داروهای گیاهی، سال چهارم، شماره ۱/ (بهار، ۱۳۹۲) صفحه ۴۳ تا ۴۸

فصل‌نامه داروهای گیاهی

journal homepage: www.jhd.iaushk.ac.ir

ریز ازدیادی (کشت درون شیشه) کلیماتیس (*Clematis orientalis* L.)

علی ایزدی صادق آبادی*[۱]، احمد خلیقی[۱]، عبدالله قاسمی پیربلوطی[۲]، مرضیه تقی پوردهکردی[۳]

۱. گروه علوم باغبانی، ، دانشکده کشاورزی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات تهران، ایران؛

* مسئول مکاتبات (Email: Aliizadisa@yahoo.com)

۲. گروه گیاهان دارویی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد شهرکرد، ایران؛

۳. گروه زیست شناسی گیاهی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات فارس، ایران؛

شناسه مقاله

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۲/۰۱/۲۰

تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۲/۰۳/۱۹

نوع مقاله: علمی - پژوهشی

موضوع: بیوتکنولوژی

کلید واژگان:

- ✓ *کلیماتیس*
- ✓ *تنظیم کننده های رشد*
- ✓ *ریز ازدیادی*

چکیده

مقدمه و هدف: کلیماتیس از گیاهان زینتی و دارویی است که تکثیر و ازدیاد آن از اهمیت زیادی برخوردار است. در این پژوهش اثر تنظیم‌کننده های رشد بر ریشه زایی و رشد گیاه در شرایط کشت درون شیشه‌ای بررسی گردید.

روش تحقیق: به منظور بررسی ریز ازدیادی کلیماتیس تأثیر هورمون‌های NAA (نفتالین استیک اسید) در غلظت‌های (۰، ۰/۴، ۰/۵ و ۰/۶ میلی‌گرم در لیتر) و IBA (ایندول بوتیریک اسید) در غلظت‌های (۰، ۰/۴، ۰/۵ و ۰/۶ میلی‌گرم در لیتر) با استفاده از کشت ریز نمونه های جانبی و انتهایی در شرایط درون شیشه‌ای حاوی محیط کشت پایه موراشیگی و اسکوگ (MS) بررسی گردید.

نتایج و بحث: نتایج نشان داد که غلظت‌های مختلف اکسین بر رشد گیاهچه‌های درون شیشه معنی‌دار بود؛ به طوری که بیشترین درصد ریشه زایی و تعداد شاخه در گیاه شاهد مشاهده شده است. نتایج به دست آمده نشان داد که با اضافه نمودن هورمون به محیط کشت، ریشه زایی کاهش یافت. بیشترین کاهش با اضافه نمودن ۰/۶ میلی گرم در لیتر هورمون NAA به محیط کشت MS مشاهده گردید. هم‌چنین استفاده از ریز نمونه های جانبی بر تعداد شاخه گیاه تأثیر معنی داری داشت و موجب افزایش تعداد شاخه گیاه گردید.

توصیه کاربردی/ صنعتی: نتایج این تحقیق تاثیر مثبت ریز نمونه های جانبی و محیط کشت بدون هورمون را در افزایش ریزازدیادی کلیماتیس نشان داد.

۱. مقدمه

کلیماتیس یک گیاه دارویی و زینتی از خانواده آلاله یا Ranunculaceae است که از جنبه های زینتی و دارویی ارزش خاصی دارد (Khalighi, 2000). کلیماتیس دارای زیباترین گل‌های موجود در جهان بوده و به علت دارا بودن گل‌های فراوان و زیبا پوشش مناسب برای پرچین ها و حاشیه ها است (Khalighi, 2000). کلماتیس با حدود ۳۰۰ گونه و چندین هزار رقم، در همه مناطق دنیا از آمریکا، استرالیا، آفریقا، هند، اروپا، چین، ژاپن، سیبری، مغولستان و ایران پراکنده است. گل‌ها ممکن است تکی یا خوشه ای و برگ ها به صورت مرکب دیده می‌شوند (Roh &

(Song, 1997). اغلب گل‌ها هرمافرودیت هستند (Loomey & Leeds, 2001).

