تأثیر نوع محیط کشت و تیمار هورمونی بر جوانه‌زنی بذر گیاه دارویی بذرالبنج سیاه (*Hyoscyamus niger* L.)

روح اله نیک فکر[۱]، راضیه بیگلری فراش[۲]
[۱]هیئت علمی دانشگاه پیام نور واحد یاسوج
[۲]دانشجوی ارشد گیاهان دارویی، دانشگاه علوم کشاورزی ساری
نویسنده مسئول: razibiglari65@gmail.com

چکیده

بذرالبنج سیاه (*Hyoscyamus niger* L.) از جمله گیاهان حاوی آلکالوئید است که در دسته گیاهان دارویی قرار دارد. محیط کشت درون شیشه‌ای یکی از روش‌های حفظ و تولید این‌گونه محصولات می‌باشد. با توجه بااینکه بذر گیاه بنگ‌دانه (بذرالبنج) مشکل در جوانه‌زنی دارد و معمولاً در خاک دارای رشد بطئی و کند بوده و دچار بوته میری می‌شود لذا این تحقیق اثر محیط کشت‌های مختلف و تیمار GA_3 بر جوانه‌زنی بذرالبنج سیاه در شرایط *in vitro* بررسی شد و درصد جوانه‌زنی و سرعت جوانه‌زنی مورد ارزیابی قرار گرفتند. به این منظور تنظیم‌کننده‌ی رشد GA_3 با غلظت‌های صفر ویک میلی‌گرم بر لیتر در محیط کشت‌های MS و MS1/2 و B5 به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با چهار تکرار جهت رشد رویان و تولید گیاهچه بکار گرفته شد. نمونه‌ها در دمای 25 ± 2 C° به مدت سه هفته در شرایط نوری (۱۶ ساعت نور و ۸ ساعت تاریکی) قرار گرفتند. سپس رشد رویان‌ها به صورت کمی و کیفی بررسی شد. تجزیه و تحلیل نتایج توسط نرم‌افزارXLSTAT صورت گرفت. بر اساس نتایج به‌دست‌آمده محیط کشت B5 به طور معنی‌داری نسبت به محیط کشت MS, 1/ 2 MS برای جوانه‌زنی مناسب‌تر بودند ولی تفاوت معنی‌داری بین این دو محیط مشاهده نشد همچنین GA_3 برای درصد جوانه‌زنی و سرعت جوانه‌زنی تفاوت معنی‌داری را نشان نداد.

واژه‌های کلیدی: GA_3، جوانه‌زنی، بذرالبنج سیاه (*Hyoscyamus niger* L.)، محیط کشت

مقدمه

بذرالبنج سیاه (*Hyoscyamus niger L.*) یکی از مهمترین گیاهان خانواده بادمجانیان (*Solanaceae*) بـوده و قسمت های مختلف آن حاوی مواد موثره آلکالوییدی است که در صنایع داروسازی کاربرد فراوانی دارد. ازجمله معضل هایی که بذور گیاهان دارویی در اقلیم های گوناگون با آن مواجه هستند : کیفیت نامناسب، جوانه‌زنی و استقرار ناکافی می‌باشد. این کیفیت تحت تأثیر عوامل بسیاری از جمله رقم، خلوص ژنتیکی، خلوص فیزیکی، قوه نامیه، قدرت جوانه‌زنی، قابلیت زنده بودن و قوه نامیه بذر قرار می گیرد . علاوه بر جوانه‌زنی سرعت و یکنواختی جوانه زدن و بنیه بذر از پارامترهای مهم کیفیت بذرمی باشد (سلطانی و همکاران ،۱۳۷۵). جوانه‌زنی یکی از مراحل مهم و حساس در چرخه زندگی گیاه می اشد (خاوری و همکاران، ۱۳۸۸). جوانه‌زنی فرایندی است که در طی آن در شرایط مناسب محیطی رویان موجود در بذرهای دارای قوه نامیه فاقد خفتگی به یک گیاهچه تبدیل می‌شود (Kaye *et al*, 1997). این فرایند در ۳مرحله آبنوشی، فعالیت های متابولیکی و تندش گیاهچه از بذر انجام می گیرد (Harberd *et al*,2002). بذرالبنج از جمله گیاهانی است که بذر ان دارای جوانه‌زنی بطئی و کند در خاک بوده و به دلیل ریشه های ضعیف و زیست توده پایین در ابتدای کشت از بوته میری بالایی برخوردار است. در این ازمایش تلاش شده است تا با یافتن تیمارهای مناسب جوانه‌زنی و بهبود رشد بر این معضل غلبه نموده و را هکاری مناسب جهت کشت و پرورش این گیاه ارائه شود. جیبرلین یکی از هورمونهای گیاهی است که نقش مهمی در رشد و نمو گیاهان بازی می‌کند. حجتی و همکاران (۱۳۸۶) اثر GA3 بر روی بذر سیکاس بررسی کردند و نشان دادند که تیمار GA3 در غلظت ۲۰۰میلی گرم بر لیتر و به مدت ۴۸ ساعت بهترین نتیجه را داد. عمو آقایی (۲۰۰۹) در بررسی تیمار سرمادهی و GA3 بر بذر کما Ferula ovina نشان دادند که بهترین تیمار قراردادن بذر در دمای ۵±۱ درجه سانتی‌گراد در شرایط ۴یا ۶ هفته سرمادهی مرطوب

