فصلنامه علمي - پژوهشي گياه و زيست بوم
سال 7، مرتبه زانويه شماره 2- 29،

تأثیر تنظیم‌کننده‌های رشد، محیط کشت و ذغال فعال بر ریزازدیادی سرخدار (*Taxus baccata* L.)

بهارک بهجت ساسان[1]*، منصور امیدی[2]، محمدرضا نقوی[2]، سپیده کلاته جاری[1]، علیرضا اطمینان[13]

چکیده

سرخدار با نام علمی *T. baccata* از معدود درختان سوزنی برگ ایران است. اندام‌های این گیاه حاوی ماده شیمیایی فوق‌العاده ارزشمند به نام تاکسول می‌باشد. هدف از این تحقیق بررسی اثر تیمارهای مختلف شامل محیط کشت، تنظیم‌کننده رشد و ذغال فعال بر ریزازدیادی سرخدار بود که نتایج این آزمایش می‌تواند به صورت یک پروتکل جهت تکثیر و انبوه گیاه سرخدار و در نهایت احیای جنگل‌های سرخدار از کشت بافت درآید. این آزمایش به روش فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی انجام شد. دو فاکتور محیط کشت (MS پایه، MS (½ nitrate) و ترکیب هورمونی شامل سیتوکینین‌ها Kin، BAP در سه سطح و Zeatin در یک سطح و اکسین IBA در سه سطح در ریز نمونه سر شاخه مورد استفاده قرار گرفت. این تیمارها یا با ذغال فعال یا بدون ذغال فعال در دو صفت تعداد رویش جدید برگ و طول گیاهچه بکار برده شدند. در ریشه زایی از محیط‌های کشت WPM، WPM ½، MS، MS ½ یا در ترکیب با IBA، NAA در سه سطح و یا بدون تنظیم کننده رشد استفاده شد. بهترین تعداد برگ در محیط کشت MS پایه در ترکیب هورمونی 3 Kin میلی‌گرم در لیتر بدست آمد و ماکزیمم اندازه طول شاخساره در محیط کشت MS پایه با تنظیم‌کننده رشد 3 Kin میلی‌گرم در لیتر و همچنین با 3 BAP میلی‌گرم در لیتر (2/67 cm) همراه با ذغال فعال مشاهده شد. ریشه زایی در محیط WPM پس از دو ماه بدست آمد. تشکیل ساقه و افزایش طول ساقه نیاز به تیمار اکسین و سیتوکینین دارد که البته تأکید بر این است که اکسین با غلظت پائین استفاده گردد.

کلمه‌های کلیدی: سرخدار، ریزازدیادی، محیط MS، تنظیم‌کننده‌های رشد

1- دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم تحقیقات تهران، گروه باغبانی، تهران، ایران
2- دانشگاه تهران، گروه زراعت، تهران، ایران
3-دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرمانشاه، گروه زراعت، کرمانشاه، ایران

Archive of SID
www.SID.ir

* مسئول مکاتبه. (bahar_sasan60@yahoo.com)

تاریخ دریافت: تابستان 1389 تاریخ پذیرش: پاییز 1389

مقدمه

سرخدار با نام علمی *Taxus baccata* از سوزنی برگان بومی ایران بوده است که تقریباً در تمام نواحی جنگلی شمال ایران بین ارتفاعات 900 تا 1800 متری از سطح دریا رویش دارد. اندام‌های این گیاه حاوی ماده شیمیایی فوق‌العاده ارزشمند به نام تاکسول است، که کاربرد وسیع آن در پزشکی و معالجه سرطان اثبات شده است (نیک وش و همکاران، 1385). این دارو در سال 1971 کشف و در سال 1989 از طرف کمپانی بریستول مریسکوئیب به نام تجاری تاکسول معرفی گردید (Parc *et al.*, 2002). خیلی از مطالعات بر روی کشت درون شیشه‌ای سرخدار و تولید تاکسوئید از دهه 1960 از پوست *T. brevifolia* تا به امروز انجام گرفته است (Sabater-Jara *et al.*, 2010). در سال‌های اخیر پژوهشی در مورد وضعیت کمی و کیفی توده در طبیعت سرخدار در استان گلستان انجام گرفته است (نیک وش و همکاران، 1385). تکثیر رویشی این گیاه همانند سایر سوزنی برگان به دشواری صورت می‌گیرد. ریزازدیادی روشی است که به منظور تکثیر گیاهان به طور همزمان و در زمان کوتاه استفاده می‌شود ولیکن نتایج متشر شده درباره گیاهان چوبی بالغ محدود می‌باشد (طباطبایی و امیدی، 1388). ریزازدیادی سوزنی برگان برای اولین بار توسط سامر[1] و همکاران در سال 1975 با کشت جنین‌های کاج (*Pinus palustris*) انجام شد (Chee, 1995).

