Archive of SID

فصل‌نامه داروهای گیاهی
journal homepage: www.journal.iaushk.ac.ir

امکان استفاده از بذور گیاهان دارویی در محیط کشت بافت و تعیین شرایط بهینه کاربرد آن‌ها به عنوان عامل ژله ایی کننده جایگزین آگار

محمود اطرشی[۱]، الهام توکلی دینانی[۲]، امیر معصومی[۳]

۱. پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی منطقه مرکزی کشور (اصفهان) (ABRII)، اصفهان، ایران؛
۲. باشگاه پژوهشگران جوان، دانشگاه آزاد اسلامی واحد رودهن، تهران، ایران؛
** مسئول مکاتبات(E-mail: elham230@yahoo.com)*
۳. دانشجوی کارشناسی ارشد دانشگاه صنعتی شاهرود، شاهرود، ایران؛

شناسه مقاله

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۰/۰۵/۲۳
تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۰/۰۷/۳۰
نوع مقاله: پژوهشی
موضوع: به زراعی به نژادی

کلید واژگان:

- ✓ *کشت بافت گیاهی*
- ✓ *مواد ژله ایی کننده*
- ✓ *آگار*
- ✓ *اسفرزه*
- ✓ *بذر گیاهان دارویی*

چکیده

مقدمه و هدف: آگار، یکی از مشتقات نوعی جلبک دریایی است، که به عنوان ماده ی مولد ژل در اکثر محیط های کشت استفاده می شود. با وجود آن که یک محصول طبیعی و گیاهی است اما فرآوری آن، هزینه بر است. در طبیعت جایگزین های دیگری برای آگار وجود دارد.

روش تحقیق: لذا به منظور بررسی امکان جایگزینی آگار با دیگر ترکیبات دارویی ارزان قیمت، آزمایشی در دو مرحله در قالب طرح بلوک های کامل تصادفی با سه تکرار در پژوهشکده بیوتکنولوژی ناحیه مرکز انجام شد. نخست آزمایشی با استفاده از بذور چهار نمونه گیاه دارویی بذرک، بالنگو، اسفرزه و شاهی به عنوان عامل ژله ایی کننده محیط کشت در مقایسه با شاهد آگار ترتیب داده شد. بذور این ۴ گیاه با قابلیت تولید موسیلاژ، به جای آگار در مقادیر ۱، ۲، ۳، ۴ و ۵ گرم بذر در ۳۰ میلی لیتر محیط کشت مایع به محیط کشت بافت اضافه شد و صفاتی نظیر درصد ریزنمونه های رشد یافته، طول گیاهچه، تعداد شاخه های فرعی، تعداد برگ و طول میان‌گره ریز نمونه های گیاه استویا در این محیط، مورد ارزیابی قرار گرفت.

نتایج و بحث: اسفرزه بهتر از سایر بذور توانست شرایط رشد را برای ریزنمونه ها فراهم کند. در مرحله دوم به منظور تعیین مقدار بهینه کاربرد این بذر، مقادیر ۱، ۲، ۳، ۴و ۵ گرم بذر اسفرزه با حضور و عدم حضور زغال فعال به محیط کشت اضافه شد، در تیمار شاهد از آگار استفاده شد. نتایج نشان داد که استفاده از یک گرم بذر گیاه اسفرزه با حضور زغال فعال در صفات طول گیاهچه، تعداد برگ، طول میان‌گره، طول درازترین ریشه و وزن خشک گیاهچه اختلاف بسیار معنی داری را با سایر تیمارها ایجاد کرد.

توصیه های کاربردی: با توجه به نتایج حاصل از تحقیق حاضر می توان تا حدودی بذر اسفرزه را به دلیل داشتن موسیلاژ به عنوان جایگزین آگار جهت ژله ای شدن محیط کشت پیشنهاد کرد.

