercan 2006). تفاوتی که در مقدار پاسخ به نرزایی در بساک های مختلف مشاهده می شود به این دلیل است که بساک ها در هنگامی که که جدا شده و کشت می شوند، در سطح مناسب رشدی نیستند. آزمایش های سیتولوژیکی بر روی نمونه بساک ها، جنبه یک راهنمایی عمومی برای اندازه بساک ها در کشت را به ما می دهد (Kurt 1998). کالوس زایی در این تکنیک درصد بالایی به ژنوتیپ گیاه و شرایط کشت بستگی دارد لذا تنوع در تعداد ژنوتیپ ها می تواند در موفقیت پروژه مفید باشد (Qin and Rotino 1993).

منابع

امید بیگی، ر.۱۳۸٦. تولید و فرآوری گیاهان دارویی. جلد اول، شرکت به نشر، انتشارات آستان قدس رضوی، مشهد

Ercan, N., Sensoy, F. A. and Sensoy, A. S. 2006. Influence of growing season and donor plant age on anther culture of some pepper cultivars (*Capsicum annum* L.). *Scientia Horticuiturae*. 110: 16-20.

Abstract:
In this study, the effects of various concentrations of hormones in basil (*Ocimum basilicum* L.) on the frequency of callus induction from anther culture were investigated. Firstly, anthers were analyzed to identify the uninucleate phase of microspores, then developmental phase of florets was determined from morphological point of view. Anthers of uninucleate phase collected and transfered to laboratory. At the beginning of the work, florets were placed in stratification of 4ºC in dark for 48 hours, following the surface sterilization and planted in medium. Cultured were incubated for 3 weeks at 25ºC with dark. After 4 weeks, calli were transfered on to new medium with light. Various amounts of NAA and BA hormones were added to N6 medium. Culture medium without hormones was selected as controls. No callus was produced in control media. The most respond to produce callus was observed in 6 mg/l BA and 3 mg/l NAA and the minimum respond was observed in 1 mg/l NAA and 3 mg/l BA. Experiment was carried out in factorial, based on complete randomize design with three replications.