جنین گیاهان جوان تقریب در لوله‌های سرخدار گزارش شده است (Wann & Glodner, 1994). البته کشت رویان و درصد گیاهان تولیدشده رضایت بخش نمی‌باشد (Chee, 1996). برای برخی از گونه‌ها استفاده از کشت رویان چندان مؤفق‌تر از تحریک ریشه‌زایی قلمه‌ها نبوده است (David, 1987). در کشت بافت سرخدار از قسمت‌های جوان مانند گامتوفیت ماده، رویان، جنین اولیه و قسمت‌های بالغ گیاه مثل برگ‌ها، ساقه جوان و ریشه استفاده شد. محیط‌های کشت درون شیشه‌ای پیشنهاد شده شامل MS[2]، B_5[3]، WPM[4] بوده است (Bonga & Von aderkas, 1992). تاکنون برای ازدیاد گونه‌های سرخدار روشی روشن و مشخص برای تولید انبوه از طریق تکنیک‌های کشت بافت گزارش نشده است (Chang *et al.*, 1998). هدف مطالعه حاضر بررسی تأثیر تنظیم‌کننده‌های رشد، محیط کشت، ریز نمونه و ذغال فعال بر ریزازدیادی گیاه سرخدار برای دستیابی به روش ساده و قابل اجرا در سطح وسیع و تولید انبوه برای اهداف دارویی

[1] - Sommer

2- Murashige and Skoog, 1962
3- Gamborg *et al.*, 1968
4- Lloyd and McCown

Archive of SID
www.SID.ir

و درمانی این گیاه بوده بدون اینکه نیازی به برداشت از عرضه‌های حفاظت شده طبیعی باشد.

مواد و روش‌ها

تهیه ماده گیاهی

ریزنمونه مورد نیاز (سرشاخه) برای این تحقیق از گیاه سرخدار واقع در پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران تهیه گردید.

در مطالعه‌ای به منظور ضد عفونی کردن ریز نمونه‌ها در محلول اتانول 70٪ سپس به ترتیب در 3٪ و 1٪ هیپوکلریت سدیم به مدت 25 دقیقه استریل شدند (خسرو شاهی و همکاران، 1385).

ریزنمونه‌ها به مدت 30 دقیقه در زیر آب جاری قرار گرفت. پس از آن 7 دقیقه با قارچ کش بنومیل 1٪ ضد عفونی و به منظور شستشوی مجدد، 30 دقیقه زیر آب جاری قرار داده شدند. ضد عفونی نهایی در زیر هود لامینار توسط اتانول 70٪ به مدت 30 ثانیه و کلرید جیوه 0/1٪ به مدت 7 دقیقه انجام شد. لازم به ذکر است که پس از اتمام هر مرحله در زیر هود لامینار، عمل شستشو با آب مقطر استریل، طی سه مرحله انجام گرفت.

طویل شدن سرشاخه و رویش برگ

محیط‌های کشتی که در این آزمایش مورد بررسی قرار گرفت شامل MS پایه (موراشیگ و اسگوک) و MS با نصف غلظت معمول نیترات‌ها (KNO_3 - 950، NH_4NO_3 - 825) می‌باشد. محیط‌های کشت به اضافه 25 گرم ساکارز و 7 گرم در لیتر آگار استفاده شد.

قطعات جداکشت به طول حدود 10 میلی‌متر از قسمت‌های سرشاخه گیاه، تحت تیمارهای BAP (6- بنزیل آمینو پورین)، Kin (کینتین) در غلظت‌های 2 تا 5 میلی‌گرم در لیتر و Zeatin (زآتین) (2 میلی‌گرم در لیتر) و IBA (اسید 3- ایندول بوتریک استیک) در غلظت‌های 0 تا 1 میلی‌گرم در لیتر، قرار داده شدند.

