Archive of SID

ریزازدیادی گیاه داوودی *Chrysanthemum morifolium* Ramat L.

مریم پیوندی*، میترا مرادتهرانی و احمد مجد

تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران- شمال، دانشکده علوم زیستی، گروه زیست شناسی

تاریخ دریافت: ۸۷/۹/۹ تاریخ پذیرش: ۸۸/۱۱/٦

چکیده

برای بهینه نمودن شرایط ریزازدیادی گیاه داوودی، جداکشتهای جوانه جانبی و جوانه انتهایی در محیطهای کشت جامد MS دارای غلظتهای مختلف سوکروز($30gL^{-1}$ یا ٤٠) و بنزیل آمینوپورین BAP ($5-1 mgL^{-1}$) کشت شدند. جوانه های انتهایی و جانبی گیاه گلدانی پس از سترون نمودن به محیط کشت منتقل شدند. تکثیر نوساقه ها از جداکشتهای جوانه جانبی و جوانه انتهایی ساقه های گیاه بالغ و یا ساقه های حاصل از کشت در شیشه، وابسته به غلظت سوکروز و سیتوکینین محیط کشت بود. بیشترین مقدار رشد جوانه های جانبی نمونه های مادری در محیط کشت دارای سوکروز($30gL^{-1}$ یا ٤٠) و BAP($2/5 mgL^{-1}$) و جوانه های انتهایی در محیط کشت دارای سوکروز($30gL^{-1}$) و BAP ($1 mgL^{-1}$)به دست آمد. رشد نو ساقه ها در محیط کشت دارای BAP ($2/5 mgL^{-1}$ یا ۱) افزایش معنی داری را نشان داده بود. شدت رشد جداکشتهای حاصل از نمونه های سترون ریزازدیاد شده بسیار سریع تر از نمونه های گیاه مادری بود. ساقه های باز زایی شده در محیط کشت دارای IBA ($2 mgL^{-1}$)ریشه دار شدند. گیاهان حاصل از کشت در شیشه به گلدانهای حاوی پیت : پرلیت (۱:۱) انتقال یافتند.

واژه های کلیدی: گیاه داوودی، *Chrysanthemum morifolium* ، ریزازدیادی، سوکروز، تکثیر نوساقه

* نویسنده مسئول، تلفن تماس: ۰۹۱۲۲۸۹۹۸٦۷ پست الکترونیکی: m_peyvandi@iau-tnb.ac.ir

مقدمه

گیاه داوودی *Chrysanthemum morifolium* Ramat. (L.) متعلق به تیره Asteraceae ، طایفه Antemideae وسرده *Chrysanthemum* است.از این سرده در حدود ۳۰ گونه یکساله و چند ساله علفی ، چوبی و نیمه چوبی معطر در عالم وجود دارد. این گیاه زینتی و معطر با طیف وسیعی از رنگهای مختلف به شکل گل بریده یا گلدانی مورد استفاده قرار می گیرد که کاربرد وسیع آن را در پارکها و گلخانه ها نمایان تر می سازد. صرف نظرازکاربرد وسیع گل داوودی بعنوان گیاهی زینتی و ارزش فراوان اقتصادی آن، ترکیبات شیمیایی گوناگون این گیاه، جنبه های درمانی بسیار گسترده این گیاه را در بررسیهای علمی جدید طرح نموده و آن را در ردیف گیاهان دارویی مفید محفوظ نگاه می دارد. امروزه مشخص شده است که گیاه مزبور جنبه های دارویی فراوانی دارد که عموماً مربوط به طعم تلخ و اسانس گلهای آن است(۷). استفاده از اسانس آن به مانند سایر اعضاء طایفه آنتمیده (Anthemideae) ، این گیاه را در شمار گیاهان آروماتیک قاره آسیا قرار داده است. اسانس یا روغنهای فرار موجود در گل و برگ آن در صنایع عطر سازی، لوازم آرایشی و بهداشتی، مواد پاک کننده و طعم دهنده های غذایی قا بل استفاده است(۱۹).