از مهمترین خواص دارویی این گیاه می توان به خاصیت ضد عفونی کننده، تب بر و درمان سر درد، درمان جای زخم ناشی از گاز گرفتگی، مدر و درمان دردهای مفصل اشاره نمود. از مهمترین ترکیبات استخراج و شناسایی شده از عصاره اندام هوایی این گیاه می توان ساپونین های مختلف را نام برد (Ghasemi Pirbalouti, 2008; Zhang *et al*., 2013).

در کشت درون شیشه ای گیاهان عالی، تنظیم کننده های رشد، مخصوصاً اکسین ها مهم هستند. غلظت‌های مناسبی از هورمون‌های اکسین مثل ایندول استیک اسید (IAA) و یا نفتالین استیک اسید (NAA)، ریشه‌زائی در گیاهان را تحریک می‌کنند (Taiz & Zeiger, 2006). در چگونگی تصمیم در مورد اضافه کردن هورمون اکسین و یا سیتوکینین به محیط کشت جهت رشد و یا تقسیم سلولی، بستگی به نوع قلمه و گونه گیاهی دارد. به عنوان مثال قلمه هایی که خودشان اکسین کافی تولید می کنند، به اکسین اضافی برای رشد یا تقسیم سلولی نیاز ندارند (Baghaeri & Safari, 2009). کرین و هم‌کاران (Kreena *et al*., 2002) به منظور ریز ازدیادی ارقام مختلف کلماتیس آزمایشی را طراحی و اجرا کردند که در آن از دو نوع ریز نمونه ریز شاخه (micro-shoot) و قلمه چوب نرم پنج رقم کلماتیس استفاده شد. در این آزمایش به منظور ریشه زایی بهتر از ۰/۵ میلی گرم در لیتر ایندول بوتیریک اسید استفاده شد. نتایج این آزمایش نشان داد که از نظر نمونه گیاهی تفاوتی در تشکیل ریشه مشاهده نشد و وزن خشک گیاه افزایش یافت.

جنین زایی رویشی موفق تنها در دو گونه *C. integrifolia* x *C. viticella* گزارش شده است (Mandegaran & Sieber, 2000). نتایج تحقیقات نشان می دهد در صورتی‌که مصرف هورمون در هنگام ریشه زایی بیش از حد نیاز باشد علاوه بر افزایش هزینه، سبب بر هم زدن تعادل هورمونی در گیاه می شود. بنابراین اهمیت تعیین بهترین غلظت هورمون، برای تکثیر گونه های درختی کاملا مشخص است. همچنین توانایی قلمه ها برای ریشه زایی به محتوای اکسین، ترکیبات فنولیک و آنزیمهای آنها بستگی دارد (Jafari & Bozari, 2010). اکسین در ریشه ها و ساقه ها از لحاظ کیفی به یک نحو عمل نمی کند. اما غلظت مطلوب در ریشه ها خیلی پایین تر است. شاخه ها اکسین را به ریشه منتقل می کنند. اکسین در غلظت های کم سبب تحریک رشد ریشه و در غلظت های بالا از رشد ریشه جلوگیری می کند. هم‌چنین اکسین ظهور ژن های ویژه ای را در ژنوتیپ های مختلف تنظیم می‌کند (Taize & Ziger, 2006).

روش‌های مختلف ازدیاد برای انواع کلماتیس ذکر شده است. اما روش مناسب برای افزایش هر کلماتیس الزاماً با سایر کلماتیس‌ها یکسان نیست. ضمن این‌که هیچ منبع مطمئن که بیان کند از ارقام بومی ایران در ازدیاد کلماتیس استفاده شده است یافت نشد. این تحقیق به منظور بررسی اثر تنظیم کننده های رشد بر ریشه زایی و تعیین محیط کشت مناسب جهت ازدیاد گیاه بسیار ارزشمند کلیماتیس بومی ایران در شرایط کشت درون شیشه ای انجام گرفت.