۱. مقدمه

آگار یک پلی ساکارید با توده ی مولکولی بالا، ماده ای ژلاتینی است که حاوی پلی ساکارید های بدون شاخه است و از دیواره سلولی بعضی از جلبک های قرمز و جلبک های دریائی[۱] به دست می‌آید (Yamasaki & Osuga, 1960) و به عنوان ماده‌ی مولد ژل

[1] Seaweed

www.SID.ir

Archive of SID

در محیط های کشت، از جمله مواد پرکاربرد و گران قیمت در بیوتکنولوژی گیاهی محسوب می شود (Montagne, 1837). فرآیند تولید، تخلیص و خالص سازی آن توسط کارخانجات ویژه و به منظور حذف مواد سمی آن با صرف هزینه و سرمایه گزاف قابل اجراست (Scholten & Pierik, 1998) به جز آگار، امکان استفاده از سایر منابع طبیعی به منظور تولید ژل در محیط های کشت وجود دارد (پیری و نظریان فیروز آبادی، ۱۳۸۰). از جمله این موارد که می توان در تهیه محیط های کشت بافت مورد استفاده قرار داد، بذور گیاهان داروئی با قابلیت تولید موسیلاژ است (فکری و همکاران، ۱۳۸۷). تولید گونه های مختلف این بذور در کشور ایران با صرف هزینه اندک و درسطح بالایی از کیفیت امکان پذیر است. سرزمین ایران با گستره ایی وسیع و پهناور، دشت‌ها، کوهستان‌ها و اقلیم های گوناگون و تفرق بی نظیری از گونه‌های گیاهی(بالغ بر ۷۵۰۰ گونه که حدود ۲ برابر گونه های گیاهی هر کدام از کشورهای اروپایی است) زیست‌گاه پهناوری از ذخایر ژنتیکی و متابولیتی با ارزشی است و به جرأت می‌توان فلور ایران را از مهمترین منابع رشد گیاهان داروئی در جهان به حساب آورد (شمس، ۱۳۸۸). هرچند آگار به عنوان ماده ژله ایی کننده متداول در محیط های کشت گیاهی کاربرد دارد (McHugh, 2001) اما بذور گیاهان دارویی با قابلیت تولید مواد ژله ایی، به عنوان منابع جدید، ارزان و متنوع برای ژله ایی کردن محیط های کشت می‌تواند قابل ارزیابی و پرکاربرد باشند.

۲. مواد و روش‌ها

۲-۱. مرحله اول آزمایش

به منظور بررسی امکان کاربرد بذور گیاهان دارویی به عنوان منابع جدید جایگزین آگار در تهیه محیط های کشت گیاهی، آزمایشی در اردیبهشت ۱۳۸۹ در محل پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی اصفهان، آزمایشی در قالب طرح بلوک های کامل تصادفی در سه تکرار با استفاده از بذور چهار نمونه گیاه دارویی بذرک (*Linum usitatissimum* L.)، بالنگو (*Citrus medica* L.)، اسفرزه (*Plantago ovate* Forsk.) و شاهی (*Lepidium sativum* L.) به عنوان عامل ژله ایی کننده محیط کشت در مقایسه با شاهد آگار ترتیب داده شد. در ابتدای کار ذرات اضافی، بذور شکسته و ناقص و هم‌چنین تکه‌های چوب باقی مانده از گل آذین‌ها، جدا و حذف شدند. استریل کردن بذور، محیط کشت و وسایل کشت در اتوکلاو در دمای $121\ ^{o}C$ و فشار ۱۵ psi (پوند بر اینچ مربع) به مدت ۲۰ دقیقه انجام شد. طی این فرآیند هم از انتقال آلودگی توسط بذور به محیط کشت جلوگیری شد و هم از جوانه زنی بذور در طی آزمایش ممانعت به عمل می آید. سایر وسایل مورد نیاز برای کشت بافت شامل پنس، اسکالپل، پتری در آون در دمای ۲۰۰ درجه سانتی گراد و به مدت ۲ ساعت استریل شدند. بذور در مقادیر ۱، ۲، ۳، ۴ و ۵ گرم بذر به ۳۰ میلی لیتر محیط کشت مایع ویژه استویا که در شیشه های مربایی توزیع شده بود، اضافه شدند. پس از سرد شدن و ژله ایی شدن محیط، در تمام ظروف ریز نمونه های گیاه استویا که هر یک دارای دو جوانه جانبی بودند کشت داده شد. کلیه مراحل کار زیر کابین لامینار ایرفلو و تحت شرایط کاملاً سترون انجام شد. پس از قرار دادن درب شیشه ها با پارافیلم کاملاً مسدود گردید و سپس در اتاق رشد با دمای ۲۴ درجه سانتی‌گراد و شدت نور ۲۰۰۰ لوکس با تناوب نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی نگهداری شدند. گیاهچه های رشد یافته پی از ۳ هفته مورد ارزیابی قرار گرفتند. در پایان صفاتی نظیر درصد ریز نمونه های رشد یافته، طول گیاهچه، تعداد شاخه های فرعی، تعداد برگ و طول میانگره مورد ارزیابی قرار گرفت. بذور گیاهان دارویی از کلکسیون گیاهان دارویی مرکز تحقیقات شهید فزوه و ریزنمونه های استویا جهت تولید گیاهچه‌های درون شیشه‌ای از بخش کشت بافت پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی منطقه مرکزی ایران تهیه شد.