ریزازدیادی داوودی به صورت تشکیل شاخه نابجا از بافتها و اندامهای متفاوت به وسیله محققین بسیاری نشان داده شده است (٦ و۸). تکثیر سریع از جداکشتهای جوانه های انتهایی و جوانه های جانبی در حضور سیتوکینینهای مختلف (۱۳،۱۲ و ۱٦) امکان پذیر است. همچنین ریز ازدیادی با استفاده از کالوس برگ ، میانگره ، دمگل و گلچه نیز نشان داده شده است (۳، ۱۹ و۲۱).

www.SID.ir

Archive of SID

کاربردها و مصارف دارویی ، اقتصادی و ارزش زینتی بودن این گیاه و محدود بودن مطالعه در این زمینه ، انگیزه هایی بودند تا بررسی امکان کشت در شیشه داوودی و بهینه سازی شرایط آن دراین پروژه انجام گردد.

هدف از این پروژه ، بهینه نمودن شرایط ریزازدیادی گیاه داوودی به وسیله کشت جداکشتهای جوانه جانبی و جوانه انتهایی در محیطهای کشت جامد MS دارای غلظتهای مختلف سوکروز و سیتوکینین بنزیل آمینوپورین (BAP) بود.

مواد و روشها

این پروژه در سال ۸٦-۱۳۸۵ در مجتمع آزمایشگاهی دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال انجام گرفت. نمونه های گیاهان گلدانی داوودی مورد نیاز از باغچه پرورش گیاهان زینتی در تهران تهیه گردیدند. قطعات مورد نیاز پس از شستشو با آب جاری با محلول کلرید جیوه ۰/۱ درصد به مدت ده دقیقه و شستشو با آب مقطر سترون (سه بار) سترون شدند. جداکشتهای جوانه انتهایی و جوانه جانبی (بخشهای دارای یک گره) در محیط کشت جامد MS (۱۵) دارای غلظتهای مختلف سوکروز (gL^{-1}۳۰ و ٤۰) و BAP (mgL^{-1} ۱، ۲/۵، ۵)کشت شدند. pH محیط کشت(۵/۸) قبل از اضافه کردن آگار (gL^{-1} ۷) تنظیم شد و با اتوکلاو در دمای ۱۲۰ درجه سانتی گراد سترون گردید.

همه نمونه ها در اتاق رشد در دوره نوری ۱٦ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی، در شدت نور حدود ٤۰ میکرومول بر متر مربع در ثانیه و در دمای ۲ ± ۲۵ درجه سانتی گراد به مدت ٤۵ روز نگهداری شدند. ٦ هفته پس از کشت نو ساقه های سترون جهت تکثیر برای مراحل بعدی به دست آمدند. به این ترتیب که جوانه های انتهایی و جوانه های جانبی نو ساقه ها در همان محیط کشت اولیه انجام شد.

جهت ریشه زایی نوساقه های حاصل از کشت، از محیط کشت جامد MS دارای اندول بوتیریک اسید (IBA) (mgL^{-1} ۲) استفاده شد. سپس گیاهچه های سترون به گلدانهای حاوی پیت و پرلیت سترون به نسبت ۱:۱ منتقل و در جعبه های شفاف دارای پرلیت سترون مرطوب قرار گرفتند و در اتاق کشت در دمای ۲ ±۲۵ درجه سانتی گراد نگهداری گردیدند.

آنالیز آماری: هر تیمار حداقل با بیست تکرار انجام شد. در پایان هر دوره ٤۵ روزه ، تعداد و طول نو ساقه های هر جداکشت یادداشت شد ، سپس داده ها توسط نرم افزار SPSS(ver. 14) آنالیز گردید. آنالیز واریانس میانگینها با برنامه ANOVA و گروه بندی میانگینها با آزمون دانکن ($P\leq$۰/۰۵) مورد بررسی قرار گرفت .