۲. مواد و روش‌ها

۲-۱. روش کار

این تحقیق در مرکز تحقیقات کشاورزی شهرکرد در سال ۱۳۹۰ انجام شد. در ابتدا قلمه‌ها در گلدان‌های سفالی با قطر ۲۰ سانتی‌متر حاوی خاک مناسب در شرایط گلخانه کشت داده شد. برای تهیه ریزنمونه از قسمت‌های رأسی و جانبی گیاهچه‌ها (قلمه‌های رشد یافته) استفاده گردید. جهت ضدعفونی‌کردن ریز نمونه‌ها از غلظت‌های مختلف (۱٪، ۲٪، ۳٪، ۴٪ و ۵٪) هیپوکلریت سدیم در زمان‌های ۵، ۱۰، ۱۵ و ۲۰ دقیقه برای تعیین بهترین غلظت جهت ضد عفونی ریز نمونه ها استفاده گردید. جهت ریزازدیادی قطعات جدا کشت از محیط کشت پایه MS (Murashige & Skoog, 1996) استفاده گردید. پس از ضد عفونی‌کردن ریزنمونه‌ها و شستشو با آب مقطر استریل در زیر هود لامینار، ریزنمونه‌ها در درون ظرف شیشه‌ای مخصوص کشت حاوی ۳۰ میلی‌لیتر محیط کشت MS به اضافه غلظت‌های مختلف تنظیم کننده‌های رشد کشت شدند. ریزنمونه‌های مورد استفاده به ابعاد ۱ تا ۱/۵سانتی‌متر و به صورت قطعات تک گره (جوانه جانبی) همراه با قسمتی از ساقه کشت گردید.

پس از چندین واکشت ریز نمونه ها در محیط محیط کشت MS حاوی هورمون‌های NAA (نفتالین استیک اسید) در غلظت‌های (۰، ۰/۴، ۰/۵ و ۰/۶ میلی‌گرم در لیتر) و IBA (ایندول بوتیریک اسید) در غلظت‌های (۰، ۰/۴، ۰/۵ و ۰/۶ میلی‌گرم در لیتر) با استفاده از ریز نمونه های جانبی و انتهایی در شرایط درون شیشه‌ای کشت داده شد.

آزمایش در هر مورد به صورت فاکتوریل در قالب طرح تصادفی با سه تکرار انجام شد. در تمام شرایط غلظت ساکارز مورد استفاده معادل ۳۰ گرم در لیتر و غلظت آگار مورد استفاده معادل ۷/۵ گرم در لیتر بود. pH محیط کشت در هر مورد کشت معادل ۵/۸ تنظیم گردید. برای جلوگیری از آلودگی و خشک شدن محیط کشت، پیرامون ظروف شیشه‌ای با استفاده از پارافیلم پوشانده شد. ظروف شیشه‌ای مخصوص کشت حاوی ریزنمونه‌ها، جهت رشد تحت شرایط دوره نوری ۱۶ ساعت روشنایی، ۸ ساعت تاریکی و دمای ۲۵±۳ درجه سانتی‌گراد در اطاقک رشد قرار گرفت. ریشه‌زایی ریزنمونه‌ها پس از مدت ۳۵ روز انجام گرفت و پارامترهای طول ریشه، تعداد ریشه، درصد ریشه زایی و تعداد شاخه) در نمونه‌هائی که در شیشه‌های مخصوص کشت به طور کامل رشد کرده بودند، اندازه‌گیری گردید. هم‌چنین گیاهک‌های به دست آمده از محیط کشت درون شیشه‌ای به گلدان‌های کوچک (محتوی پیت، شن و خاک) منتقل گردید و در شرایط گلخانه‌ای جهت رشد قرار داده شدند و میزان بقای آن‌ها مورد بررسی قرار گرفت.