به منظور بررسی اثر ذغال فعال بر روی رشد گیاهچه‌ها، از ذغال فعال نیز به عنوان یک تیمار مورد استفاده قرار گرفت. بدین صورت که، تمام محیط‌های مورد استفاده با تنظیم‌کننده‌های رشدی متفاوت در دو حالت، بدون ذغال فعال و با ذغال فعال، به میزان 2 گرم در لیتر بررسی شدند.

ارزیابی آن‌ها بر مبنای مقدار رشد طولی گیاهچه و تعداد رویش برگ انجام گرفت. در تکرارهای انجام شده(3 تکرار)، برای هر تکرار یک نوک ساقه مورد استفاده قرار گرفت. تمام کشت‌ها در اتاق رشد تحت شرایط دمایی 2±23 درجه سانتی‌گراد و شرایط نوری 16 ساعت روشنایی و 8 ساعت تاریکی نگهداری شدند.

القای ریشه

پس از رشد، سرشاخه‌ها به محیط‌های کشت MS، 1/2 MS، WPM و 1/2 WPM فاقد تنظیم‌کننده رشد، انتقال داده شدند. بررسی دیگری که بر روی ریشه زایی صورت گرفت بدین صورت که سرشاخه‌ها در محیط‌های MS، 1/2 MS، WPM و 1/2 WPM با تنظیم‌کننده‌های رشدی IBA (اسید 3- ایندول بوتریک استیک) و NAA (اسید آلفا نفتالین استیک) به میزان 1 تا 3 میلی‌گرم در لیتر کشت شدند. محیط‌های کشت به اضافه 25 گرم ساکارز و 7 گرم در لیتر آگار استفاده شد.

Archive of SID
www.SID.ir

آنالیز داده‌ها و محاسبات آماری

داده‌های به دست آمده در آزمایش فاکتوریل و با طرح پایه کامل تصادفی مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. رسم نمودار در Excel، مقایسه میانگین‌ها با آزمون چند دامنه‌ای دانکن و آنالیز داده‌ها با استفاده از نرم افزار MSTAT صورت پذیرفت.

نتایج

داده‌هایی که از کشت نوک ساقه‌ها در محیط‌هایی که فاقد ذغال فعال بودند، پس از یک ماه بدست آمد قابل آنالیز نبودند. بدین معنی که نوک ساقه‌های کشت داده شده در محیط فاقد ذغال فعال رشد چشمگیری نداشتند (شکل 1- الف).

نتایج حاصل از تجزیه واریانس داده‌های مربوط به نوک ساقه‌ها در دو نوع محیط کشت دارای ذغال فعال همراه با ترکیبات تنظیم‌کننده رشد مربوط به صفت تعداد برگ (جدول 1) نشان داد که اثر هر یک از فاکتورهای محیط کشت و تنظیم‌کننده رشد به تنهایی معنی‌دارنیست و اثر متقابل آن‌ها در سطح 1٪ معنی‌دار است.

جدول 1- تجزیه واریانس اثر عامل‌های ترکیب هورمونی و محیط کشت بر تعداد برگ و طول گیاهچه یک ماه پس از کشت.