نتایج

در این بررسی جداکشتهای تک گره گیاه مادری در محیط کشت MS با تیمارهای کربنی و هورمونی متفاوت (جدول ۱) کشت شدند. نتایج نشان داد که جداکشتها در این محیط کشتها ۲ هفته پس از کشت قادر به رشد می شوند.

مقایسه میانگین شاخصهای رشد در محیطهای کشت مختلف نشان داد که تفاوتهای مشاهده شده در تعداد و طول نوساقه های باززایی شده در محیطهای کشت مختلف در مراحل کشت و واکشت نمونه ها در حد $P\leq$۰/۰۵ معنی دار است، در مرحله کشت، حداکثر میانگین طول و تعداد نوساقه ها در هر جداکشت، در محیط کشت دارای BAP (mgL^{-1} ۲/۵) و سوکروز (gL^{-1}۳۰) به دست آمد(جدول ۱). در محیطهای واکشت، حداکثر میانگین طول نوساقه های هر جداکشت در محیط کشت دارای BAP (mgL^{-1} ۱) و سوکروز (gL^{-1}۳۰) مشاهده شد و حداکثرمیانگین تعداد نوساقه های هر جداکشت در محیط کشت دارای BAP (mgL^{-1} ۲/۵) در حضور سوکروز (gL^{-1} ٤۰) به دست آمد (جدول۱). جداکشتهای جوانه انتهایی تنها در محیط کشت دارای BAP (mgL^{-1} ۱) در حضور سوکروز

www.SID.ir

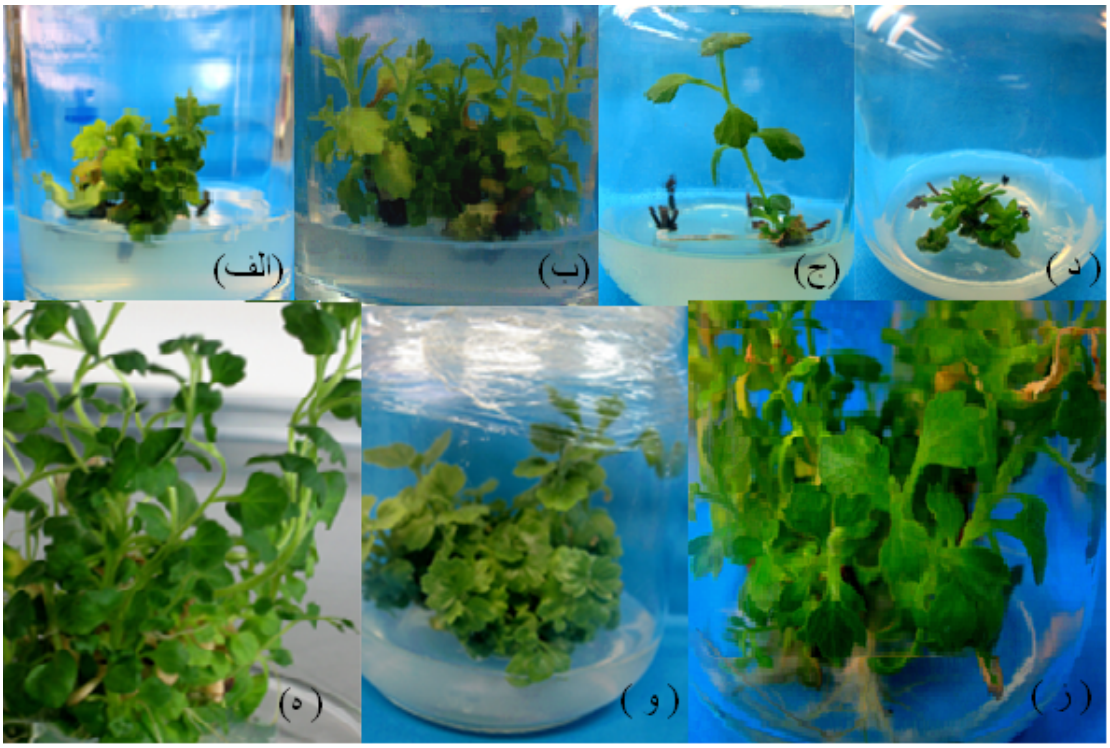
Archive of SID

($۳۰gL^{-1}$) رشد نمودند. در سایر تیمارها جداکشتها پس از مدت کوتاهی زرد یا قهوه ای شده و از بین رفتند (جدول۱) (شکل۱).