آزمون‌ها در سه تکرار طراحی شد و داده‌های حاصل از کلیه آزمایشات با استفاده از نرم‌افزار آماری SAS 6.12 Full مورد تجزیه قرار گرفت. مقایسه میانگین‌ها با آزمون دانکن و LSD در سطح احتمال ۵ درصد انجام گرفت.

۲-۲. مرحله دوم آزمایش

در این مرحله برای تعیین مقدار و شرایط بهینه کاربرد بذور اسفرزه در محیط کشت به جای آگار، آزمایشی در قالب طرح بلوک های کامل تصادفی با استفاده از ۱، ۲، ۳، ۴ و ۵ گرم بذور گیاه

www.SID.ir

Archive of SID

دارویی اسفرزه با حضور و عدم حضور زغال فعال در محیط کشت گیاه و تیمار شاهد با کاربرد آگار، در سه تکرار انجام گرفت. شرایط آزمایش مشابه مرحله نخست انجام گرفت (شکل ۴).

۳. نتایج و بحث

۳-۱. مرحله اول آزمایش

در این مقایسه اسفرزه بهتر از سایر تیمارها توانست شرایط رشد را برای ریزنمونه ها فراهم کند. نتایج نشان داد (شکل ۱) از میان مقادیر مختلف بذر، استفاده از ۱ و ۲ گرم بذر، می تواند شرایط طبیعی رشد را فراهم سازد. هر چند در تمام محیط های تهیه شده به جز محیط شاهی، ریزنمونه ها رشد مطلوبی داشتند (شکل ۲)، اما کیفیت رشد در محیط های تهیه شده با استفاده از بذور دو گیاه بذرک و اسفرزه در کلیه صفات مورد بررسی، دارای نتیجه و عملکرد بهتری بوده است. تنها در مورد بذور شاهی به دلیل حضور ترکیبات ثانویه قوی و بازدارنده رشد در محیط کشت، به نابودی کامل تمام نمونه ها انجامید (شکل ۱، ج). می توان چنین نتیجه گرفت که بذور گیاهان دارویی با قابلیت تولید موسیلاژ، یکی از گزینه های امکان پذیر در تهیه محیط کشت بافت نمونه های گیاهی محسوب می شوند. این بذور با دارا بودن ترکیبات ثانویه موثر، در رشد و توسعه‌ی نمونه های کشت بافت می توانند نقش تعیین کننده ای داشته باشند. بر طبق مشاهدات این آزمایش، استفاده از بذور گیاهان دارویی در محیط کشت بافت، نه تنها از رشد نمونه های گیاهی حمایت می کند بلکه در مواردی نتایج حتی بسیار بهتر از آگار خواهد بود، با کاربرد اسفرزه در محیط کشت، ساقه ها قطورترند و ریز نمونه ها برای تولید کالوس مستعدترند (شکل ۳).