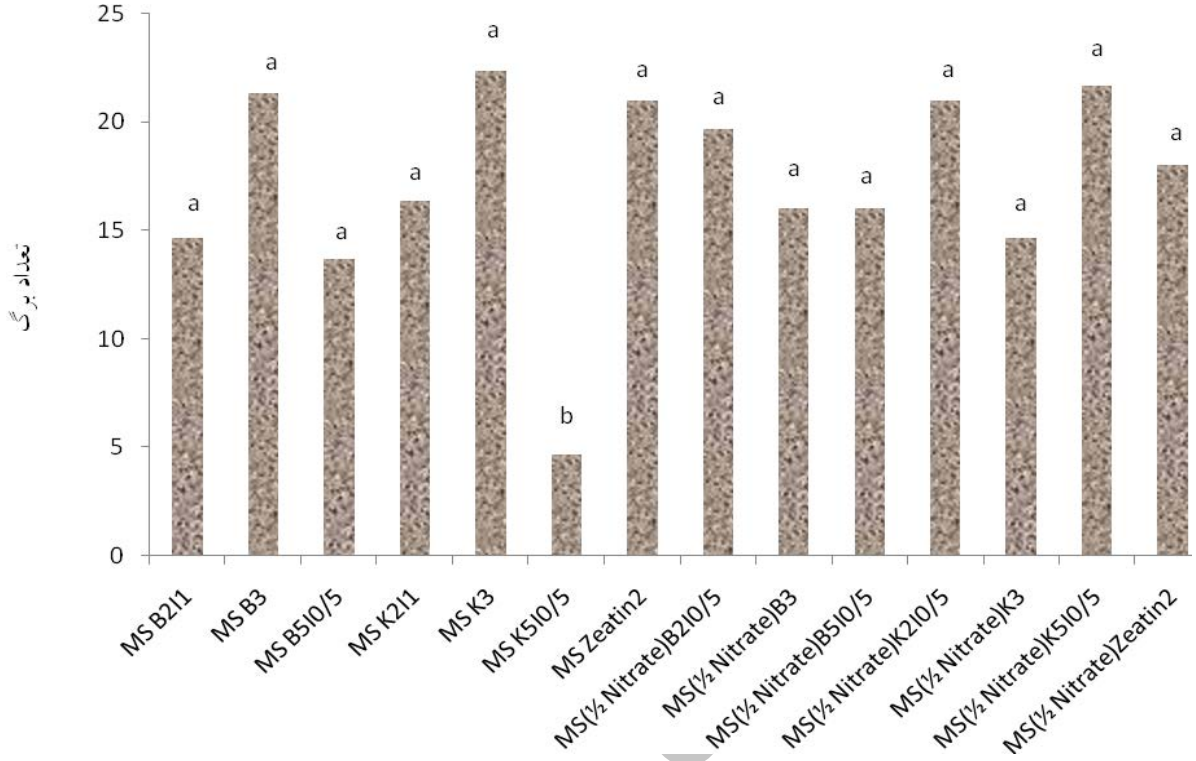
منابع تغییر	درجه آزادی	میانگین مربعات	
		تعداد برگ	طول گیاهچه
محیط کشت	1	36/214$^{n.s}$	0/244$^{n.s}$
ترکیب هورمونی	6	33/151$^{n.s}$	1/219**
محیط کشت * ترکیب هورمونی	6	103/325**	0/935**
خطای آزمایش	28	24/857	0/256
ضریب تغییرات (درصد)		28/96	28/26

** اختلاف معنی دار در سطح 1٪

نتایج حاصل از تجزیه واریانس داده‌های مربوط به سر شاخه‌ها در دو نوع محیط کشت دارای ذغال فعال همراه با ترکیبات تنظیم‌کننده‌ی رشد مربوط به صفت تعداد برگ (جدول 1) نشان داد که اثر هر یک از فاکتورهای محیط کشت و تنظیم‌کننده رشد به تنهایی معنی‌دار نبوده در صورتی که اثر متقابل آن‌ها در سطح 1٪ معنی‌دار بوده است. البته با توجه به نمودار 1 در محیط کشت MS پایه و ترکیب تنظیم‌کننده‌ی رشد Kin (کینتین)در غلظت 5 میلی‌گرم در لیتر IBA (اسید 3- ایندول بوتریک استیک)در غلظت 0.5 میلی‌گرم در لیتر، کم‌ترین تعداد برگ (5 عدد) داشت و بیش‌ترین تعداد برگ (22 عدد) مربوط به محیط کشت پایه MS با ترکیب تنظیم‌کننده‌ی رشد Kin (کینتین) در غلظت 3

Archive of SID
www.SID.ir

میلی‌گرم در لیتر بود البته با توجه به نمودار 1 تیمارهای دیگر هم در این گروه قرار می‌گیرد.



نمودار 1 - بر همکنش ا ثرات تیمارهای هورمونی و محیط کشت بر تعداد برگ پس از 4 هفته کشت.