جدول ۱ – میانگین طول و تعداد نوساقه های حاصل از کشت و واکشت جوانه های جانبی و انتهایی در محیط کشت پایه MS در تیمارهای متفاوت BAP و سوکروز در مراحل کشت و واکشت (گروه بندی براساس آزمون دانکن $P\leq ۰/۰۵$)

تیمار	سوکروز gL^{-1}	BAP mgL^{-1}	کشت جوانه انتهایی		کشت جوانه جانبی		واکشت جوانه جانبی	
			طول نوساقه (cm)	تعداد نوساقه	طول نوساقه (cm)	تعداد نوساقه	طول نوساقه (cm)	تعداد نوساقه
۱	۳۰	۱	۲/۰۰ (b)	۲/۵۰(cd)	۱/۱۷(b)	۱/۳۷(de)	۹/۵۰(a)	٤/۹۷(a)
۲	۳۰	۲/۵	۰/۷۵(bc)	۱/۵۰(d)	۳/۰۳(ab)	۲/۱٤(cd)	۷/٤۵(a)	۲/۹۲(bcd)
۳	۳۰	۵	۰/۸۳(bc)	۱/۰۰(de)	۱/۰۰(bc)	۱/۵۸(de)	۱/۷۲(b)	۱/٦۷(d)
٤	٤۰	۱	۱/۰۰(bc)	۱/۰۰(de)	۰/۹٦(bc)	۱/۲۹(de)	۷/۳۹(a)	۳/۵٦(bc)
۵	٤۰	۲/۵	۰/۰۰(c)	۰/۰۰(f)	۲/۱۲(b)	۱/۷۹(cd)	۹/۲۹(a)	٤/۱٤(a)
٦	٤۰	۵	۰/٦۳(bc)	۲/۰۰(cd)	۱/٤۵(bc)	۱/۳۰(de)	۲/۰٦(b)	۲/٦۳(cd)

*حروف مشترک نشان دهنده معنی دار نبودن تفاوت بین میانگینها است.



شکل ۱– رشد و ریشه زایی جداکشتها در محیطهای کشت مختلف : (الف) جوانه جانبی، در محیط کشت دارای BAP ($۱mgL^{-1}$) و سوکروز ($۳۰gL^{-1}$)؛ (ب)جوانه جانبی، در محیط کشت دارای BAP ($۲/۵mgL^{-1}$) و سوکروز ($۳۰\ gL^{-1}$)؛ (ج) جوانه انتهایی، در محیط کشت دارای BAP ($۱mgL^{-1}$) و سوکروز ($۳۰\ gL^{-1}$)؛ (د) جوانه انتهایی، در محیط کشت دارای BAP ($۱mgL^{-1}$) و سوکروز ($٤۰\ gL^{-1}$)؛ (ه) جوانه جانبی، در محیط واکشت دارای BAP ($۱mgL^{-1}$) و سوکروز ($۳۰\ gL^{-1}$)؛ (و) جوانه جانبی، در محیط واکشت دارای BAP ($۲/۵mgL^{-1}$) و سوکروز ($۳۰gL^{-1}$)؛ (ز) نوساقه های ریشه دارشده ۱ هفته پس از انتقال به محیط کشت دارای IBA ($۲mgL^{-1}$)

www.SID.ir

Archive of SID

این آزمایشها بر روی جداکشتهای نمونه های همان گلدان در خرداد ماه تکرار شد. نمونه ها در هیچ کدام از محیطها رشد نکردند و پس از مدت کوتاهی از بین رفتند. این مسئله به احتمال قوی اثر فصل را در ریزازدیادی داوودی مطرح می نماید.