۲-۲. تجزیه و تحلیل آماری

داده‌ها با استفاده از برنامه آماری SPSS نسخه ۱۷ مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت و برای مقایسه میانگین‌ها از آزمون دانکن در سطح ۵ ٪= α استفاده شد. در نهایت نمودارها در محیط $Excel_{2007}$ رسم گردیدند.

۳. نتایج و بحث

۳-۱. درصد آلودگی

نتایج تحقیق حاضر نشان داد که کمترین میزان آلودگی برای ریزنمونه‌های ضدعفونی‌شده با هیپوکلریت سدیم ۳ درصد در زمان ۱۵ دقیقه بود که به عنوان بهترین غلظت روش ضد عفونی انتخاب گردید.

۳-۲. اثر نوع ریز نمونه بر پارامترهای رشد

از دو نوع ریز نمونه جانبی و انتهایی برای افزایش درون شیشه ای کلماتیس استفاده شد. نتایج به دست آمده نشان داد اثر نوع ریز نمونه بر تعداد شاخه گیاهان تحت تیمار معنی دار بوده است ($p<۰/۰۱$). نوع ریز نمونه بر جمع تعداد شاخه ها اثر معنی داری داشت و ریز نمونه جانبی تعداد شاخه بیشتری تولید نموده است (نمودار ۱).

۳-۳. اثر هورمون IBA و NAA بر در صد ریشه زایی

تیمارهای مختلف IBA بر درصد نمونه های ریشه دار شده اثرات معنی داری داشت. بیشترین درصد نمونه ریشه دار شده در تیمار شاهد بود. بعد از آن ایندول بوتیریک اسید ۰/۴ میلی گرم در لیتر بیشترین نمونه ریشه دار شده را تولید کرده، درصد نمونه های ریشه دار شده در نمونه های تیمار شده با ایندول بوتیریک اسید ۰/۶ میلی گرم در لیتر و نفتالین استیک اسید ۰/۶ میلی گرم در لیتر تفاوت معنی داری در تعداد نمونه ریشه دار شده مشاهده نگردید و از سایر تیمارها کمتر بود (نمودار ۲).

۳-۳. اثر هورمون IBA و NAA بر تعداد ریشه

بیشترین تعداد ریشه در تیمار شاهد و ایندول بوتیریک اسید ۰/۴ میلی گرم در لیتر مشاهده گردید. بعد از آن بیشترین تعداد ریشه مربوط به تیمارهای ایندول بوتیریک اسید ۰/۵ میلی گرم در لیتر و NAA با غلظت ۰/۴ میلی گرم در لیتر بود که با یکدیگر تفاوت معنی داری نداشتند. کمترین تعداد ریشه در تیمار ایندول بوتیریک اسید ۰/۶ میلی گرم در لیتر و نفتالین استیک اسید ۰/۵ میلی گرم در لیتر بوده است (نمودار ۳).

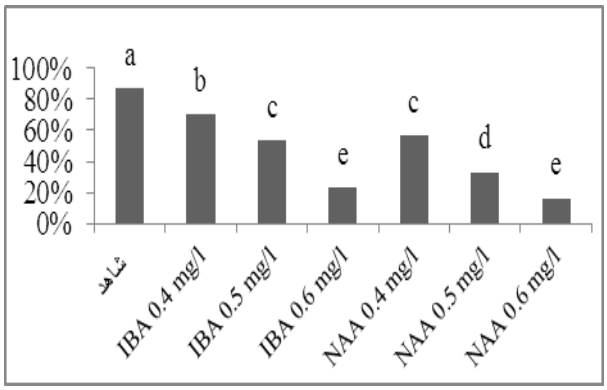
۳-۴. اثر هورمون IBA و NAA بر طول ریشه

از دیگر صفات اندازه گیری شده در این آزمایش طول ریشه بود. به طور مشابه بیشترین طول ریشه مربوط به شاهد بود. پس از آن طول ریشه به طور معنی‌داری کاهش یافت به طوری که در تیمار NAA با غلظت ۰/۶ میلی گرم کمترین مقدار طول ریشه مشاهده گردید (نمودار ۴).