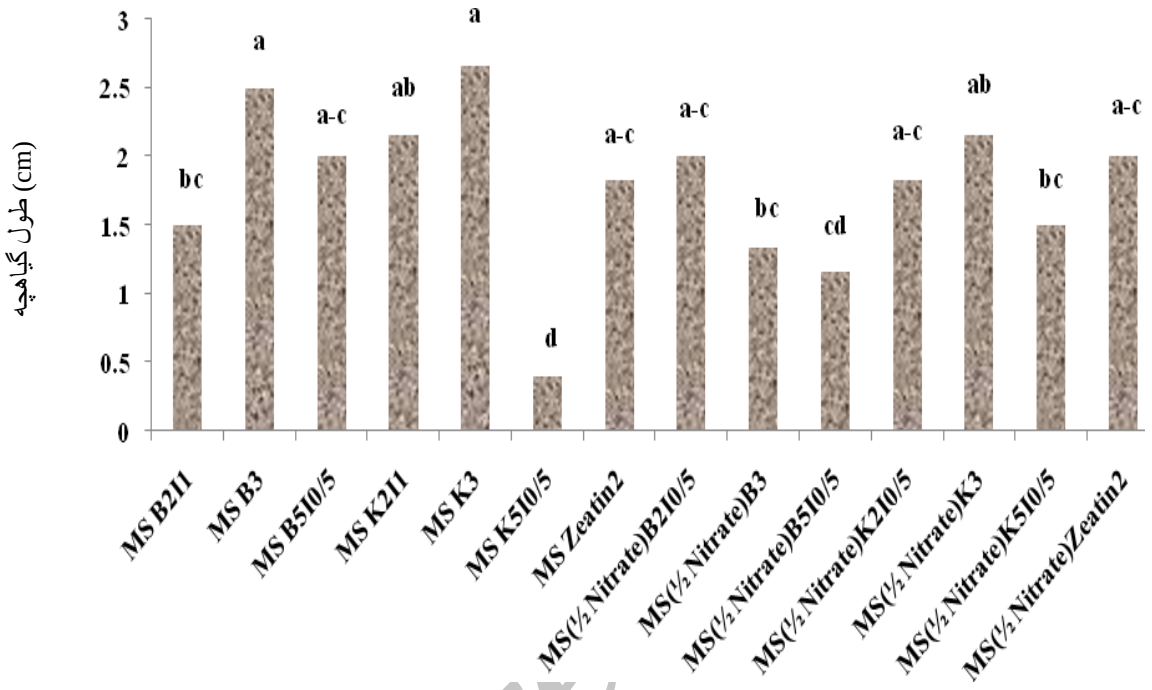
در رابطه با صفت طول گیاهچه، با توجه به (جدول 1) اثر فاکتور محیط کشت غیر معنی‌دار بود و اثر تنظیم‌کننده‌ی رشد در سطح 1٪ معنی‌دار و اثر متقابل دو فاکتور محیط و تنظیم‌کننده‌ی رشد در سطح 1٪ معنی‌دار بود و این بیانگر این بود که محیط کشت به تنهایی تأثیری بر روی طول گیاهچه نداشت ولی تأثیر متفاوت تنظیم‌کننده‌ی رشد را شاهد بودیم. در بررسی اثر محیط کشت و تنظیم‌کننده‌های رشد بر صفت طول گیاهچه با توجه به مقایسه میانگین‌ها (نمودار 2) بهترین ترکیب تیمار طول گیاهچه در محیط کشت پایه MS در ترکیب تنظیم‌کننده‌ی رشد Kin (کینتین) در غلظت 3 میلی‌گرم در لیتر (2/67cm) و در محیط کشت MS پایه در ترکیب تنظیم‌کننده‌ی رشد BAP (6- بنزیل آمینو پورین) (3 میلی‌گرم در لیتر) مشاهده شد.

در مقایسه‌ی بین دو محیط حاوی ذغال فعال و فاقد ذغال فعال با نوع محیط کشت و ترکیب تنظیم‌کننده‌ی رشد برابر بیانگر این بود که ذغال فعال تاثیر بسیار مشخص و فاحشی در رشد نوک ساقه‌ها در عرض یک ماه داشت (شکل 1- ب).

ریشه زایی در محیط کشت WPM فاقد تنظیم‌کننده‌ی رشد حاصل شد. بدین صورت که گیاهچه با ارتفاع حدود 20 میلی‌متر به این محیط منتقل شد و پس از دو ماه نوک ریشه دهی شروع