و سپس قرار دادن در محلول GA3 ۵۰۰PPM به مدت ۲۴ ساعت بود. کوچکی و عزیزی (۱۳۸۴) با مطالعه روی شکست خواب گلپوره *Teucrium polium* نشان دادند که از میان تیمار اسید جیبرلیک (ppm ۱۰۰–۲۵۰–۵۰۰–۱۰۰۰–۱۵۰۰)، بالاترین درصد سرعت جوانه‌زنی در تیمارهای ppm ۲۵۰و ۱۵۰۰ به مدت ۷۲ ساعت همراه با دمای ۵ درجه سانتی‌گراد بود. حسام عارفی و همکاران (۲۰۱۲) در مطالعه ای روی غلظت‌های مختلف اسیدجیبرلیک و نیترات پتاسیم در دوره های زمانی مختلف و اسید سولفوریک بر گیاه *Capparis spinosa* انجام دادند و نشان دادند ک غلظتppm ۲۰۰۰ اسیدجیبرلیک در همه دوره های زمانی بالاترین درصدجوانه زنی (۴۲٪) نسبت به دیگر تیمارها دارا بود. این مطالعه با هدف تعیین محیط کشت درون شیشه‌ای بهینه MS و 1/2MS و B5 برای جوانه‌زنی در گیاه بذرالبنج سیاه می‌باشد. فرضیه پژوهش براین می‌باشد که هورمون جیبرلین بر جوانه‌زنی بذر بذرالبنج سیاه در محیط کشت‌های مختلف تأثیر متفاوتی دارد.

مواد و روش‌ها

این پژوهش در آزمایشگاه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری و به صورت فاکتوریل و در قالب طرح کاملاً تصادفی (CRD) با چهار تکرار اجرا شد. استریل سازی بذرها در بنومیل یک در صد به مدت یک دقیقه و با محلول هیپوکلریت سدیم ۱/۵درصد (w/v) به مدت ۱۳ دقیقه و با اتانول ۷۰ درصد به مدت ۳۰ ثانیه انجام شد در نهایت سه بار در آب مقطر استریل شستشو داده شدند و بر روی محیط کشت MS(Murashige & Skoog 1962) که با 3٪ ساکاروز و 0.8% آگار و محیط کشت MS۱/۲(نصف عناصر ماکرو و میکرو) و محیط کشت B5 (Gamborg) با ۲٪ ساکارز 0.8% آگار با pH= 5.6-5.8 و با دو سطح هورمون $1mgl^{-1}$و ۰ GA3 تنظیم شده بود، جهت جوانه‌زنی کشت شدند و در دمای درجه 2 ± 25 سانتی‌گراد در داخل ژرمیناتور قرار داده شدند. درصد جوانه‌زنی و سرعت جوانه‌زنی با فرمول‌های زیر ارزیابی شدند.

GP تعداد کل بذور جوانه‌زده در هر پتری = (درصد جوانه‌زنی)

$$GR(\text{سرعت جوانه‌زنی}) = \frac{X1}{Y1} + \frac{(X2-X1)}{Y2} + \cdots + \frac{(Xn-(Xn-1))}{Yn}$$

Xn تعداد بذر جوانه‌زده تا روز n ام Yn تعداد روز از زمان کاشت تا زمان شمارش n ام تجزیه واریانس و مقایسه میانگین‌ها در سطح احتمال 1% با آزمون دانکن به‌وسیله نرم‌افزار آماریXLSTAT انجام گرفت.

نتایج و بحث

در این پژوهش میزان درصد و سرعت جوانه‌زنی گیاه بذرالبنج سیاه مورد آنالیز قرار گرفت. نتایج تجزیه واریانس نشان داد که اثر محیط کشت‌های مختلف برای صفات درصد جوانه‌زنی و سرعت جوانه‌زنی در سطح احتمال P≤0.01 معنی‌دار می‌باشد (جدول ۱).