نتایج حاصل از اندازه گیری طول نوساقه هایی باززایی شده و تعداد انشعابات آن نشان داد که بیشترین میانگین طول و تعداد نوساقه ها مربوط به محیط کشت دارای BAP($2/5\ mgL^{-1}$ یا۱) و با سوکروز($30gL^{-1}$) و همچنین محیط کشت دارای BAP($2/5mgL^{-1}$) و سوکروز($40gL^{-1}$) بود(جدول ۱).

ریشه زایی در نوشاخه های حاصل ازکشت در شیشه:
نوساقه های حاصل از کشت در شیشه تحت تیمار BAP و سوکروز، در محیطهای کشت دارای IBA ($2\ mgL^{-1}$) و غلظتهای متفاوتی از سوکروز مشابه با محیطهای کشت قبلی خود کشت گردیدند. نتایج نشان دادکه ۱۰۰ درصد نو شاخه ها ریشه دار شدند (شکل ۱). ٤٥ روز پس از تیمار ، نوساقه های ریشه دار شده به گلدانهای حاوی پیت:پرلیت (۱:۱) انتقال یافتند.

بحث

حداکثر رشد جوانه های جانبی گیاه مادری داوودی درمحیط کشت پایه MS درمحیط دارایBAP (mgl^{-1} ۲/۵میلی گرم در لیتر)و سوکروز ($30gL^{-1}$) به دست آمده است، با واکشت نمونه ها جهت باززایی محیط ، حداکثر رشد در همین غلظت از سوکروز اما با غلظت کمتری از BAP($1\ mgL^{-1}$) حاصل شد.

هورمون سیتوکینین و مشتقات آن نقش مؤثری در تحریک و پرآوری جوانه های جانبی و انتهایی به وسیله از بین بردن غالبیت انتهایی ایفاء می کنند (۳، ۵، ۹) ، از جمله هورمون BAP که مناسب ترین هورمون در ریزازدیادی این گیاه تشخیص داده شده است.

این نتایج با یافته های Karim و همکاران(۱۱) قابل مقایسه است . نتایج حاضر نشان می دهد ، جداکشتهای مادری نسبت به جداکشتهای ریزازدیاد شده به سیتوکینین بیشتری نیاز دارند. مطابق با گزارش Aliyu (۱) در مورد جوانه های جانبی گیاه Cashew ، نمو شاخه تحت تأثیر هورمونBAP در دو مرحله انجام می شود : ۱) در مرحله اول، نمو جوانه های جانبی با غلظت بالاتری از BAP میسر است.۲) در مرحله دوم، طویل شدن نو شاخه ها در غلظت پایین BAP امکان پذیر است. ما حصل این بخش از پروژه حاضر با یافته های مذکور همخوانی دارد.

مقایسه جداکشتهای جوانه های انتهایی و جوانه های جانبی نشان می دهد کارایی جوانه ای جانبی در ریزازدیادی بسیار بیشتر از جوانه انتهایی است. این احتمال وجود دارد که نبود غالبیت رأسی در جوانه های جانبی می تواند نقش مهمی در موفقیت استفاده از این جداکشتها داشته باشد (۳ و ۱۷). علاوه بر نقش بسیار مهم سیتوکینین ها در باززایی جوانه های گیاه داوودی ، اهمیت کربوهیدرات سوکروز در محیط کشت در القای اندام زایی وتأمین انرژی و تحریک اسمزی قابل توجه است(٤). با توجه به آنکه سوکروز به عنوان قند قابل دسترس مطرح است، درغالب محیطهای کشت بافتهای گیاهی از سوکروز به عنوان منبع انرژی استفاده می شود. نقش کربوهیدرات سوکروز در افزایش رشد نوساقه ها ، مقدار زیتوده و کارآیی فتوسنتز گیاهچه های حاصل از کشت ، ریشه زایی ریز قلمه ها در شیشه و استقرار و سازگاری آنها در خاک نشان داده شده است(۷) . Amin و Jaiswal (۲) نشان دادند که سنتز کلروفیل و رشد ساقه گیاه guava (*Psidium gujava L.*) در محیط فاقد سوکروز صورت نمی گیرد. تجزیه و تحلیل میانگینهای شاخصهای رشد نشان داد غلظتهای مختلف سوکروز تأثیر معنی داری بر افزایش رشد ساقه ندارد ، درحالی که بر تعداد نوساقه ها در هر جداکشت مؤثر است . این نتیجه با یافته های