Archive of SID
www.SID.ir

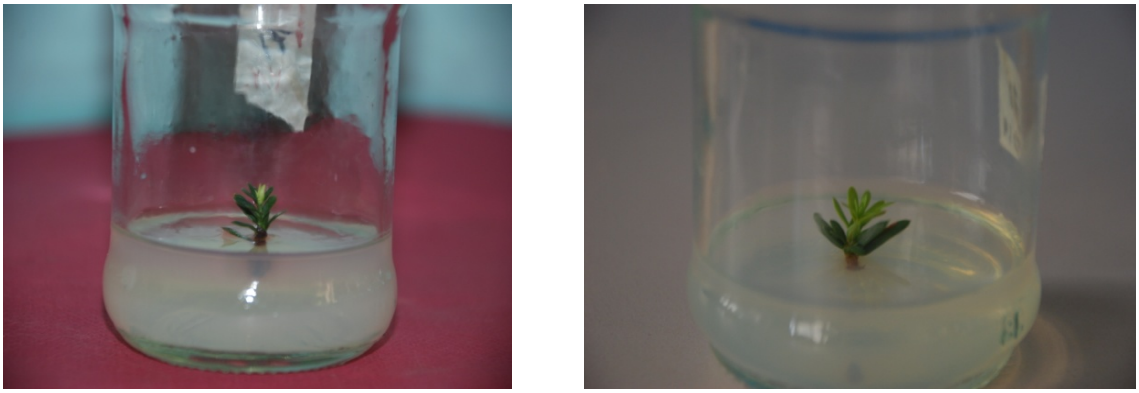
گردید (شکل 1). لازم به ذکر است که هیچ یک از تیمارهای هورمونی در ریشه‌دهی مشاهده نگردید.



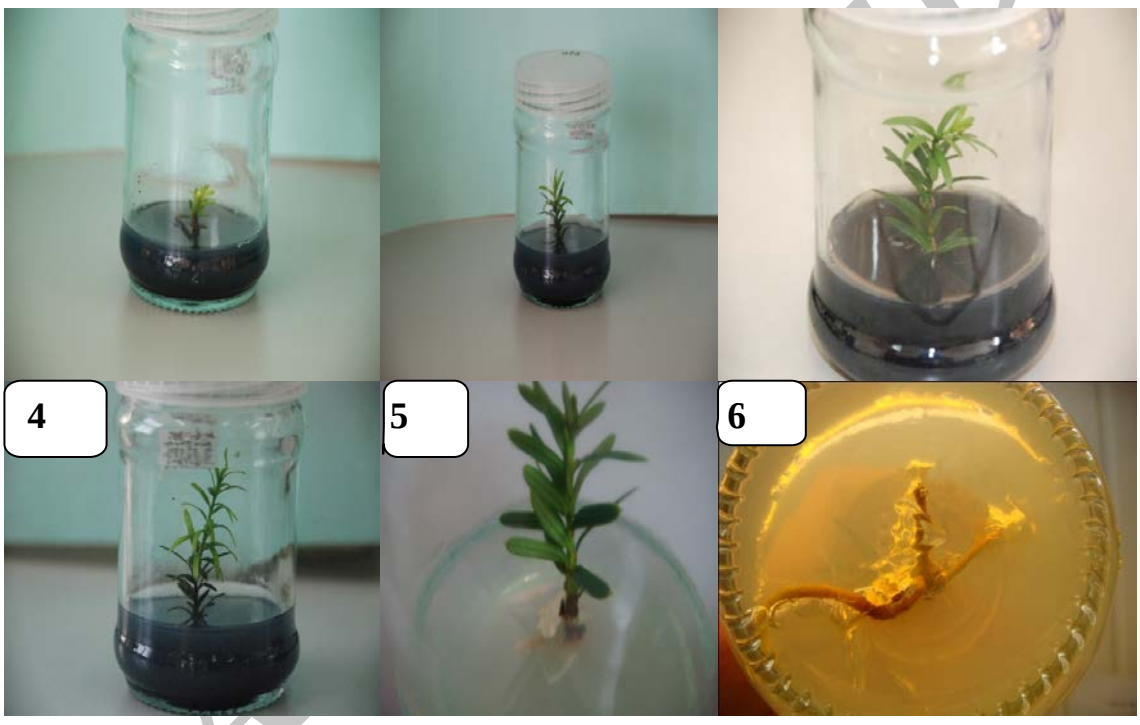
نمودار 2- مقایسه میانگین‌های اثرات محیط کشت و ترکیبات هورمونی بر طول گیاهچه پس از 4 هفته کشت

Archive

www.SID.ir



الف



ب

شکل1- اثر تیمارهای مختلف بر روی طول گیاهچه در محیط فاقد ذغال فعال و دارای ذغال فعال و ریشه زایی. الف. رشد گیاهچه در 31 روز در محیط کشت فاقد ذغال فعال ب) رشد گیاهچه در محیط کشت MS با Kin 3 میلی گرم در لیتر (1) گیاهچه پس از 12 روز، (2 و 3) گیاهچه پس از 22روز، (4) گیاهچه پس از 31 روز (2/67 cm) . (5) ریشه زایی پس از دو ماه کشت در محیط کشت WPM. (6) رشد ریشه پس از 4 ماه کشت.