جدول ۱– تجزیه واریانس اثر متقابل محیط کشت‌های مختلف و تیمار هورمون جیبرلین برای صفات درصد جوانه‌زنی و سرعت جوانه‌زنی در گیاه بذرالبنج سیاه

		میانگین مربعات	
منابع تغییرات	درجه آزادی	درصد جوانه‌زنی	سرعت جوانه‌زنی
محیط کشت	۲	۱۵۴/۰۰۰**	۰/۶۰۳**
جیبرلین	۱	۶۷/۶۶۷	۰/۰۰۷
محیط کشت×جیبرلین	۲	۱۸/۶۶۷	۰/۲۲۳
اشتباه	۱۸	۱۲۳/۳۳۳	۱/۴۰۶

**: معنی‌دار در سطح ۰/۰۱ درصد.

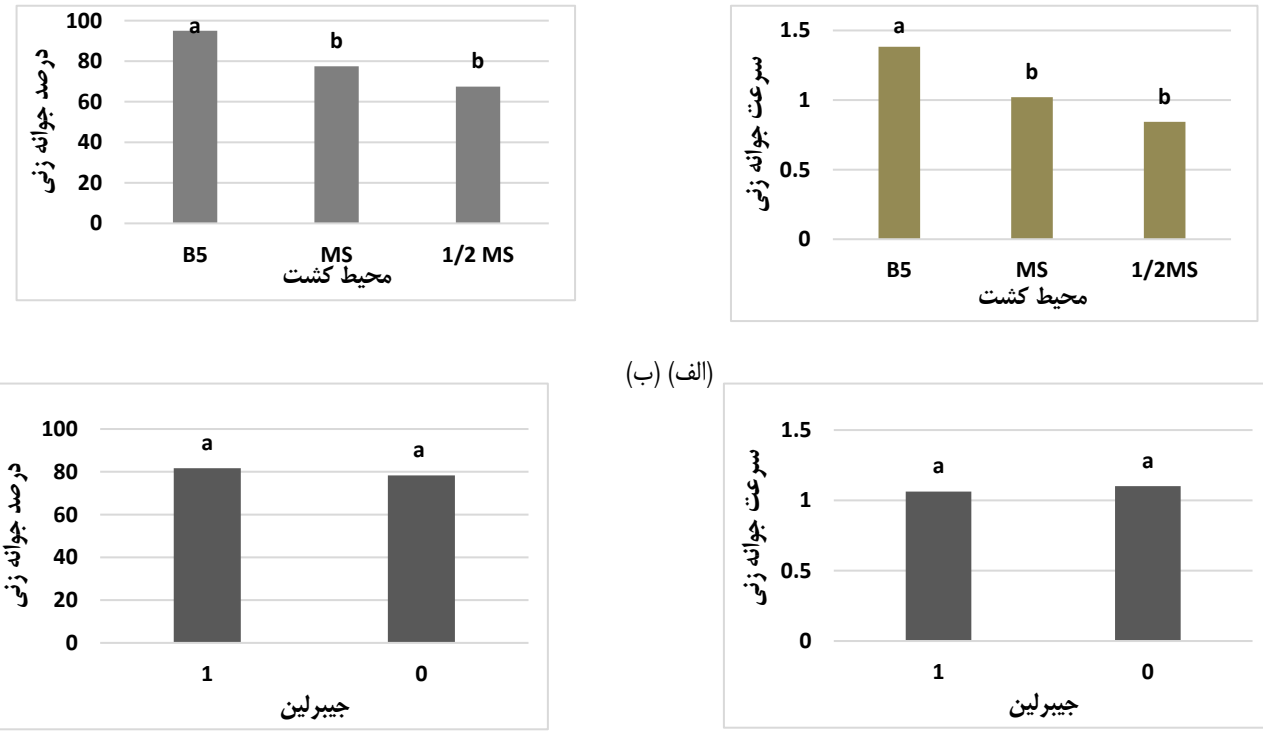
میانگین برهم‌کنش اثر غلظت هورمون جیبرلین و محیط کشت‌های مختلف در صفات موردمطالعه نشان می‌دهد (جدول ۲) که بیشترین مقدار (۱/۵۲۳) سرعت جوانه‌زنی بذور بذرالبنج سیاه کشت شده در محیط کشت B5 بدون تیمار جیبرلین و کمترین (۰/۸۲۸) سرعت جوانه‌زنی بذور در محیط کشت 1/2 MS با یک میلی‌گرم بر لیتر تیمار جیبرلین به دست آمد و همچنین برای صفت درصد جوانه‌زنی محیط کشت B5 بیشترین درصد جوانه‌زنی و 1/2MS کمترین درصد جوانه‌زنی را نسبت به سایر محیط کشت‌ها از خود نشان دادند.