www.SID.ir

Archive of SID

Shibli و همکاران(۱۸)، Karim و همکاران(۱۰) و Trifunović و همکاران (۲۰) همخوانی دارد.

براساس این نتایج محیط MS حاوی BAP برای ریزازدیادی گیاه داوودی از ناحیه جوانه جانبی پیشنهاد می گردد که با توجه به آن می توان در زمانی کوتاه به تکثیر موفقی از گیاه دست یافت.

نوساقه های حاصل از کشت جوانه های جانبی در محیط کشت MS دارای IBA (۲ mgL^{-1}) به سهولت ریشه دار شدند. این نتیجه با گزارش Karim و همکاران(۱۰) در مطالعه ریشه زایی گیاهچه های گیاه داوودی قابل مقایسه است. هورمون اکسین و ترکیبات مشابه با آن ، عاملی مناسب برای ریشه زایی می باشند. این هورمون براحتی سبب تحریک سلولهای دایره محیطیه در بخشهای بالایی ناحیه تارهای کشنده می شود، این تحریک منتج به تقسیم سلولهای این منطقه و در نهایت تشکیل ریشه می گردد (۱٤).

منابع

1- Aliyu, O.M. , 2005. Application of tissue culture to cashew (*Anacardium occidentale* L.) breeding: An appraisal . African Journal of Biotechnology,Vol. 4 (13), pp. 1485-1489.

2- Amin,M.N. and Jaiswal, V.S., 1989. Effects of phloroglucinol, sucrose, pH and temperature on *in vitro* rooting of guava (*Psidium gujava L.*) microcuttings. Bangladesh Journal of Botany.,18:129-139.

3- Battacharya, P., Dey B., Das , N. and Bhacttacharya, B.C., 1990. Rapid mass propagation of *Chrysanthemum morifolium* by callus derived from stem and leaf explants.Plant Cell Reports, 9: 439-442.

4- Brown,D.C.M., Leung D.W.M. and Thrope T.A. ,1979. Osmotic requirement for shoot formation in tobacco callus. Physiologia Plantarum, 46:36-41.

5- Davies, P.J. 1995. Introduction. In Plant Hormones, P.J. Davies, ed(Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic Publishers), pp. 1–38.

6- Earle, E.D. and Langhans W.R. , 1973. Propagation of *chrysanthemum in vitro*.1. Multiple plantlets from shoot tips and yhe establishedment of tissue culture. Journal of Horticultural Science, 99: 128-132.

7- Hazarika B. N. ,2003. Acclimatization of tissue-culture plants. Current Science, Vol. 85, No. 12:1704-1712.

8- Hill, G., P.,1968. Shoot formation in tissue cultures of *Chrysanthemum* "Bronze Pride" .Plant ., 21:386-389

9- Hillman, J.R.,1984. Apical dominance. In Advanced Plant Physiology, M.B. Wilkins, ed (London: Pitman Publishing), pp. 127–148.

10- Karim M.Z., Amin M.N., Asaduzzaman , Islam S. , Frank Hossin and Alam R., 2002. Pakistan Journal of Biological Science5(11):1170-1172.