www.SID.ir

بحث و نتیجه‌گیری

در مطالعه حاضر BAP (6- بنزیل آمینو پورین) و Kin (کینتین) و زآتین به تنهایی یا ترکیبی از این سه سیتوکینین و غلظت‌های کم اکسین برای رشد نوک ساقه‌ها ضروری بود. تشکیل ساقه نا به جا نیاز به تیمار اکسین و سیتوکینین دارد که البته تأکید بر این است که اکسین با غلظت پایین استفاده گردد زیرا کاربرد وسیع آن سبب رشد کالوس و غیر نرمال شدن ساقه می‌گردد (Bonga & Von aderkas, 1992).

تحقیقی بر روی گیاه *Taxus mairei* انجام شد و نتایج نشان دهنده‌ی این مطلب بودند که طویل شدن شاخه‌ها در محیط کشت حاوی غلظت‌های پائین تنظیم‌کننده‌های رشد بهتر انجام گرفته است که با نتایج مطالعات ما همخوانی دارد و همچنین درباره اثر BAP (6- بنزیل آمینو پورین) در روی همین گیاه بیان شده است که تأثیر بسیار وافر در تولید شاخه‌ها جدید از ساقه دارد (Chang *et al.*, 2001). ایجاد شاخه از کشت رویان در *Taxus brevifolia* تحت تیمار با BAP (6- بنزیل آمینو پورین) بسیار مؤثر از تیمار با TDZ یا Kin (کینتین) می‌باشد (Chee, 1995) که در مطالعه حاضر هم تیمار هورمونی BAP (اسید آلفا نفتالین استیک) و Kin (کینتین) تأثیر خوبی داشتند و البته در بررسی‌های بیش‌تر هورمون Kin (کینتین) در افزایش طول شاخه مؤثرتر از BAP البته در غلظت‌های پائین داشت.

در گیاه *Cupressus sempervirens* و *Chamaecyparis lausoniana* در رابطه با کشت سر شاخه گزارش شده است که محیط کشت فاقد BA (6- بنزیل آدنین) در مقایسه با محیط کشت دارای BA (6- بنزیل آدنین) تأثیری در افزایش طول شاخه‌ها نداشته و اینکه غلظت پائین BA (6- بنزیل آدنین) کم‌تر از 0.1 میلی‌گرم در لیتر بسیار مؤثر می‌باشد (Spanos *et al.*, 1997).

اضافه کردن سیتوکینین‌ها به محیط کشت یکی از عوامل مهم در توسعه و گسترش جوانه‌های جانبی در کل بازدانگان می‌باشد (Kunz *et al.*, 1993).

اغلب مرحله مشکل از ریزازدیادی در گونه‌های چوبی ریشه زایی در شاخه‌های طویل شده می‌باشد. در کشت شاخه‌های کوچک *T. wallichiana* ریشه زایی در محیط *MS* که میزان نیترات‌های آن یک پنجم حد معمول و فاقد تنظیم‌کننده رشد بوده بعد از 4 ماه اتفاق افتاده است، و اظهار داشتند هر چه غلظت نمک‌ها کم‌تر باشد ریشه زایی بیش‌تر است (Manjari Datta *et al.*, 2006) که با نتایج مطالعه حاضر همخوانی دارد. در گیاه *Cupressus dupreziana* اظهار داشتند که اضافه کردن IAA (ایندول استیک اسید) موجب ریشه دار شدن شاخه‌های طویل شده می‌شود (Harib & Dobry, 1984). طبق تحقیقات انجام شده IBA (اسید3- ایندول بوتریک استیک) بهتر از NAA (اسید آلفا نفتالین استیک) در ریشه زایی است چون NAA (اسید آلفا نفتالین استیک) به احتمال تحریک تشکیل کالوس در انتهای شاخه‌ها در محیط کشت را دارد (Chang *et al.*, 2001). محیط کشت WPM محیطی می‌باشد که فاقد نیترات پتاسیم است و میزان آمونیم آن کم‌تر از محیط کشت MS می‌باشد و در کل میزان نمک‌های ی ماکرو کم‌تر است و بیش‌تر به همین دلیل در کشت بافت گیاهان چوبی از آن استفاده می‌کنند و می‌تواند یکی از عامل‌های تحریک ریشه زایی باشد.