جدول ۲- میانگین برهم‌کنش اثر غلظت مختلف هورمون جیبرلین و محیط کشت‌های مختلف در صفات موردمطالعه

تیمار جیبرلین	محیط کشت	میانگین مربعات	
		درصد جوانه‌زنی	سرعت جوانه‌زنی
۱	B5	۹۵^{a}	۱/۲۴۳ ^{ab}
	MS	۸۰^{ab}	۱/۱۲۰ ^{ab}
	1/2 MS	۷۰^{b}	۰/۸۲۸ ^{b}
۰	B5	۹۵^{a}	۱/۵۲۳ ^{a}
	MS	۷۵^{b}	۰/۹۲۳ ^{b}
	1/2 MS	۶۵^{b}	۰/۸۵۸ ^{b}

حروف مشابه نشان‌دهنده‌ی عدم وجود اختلاف معنی‌دار (در سطح احتمال ۰/۰۵) بین میانگین‌ها می‌باشد (آزمون دانکن).

و در ضمن نتایج اثرات ساده نشان داد که میزان درصد جوانه‌زنی و سرعت جوانه‌زنی بذور بذرالبنج سیاه در تیمار جیبرلین و در گیاه شاهد تفاوت معنی‌داری نداشت (شکل ۱) ولی سرعت جوانه‌زنی در محیط کشت B5 نسبت به سایر محیط کشت‌ها تفاوت معنی‌داری را نشان داد (شکل ۱- الف).



(الف) (ب)

(پ) (ت)

شکل ۱- نمودارهای مختلف از سرعت و در صد جوانه‌زنی در محیط کشت مختلف (الف) و (ب) و تأثیر متفاوت هورمون ژیبرلین بر سرعت و درصد جوانه‌زنی بذرالبنج سیاه (*Hyoscyamus niger L.*) (پ) و (ت).

در بررسی نمودارهای حاصل از آنالیزهای نرم‌افزار آماری XLSTAT در مقایسه با تأثیر انواع محیط کشت در سرعت و درصد جوانه‌زنی بذور بذرالبنج سیاه به ترتیب محیط کشت B5 و MS 1/2، بیشترین و کمترین اثر را از خود نشان دادند (نمودار الف و ب). همچنین نمودارهای مربوط به جیبرلین نشان می‌دهد که این هورمون تأثیری در سرعت و درصد جوانه‌زنی در این گیاه نداشته است (شکل ۱ نمودار پ و ت).

بر اساس نتایج به‌دست‌آمده محیط کشت B5 به طور معنی‌داری نسبت به محیط کشت MS ۱/ MS ۲ و MS برای جوانه‌زنی مناسب‌تر بودند. محیط کشت B5 از نظر ترکیبات با محیط کشت MS در مقادیر مواد مورداستفاده تفاوت دارد و فاقد گلایسین است ولی دارای تیامین بیشتری نسبت به محیط کشت MS است. ویتامین‌ها در مقادیر کم نیز برای رشد و نمو عادی بافت‌ها در گیاه ضرورت دارند. وجود این دسته از مواد برای رشد گیاه در محیط‌های کشت بافت ثابت شده است و عموماً به‌عنوان کوآنزیم و یا آنزیم عمل می‌کنند (Antonopoul *et al*, 2005). در مورد بررسی اثر غلظت‌های مختلف محیط کشت MS و تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی بر جوانه‌زنی و کالوس زایی *(Calendula officinalis)* در شرایط درون شیشه‌ای مطابقت دارد. کیم در سال ۱۹۹۴ گزارش کرد که افزایش غلظت املاح در محیط کشت، باعث می‌شود که مقدار انرژی بذر که باید صرف جذب آب و مواد غذایی شود افزایش داده و این عمل باعث افزایش تنفس و کاهش عملکرد بذر می‌گردد. یکی دیگر از دلایل کاهش جوانه‌زنی بذر می‌تواند فشار اسمزی باشد به این معنی که بعضی از املاح به دلیل ایجاد فشار اسمزی بالاتر بیش از املاح دیگر قادر به ممانعت از جوانه‌زنی بذور می‌گردند، بااین‌وجود بسته به نوع املاح، جوانه‌زنی بذر نیز همراه با آن کاهش می‌یابد (آنگر،۱۹۷۸). نتایج این تحقیق مطالب ارزشمندی را ارائه می‌دهد که می‌تواند در پژوهش‌های آینده باتوجه‌به اهمیت بالای بذرالبنج سیاه به‌عنوان گیاه دارویی و تولید محدود این گیاه در مدت‌زمان طولانی از طریق روش‌های سنتی مورداستفاده و بهره‌برداری قرار گیرد.