۳-۲. مرحله دوم آزمایش

نتایج نشان داد (جدول۱) که استفاده از یک گرم بذر گیاه اسفرزه با حضور زغال فعال از نظر صفات طول گیاهچه، تعداد برگ، طول میان‌گره، طول درازترین ریشه و وزن خشک گیاهچه اختلاف بسیار معنی داری با سایر تیمارها دارد. این بدین معناست که می-توان با انجام بررسی های بیشتر منابعی جدید، پرکاربرد و ارزان را برای ژله‌ایی کردن محیط‌های کشت جایگزین آگار نمود. این آزمایش نشان می‌دهد که استفاده از بذور گیاهان دارویی در محیط کشت بافت، نه تنها از رشد نمونه های گیاهی حمایت می کند، بلکه در مواردی حتی بسیار بهتر از آگار خواهد بود، با کاربرد اسفرزه در محیط کشت، ساقه‌ها قطورترند و ریزنمونه‌ها برای تولید کالوس مستعدترند. به نظر می رسد انجام مطالعات گسترده تر در این راستا می تواند چشم انداز تازه ایی را در صنعت تولید متابولیت های ثانویه به کمک روش‌های جدید کشت بافت ترسیم نماید.

گیاه اسفرزه به عنوان عامل ژله ایی کننده موثر محیط کشت انتخاب شد. گیاهان تیره بارهنگ[2] در نواحی مختلف کره زمین خصوصاً نواحی معتدله پراکنش دارند و شامل ۳ جنس و ۲۷۰ گونه می باشند. گیاه اسفرزه یک‌ساله علفی و کوتاه است و ارتفاع آن به ۴۰ – ۱۰ سانتی متر می رسد. دارای ساقه ایی پوشیده از تارهای نرم است (Kalayasundram ، 1982). میوه پوشیده، شکوفا، دو خانه و معمولاً حاوی یک دانه کوچک به رنگ خرمایی در هر خانه است. وزن هزار دانه این گیاه ۱/۵ تا ۱/۹ گرم می باشد (Chadho & Rajender, 1995) اسفرزه از منابع مهم تولید طبیعی موسیلاژ شناخته می شود. از نظر تجاری، مهمترین فرآورده حاصل از دانه های اسفرزه، غشای دانه است که در اثر هیدرولیز موسیلاژ، تولید دگزیلوزان، آرابینوز، د – گالاکتوز، د – گالاکتورونیک اسید می نماید. هم‌چنین دارای روغن ثابت، پروتئین و املاح معدنی می باشد. موسیلاژ موجود در لایه سطحی پوسته دانه، به‌طور وسیعی جهت تولید داروی ملین در داروسازی مورد استفاده قرار می گیرد و مقدار آن معمولاً ۲۵ درصد وزن عملکرد دانه است (خزاعی و هم‌کاران، ۱۳۸۶). اسفرزه از گروه داروهای ملین یا لعاب‌دار است که به دلیل خاصیت جذب آب باعث حجیم شدن مواد محتوی روده و رفع یبوست می شود (گلوی و هم‌کاران، ۱۳۸۶). این گیاه بومی ایران، هند و کشورهای خاورمیانه است و در حال حاضر هندوستان بزرگ-ترین صادر کننده بذر این محصول در دنیا می باشد که حدود ۸۰ تا ۹۰ درصد محصولش را صادر می کند (خزائی و هم‌کاران، ۱۳۸۶). این در حالی است که ایران به عنوان خواستگاه و رویشگاه طبیعی این محصول سابقه چندانی در رابطه با کشت و تولید آن ندارد (نجفی و رضوانی مقدم، ۱۳۸۰).