نتیجه‌ی کلی بیانگر این مطلب بود که سیتوکینین‌ها بسیار مؤثر در افزایش طول شاخساره

Archive of SID

www.SID.ir

و هم در رویش برگ می‌باشند که در مطالعه حاضر تیمار هورمونی سیتوکینین به تنهایی نسبت به ترکیب بودن اکسین و سیتوکینین پر اهمیت است و هر چه غلظت هورمون پائین‌تر افزایش طول سر شاخه و تعداد رویش برگ بیش‌تر است.

سپاسگزاری و قدردانی

این مقاله نتیجه طرح تحقیقاتی پژوهشکده گیاهان دارویی جهاد دانشگاهی می‌باشد که بدین وسیله از حمایت‌های مالی آن مرکز تشکر و قدردانی می‌شود. همچنین از سرکار خانم مهندس اولادزاد کارشناس محترم آزمایشگاه بیوتکنولوژی پژوهشکده گیاهان دارویی نهایت تشکر ابراز می‌گردد.

منابع

طباطبایی،ب.ا.، و م.امیدی. 1388. کشت بافت و سلول گیاهی، انتشارات دانشگاه تهران، 368 صفحه.

نیک وش، ن.، م.ح.عصاره، م.ل.قربانلی، و ع.قمری زارع. 1385. تولید گیاهک سرخدار (*Taxus baccata*) با استفاده از کشت درون شیشه ای و نجات رویان، پژوهش و سازندگی، تهران، 71.

یاری خسرو شاهی،ا.، م.ولیزاده،ع.قاسم پور، م.خسرو شاهلی، و ح.ع.نقدی بادی، ح. 1385. اثر محیط کشت، ریزنمونه و تنظیم‌کننده‌های رشد در کا لزایی و تولید تاکسول در سرخدار، *Taxus baccata*.

Bonga,J.M., and P.Von Aderkas. 1992. *In vitro* culture of tree m. Nighoff publishers, Dordereht. 23-45.

Chang,S.H., C.H.Ho, and Z.Z.Tsay. 1998. Micropropagation of *Taxus mairei* seedling at different ages and recoverability of their plagiotropic shoots. Taiwan Journal of Forest Science. 13: 29-39.

Chang,S.H., C.K.HO, Z.Z.Chen, and Y.J.Tsay. 2001. Micropropagation of *Taxus mairei* from mature trees. Plant Cell. Rep 20: 496-502.

Chee,P.P. 1995. Organogenesis in Taxus brevifolia tissue cultures. Plant Cell.; Rep 14: 560-565.

Chee,P.P. 1996. Plant regeneration from somatic embryos of *Taxus brevifolia*. Plant Cell. 16: 184-187.

David,A. 1987. Conifer protoplasm. In: Bonga, J.M., and D.G. Darzan (eds) cell and Tissue Culture in Foresty, Vol.2, Specific principles and methods: Growth and developments. Martinus Nijhoff publisher.; pp: 2-15.

Hirb,J., and J.Dobry. 1984. An explants culture of *Tassilian cypress*, *Cupressus dupreziana* (A. CAMUS). For Ecol. Manage. 8: 235-242.

Kunze,L., R.Grafe, and J.Schiemann. 1993. Continuous *in vitro* multiplication of shoot buds of Norway spruce (*Picea abies L.*) by intermittent application of growth regulators. Bio Plant. 35:11-15.

Manjari Datta,M., A.Majumder, and S.Jha. 2006. Organogensis and plant regeneration in *Taxus wallichiana* (Zucc.). Plant Cell. 25: 11.

Archive of SID

www.SID.ir

Parc,G., A.Conaguier, P.Lander, R.Hocquemiller, D.Chriqui, and M.Meyer. 2002. Production of taxoids with biological activity by plants and callus culture from selected Taxus genotypes. Phytochemistry. 59: 725-730.

Sabater-Jara,A.B., L.R.Tudela, A.J.Lopez-Perez. 2010. In vitro culture of *Taxus* sp.: strategies to increase cell growth and taxoid production. 9: 343-356.

Spanos,K.A., A.Pirri, and S.Woodward. 1997. Micropropagation of *Cupressus sempervirens* L. and *Chamaecyparis lawsoniana* (A.MURR.) PAR. Silva Genetica.; 46-5.

Wann,S.R., and W.R.Glodner. 1994. Induction of somatic embryogenesis in Taxus, and the production of taxane-ring containing alkaloids therefrom. Wo Patent. No 5, 310,672

Archive of SID

www.SID.ir