منابع

حجتی ی. نادری ر. فرامرزی ع. و قلی‌پور ج. (۱۳۸۶). بررسی اثر تیمارهای سولفوریک اسید، جیبرلیک اسید و دما بر جوانه‌زنی بذر سیکاس (*Cycas revolute L.*). مجله دانش نوین کشاورزی. ۳ (۹): ۲۲-۱۳.

سلطانی، ا.،کامکار، ب.، گالشی، س .و اکرم قادری، ف.، (۱۳۷۵) .اثر فرسودگی بذر بر ذخایر ژنتیکی بذور و رشد هتروتروفیک گیاهچه گندم . مجله علوم کشاورزی و منابع طبیعی . جلد پانزدهم شماره اول.

عموآقایی، ر.(۱۳۸۴). تأثیر خیساندن بذور، مدت زمان و دمای پیش سرمادهی بر شکست خواب بذر کما (*Ferula ovina* Boiss.). مجله زیست شناسی ایران. ۱۸ (۴): ۳۵۹-۳۵۰.

کوچکی ع. و عزیزی ک. (۱۳۸۴). اثر تیمارهای مختلف شکستن خواب بر جوانه‌زنی بذر گلپوره (*Teucrium polium*).نشریه پژوهش های زراعی ایران. ۳ (۱): ۸۸-۸۱.

Antonopoulo, C., K. Dimassi, I. Therios, CH. Chatzissavvidis and V. Tsirakoglou. 2005. Inhibitory effects of riboflavin (vitamin B2) on the in vitro rooting and nutrient concentration of explants ofpeach rootstock GF 667 (*Prunus amygdalus* × *P. Persica*). *Scientia Horticulturae* 106: 268-272.

Harberd N.P. and Peng J.(2002). The role of GA-mediated signaling in the control of germination. Weed Science. 5 (5): 376-381.

Jain R, Katare1 N, Kumar V, Kumar A. *In Vitro* Anti Bacterial Potential of Different Extracts of *Tagetes erecta* and *Tagetes patula*. *Journal of Natural Sci*. (2012); 2 (5): 84 - 90.

Kaye T.N., Liston A., Love R.N., Luoma D.L., Meinke R.J. and Wilson M.V.) (1997). Seed dormancy in high elevation plants: Implication for ecology and restoration. Corvallis Oregon. Page: 115-120.

Kim, K., Y, Yoo. and G, Lee. 1994. Comparative salt tolerance study in Korean lawn grasses, comparison with western turf grasses *in vitro* salt tolerance test. Journal of the Korean Society for Horticultural Science, 32(1): 117-133.

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

predicting seedling emergence of safflower (*Carthamus tinctorius* L.) cultivars. J. Seed. Technol. 31: 189 – 193.

Evaluation of the effect of different culture media and gibberellic acid treatment on seed germination of *Hyoscyamus niger* L.

Ruhollah Nikfekr [1], Razieh Bigleri Farash [2 *]
Faculty of Payame Noor University, Yasouj Branch
Master student of medicinal plants, Sari University of Agricultural Sciences *Corresponding Author*: *razibiglari65@gmail.com*

Abstract

Black henbane *(Hyoscyamus niger L.)* is one of the plants containing alkaloids that are in the category of medicinal plants. In vitro culture medium is one of the methods of preserving and producing such products. Because the seeds of the apricot plant have difficulty germination and usually have slow growth in the soil and the plant dies, this study investigated the effect of different culture media and GA3 treatment on germination of black seed in vitro. Germination percentage and germination rate were evaluated. For this purpose, GA3 growth regulator with concentrations of zero and one milligram per liter in MS and MS 1/2 and B5 media was used as a factorial in a completely randomized design with four replications for embryo growth and seedling production. For three weeks, the samples were exposed to light (16 hours of light and 8 hours of darkness). Then the growth of embryos was evaluated quantitatively and qualitatively. The results were analyzed by XLSTAT software. Based on the results, the B5 culture medium was significantly more suitable for germination than 2 MS 1 / MS medium, but no significant difference was observed between the two media. Also, GA3 was significantly different for germination percentage, and germination rate Did not show.

Keywords: GA3, Germination, Black henban *(Hyoscyamus niger L.),* Culture medium