[2] Plantaginaceae

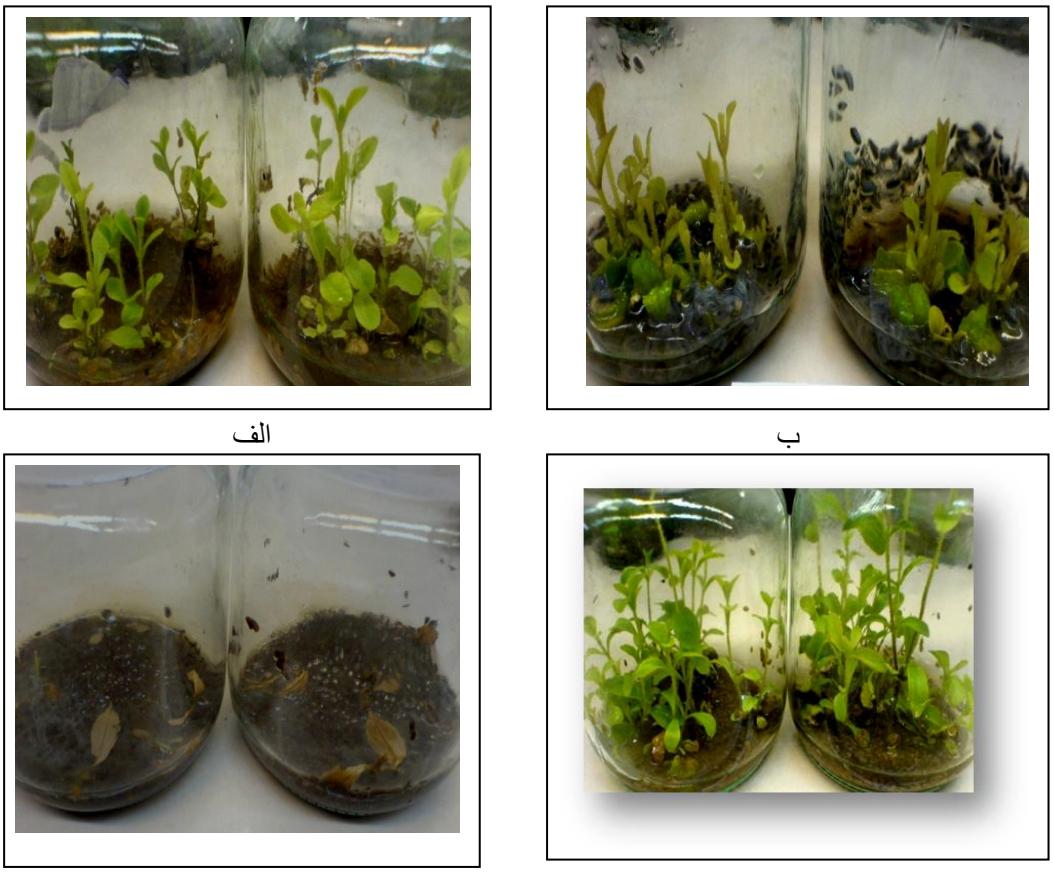
www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۱. تجزیه واریانس تیمارهای مختلف در ریز نمونه های استویا کشت بافت در محیط اسفرزه

منابع تغییرات	درجه آزادی	رشدو سبز شدن ریز نمونه ها (٪)	طول گیاهچه (mm)	تعداد شاخه های فرعی	تعداد برگ	طول میان‌گره (mm)
مقدار بذر	۴	۱۶۵۸,۳۳ **	۱۸,۰۱ **	۸۸,۶۶ **	۱۰۷۱,۰۶ **	۲,۰۸**
نوع بذر	۴	۱۰۶۵۸,۳۳ **	۱۴۲,۴۷ **	۲۴,۱۴ **	۱۵۴۹,۲۳ **	۱۰,۰۷۴ **
اثر متقابل مقداربذر × نوع بذر	۱۶	۱۸۴۵,۸۳ **	۴,۱۲ **	۰,۵۴ **	۲۶۳,۶۰ **	۰,۵۹ **
خطا	۵۰	۸,۳۳ **	۰,۳۰ **	۹۴,۰۵ **	۵,۴۳ **	۰,۰۴۸ **

ns: عدم تفاوت معنی دار، **: تفاوت معنی دار در سطح احتمال ۱ درصد، *: تفاوت معنی دار در سطح احتمال ۵ درصد