11- Karim M.Z., Amin M.N., Azad M.A.K., Begum F., Rahman M.M., Islam M.M. and Alam R., 2003. Effects of Different Plant Growth Regulator on *in vitro* Shoot Multiplication of *Chrysanthemum morifolium*. Journal of Biological Sciences 3 (6): 553-560.

12- Khan, M.A., Ara, D.K.A. and Hossein, A.K.M.A., 1994. *In vitro* plant regeneration in *Chrysanthemum morifolium*(Ramat).Plant Cell Tissue and Organ Culture,4:53 -57.

13- Khehra,M., Lowe,K.C., Davey, M.R. and Power, J.B.,,1995. An improved micropropagation system for *Chrysanthemum* based on Pluronic F-68-supplemented media, Plant Cell, Tissue and Organ Culture,41(2): 87-90

14- Laskowski, M.J., Williams, M.E., Nusbaum, H.C. and Sussex, I.M.,1995. Formation of lateral root meristems is a two-stage process. Development 121: 3303–3310

15- Murashige T and Skoog, 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures . Plant Physiology,15:473-97.

16- Roest, S. and Bokelman, G.S., 1975. Vegetative propagation of *Chrysanthemum morifolium* Ramat *in vitro,* Scientia Horticulturae, 3: 317-330.

17- Shahat A.A. , Apers S., Pieters L. and Vlietink A. , 2000. Isolation and complete NMR assignment of the numbing principle from *Chrysanthemum morifolium* , Fitoterapia 72, 89 91.

www.SID.ir

Archive of SID

18- Shibli RA, Smith M.A.L. and Spomer LA.,1992. Osmotic adjustment and growth responses of three *Chrysanthemum morifolium* Ramat cultivars to osmotic stress induced in vitro. Journal of Plant Nutrition ,15:1373– 81.

19-Teixeira da Silva, J.A., 2003. *Chrysanthemum*: advances in tissue culture, cryopreservation, postharvest technology, genetics and transgenic biotechnology, Biotechnology Advances,21(8): 715-766

20- Trifunović,M., Jevremović,S., Nikolić,M., Subotić, A. and Radojević, L.J.,2006**.** Micropropagation of *chrysanthemum* cultivars-effect of cold storage on plant regeneration *in vitro*,Acta Horticulturae,764

21-Xue J.P.,Zhanq, A.M. and Zhao, F.L., 2002.Study on stem-tip tissue culture of the traditional Chinese medicine *Chrysanthemum morifolium*, Zhongguo Zhong Yao Za Zhi, 27(5):350- 360

Micropropagation of *Chrysanthemum morifolium* Ramat L.

Peyvandi M., Morad Tehrani M. and Majd A.

Biology Dept., Faculty Of Biology, Islamic Azad University, Tehran-North Branch, Tehran, I.R. of IRAN

Abstract

To optimize *in vitro* propagation of *Chrysanthemum morifolium* Ramat, explants from auxillary and apical buds were cultured in MS medium supplemented with sucrose (30-40 gl^{-1}) and different concentrations of cytokinin BAP (1-5 mgl^{-1}). Proliferation of shoots from the segments of auxillary and apical buds of the mature plants and *in vitro* originated raised shoots were remarkably influenced by concentrations of the cytokinin and sucrose. Among different applied concentrations of sucrose and BAP, best response towards shoot proliferation from explants of mature plants were obtained in the media with sucrose (30 or 40 gL^{-1}) and BAP (2.5 mgL^{-1}) and from apical buds were gained in the medium with sucrose (30 gL^{-1}) and BAP (1 mgL^{-1}). Growth of *in vitro* shoot explants were significantly increased in the medium with BAP (1 - 2.5 mgl^{-1}). The rate of micropropagation from auxillary buds of *in vitro* shoots was much more than that of the mature plant. Regenerated shoots were rooted in MS basal medium supplemented with IBA (2mgl^{-1}). Obtained plantlets were transferred to the pots containing peat: perlit.

Keywords: *Chrysanthemum morifolium,* propagation,sucrose , poliferation of shoot

www.SID.ir