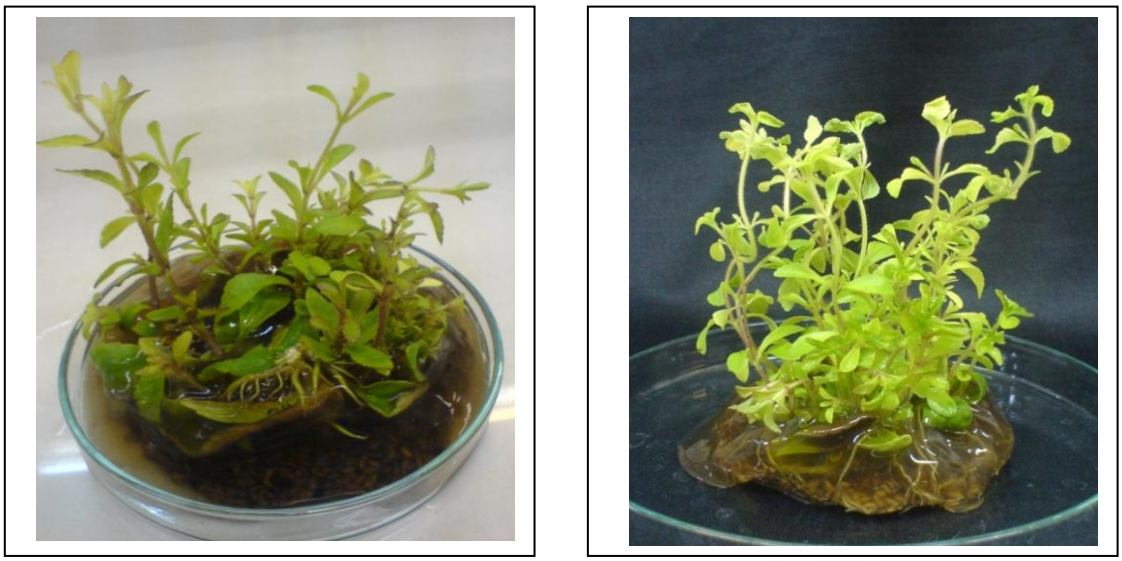


الف ب ج د

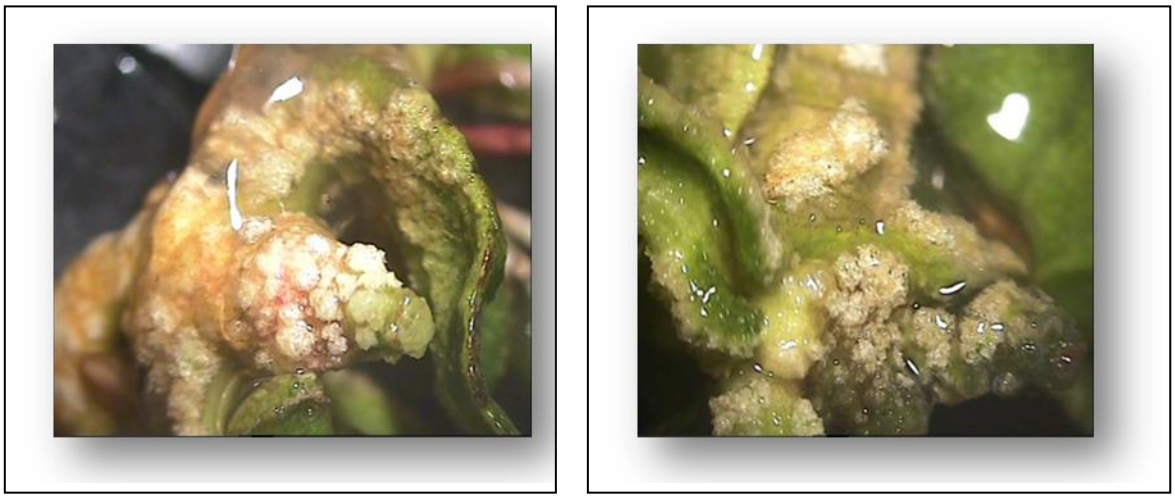
شکل ۱. مقایسه شرایط رشد ریز نمونه ها در محیط‌های ژله ایی شده توسط الف- بذرک، ب- بالنگو، ج- شاهی، د-اسفرزه.

www.SID.ir

Archive of SID



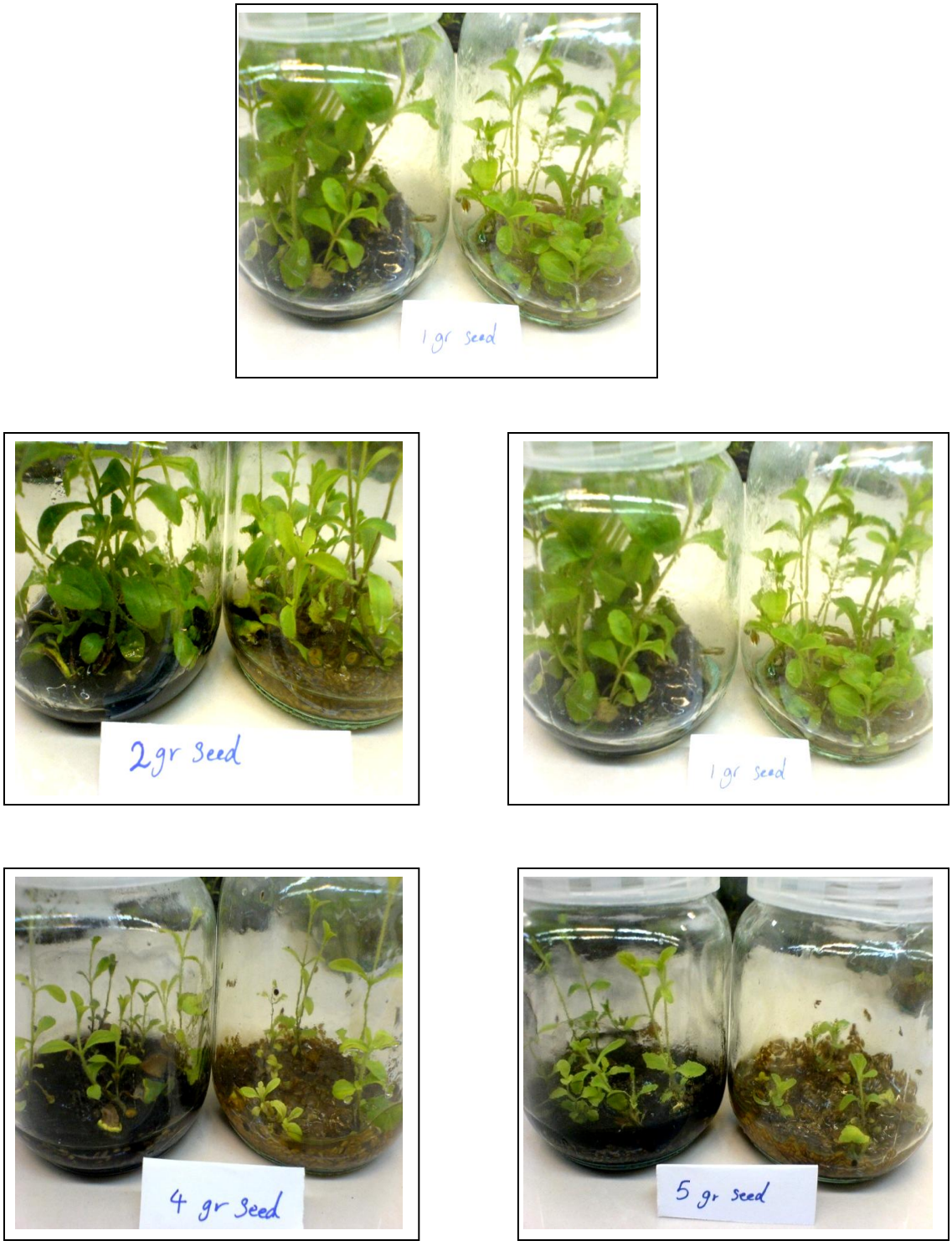
شکل۲. ریزنمونه های استویا که در بسترهای ژله ایی شده با کمک بذور اسفرزه رشد یافته اند



شکل ۳. تصویر میکروسکوپی از کالوس های رشد یافته روی ریزنمونه های استویا

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۴. ریزنمونه های استویا که در بسترهای ژله ایی شده به کمک مقادیر مختلف بذور اسفرزه، با حضور و عدم حضور زغال فعال، رشد یافته اند.

www.SID.ir

Archive of SID

۴. منابع

پیری، خ. و نظریان فیروز آبادی، ف. ۱۳۸۰. راهنمای کشت بافت گیاهی، انتشارات دانشگاه بوعلی سینا.

خزاعی، ح.، ثابت تیموری، م. و نجفی، ف. ۱۳۸۶. بررسی اثر رژیم-های مختلف آبیاری و میزان کاشت بذر بر عملکرد، اجزای عملکرد و کیفیت گیاه دارویی اسفرزه (*Plantago ovata* L.). *مجله پژوهش‌های زراعی ایران*، جلد5 : ۷۷.

فکری، ن.و.، خیامی، م.، حیدری، ر. و جوادی، م. ۱۳۸۷. جداسازی و شناسایی مونوساکاریدهای موجود در موسیلاژ بالنگوی سیاه به روش کروماتوگرافی لایه نازک. *فصل‌نامه تحقیقات گیاهان دارویی و معطر ایران*، ۴۰ : ۲۰۷-۲۱۶.

شمس، ع. ۱۳۸۸. تأثیر مقادیر مختلف کود فسفره بر عملکرد کمی و کیفی گیاه آویشن دنایی. پایان نامه کارشناسی ارشد زراعت. پردیش ابوریحان. دانشگاه تهران

نجفی، ف. و رضوانی مقدم، پ. ۱۳۸۰. اثر دور آبیاری بر عملکرد و اجزای عملکرد اسفرزه. پایان نامه کارشناسی ارشد زراعت، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد.

گلوی، م.، رمرودی، م. و منصوری، س. ۱۳۸۶. بررسی تأثیر تاریخ کاشت بر عملکرد، اجزای عملکرد و کیفیت گیاه دارویی اسفرزه در منطقه سیستان. *پژوهش و سازندگی در منابع طبیعی*، ۷۷: ۱۳۶-۱۴۰.

Chadho, K. L. and Rajender G. 1995. Advances in horticulture medicinal and aromatic plants. Vol. II. Maldorta. Pub. New Delhi. 69.

Kalayasundram, N. K., Pateb, P. B. and Dalat, K.C. 1982. Nitrogen need of *Plantago ovata* in reaction to the available nitrogen in soil. *Indian journal of Agricultural Science*, 52: 240 -242.

McHugh, D. 2001. A guide to the seaweed industry. FAO fisheries technical paper 441, FAO publication.

Montagne, J.F.C., 1837 Centurie de plantes cellulaires exotiques nouvelles. *Annales des Sciences Naturelles. (a) Botanique*,)(2e Ser.) 8: 345-370.

Scholten, H. Pierik, R. L. M. 1998. Agar as, a gelling agent: differential biological effects in vitro. *Scientia Horticulturae*, 77, Issues 1-2: 109-116.

Yamasaki, H. and Osuga, G. 1960. Studies on the propagation of Gelidiaceus algae on the ratio of cystocarposporophyte to tetrasporophyte in *Gelidium mansii* on the artificial, stone bed. Bull. *The Japanese Society of Fish*, 26: 9-12.

www.SID.ir