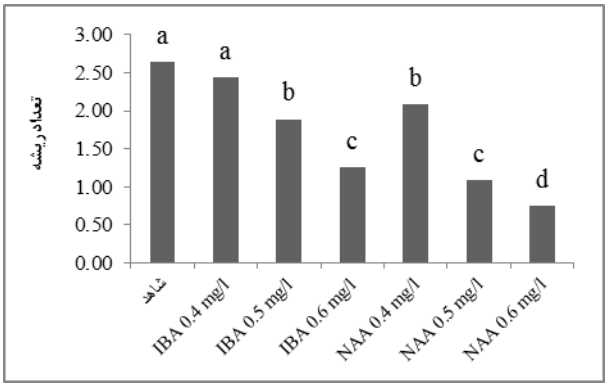
۳-۵. *اثر هورمون IBA و NAA بر تعداد شاخه*

در بررسی اثر تیمارهای مختلف اکسین بر تعداد شاخه نیز تفاوت معنی داری بین اثرات تیمارهای مختلف وجود داشت. به نحوی که بیشترین تعداد شاخه در تیمار شاهد مشاهده گردید. بعد از آن تیمار ایندول بوتیریک اسید ۰/۴ میلی گرم در لیتر بیشترین تعداد شاخه را تولید کرد و مقادیر آن تفاوت معنی داری با سایر تیمارها داشت. کمترین تعداد شاخه در تیمارهای ایندول بوتیریک اسید ۰/۶ میلی گرم در لیتر و NAA با غلظت ۰/۶ میلی گرم در لیتر دیده شد (نمودار ۵).

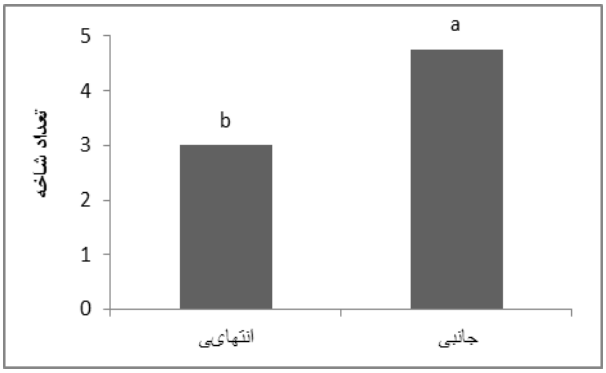
در این آزمایش از دو نوع ریز نمونه (انتهایی و جانبی) به منظور بررسی عوامل تعیین کننده تشکیل ریشه در شرایط درون شیشه‌ای استفاده شده است. در این آزمایش تفاوت معنی داری بین اثرات دو نوع ریز نمونه بر درصد نمونه ریشه دار شده، تعداد ریشه و طول ریشه نداشته است. این در حالی است که اثر نوع ریز نمونه بر تعداد شاخه گیاهان مورد بررسی معنی دار بوده است. در بیان عوامل گیاهی موثر بر ریشه دهی ریز نمونه ها علاوه بر جنس و گونه، به مواردی نظیر سن گیاه (تشکیل ریشه در گیاهان جوان ساده تر است)، مرحله رشدی گیاه (گیاهان در مراحل رشد رویشی ریشه دهی بهتری نسبت به زمانی که در مرحله زایشی قرار داشته باشند دارند)، موقعیت نمونه روی گیاه (اثر توپوفیزیکی هر قطعه از اندام خاص گیاه)، تقریباً ظرفیت باززایی یکسان برخوردار است مگر در مواردی که سن نمونه متفاوت باشد) و اندازه نمونه (گاهی نمونه های بزرگتر شاید به علت داشتن مواد غذایی بیشتر راحت تر ریشه می دهند)، می توان اشاره کرد (Baghaeri & Safari, 2009).



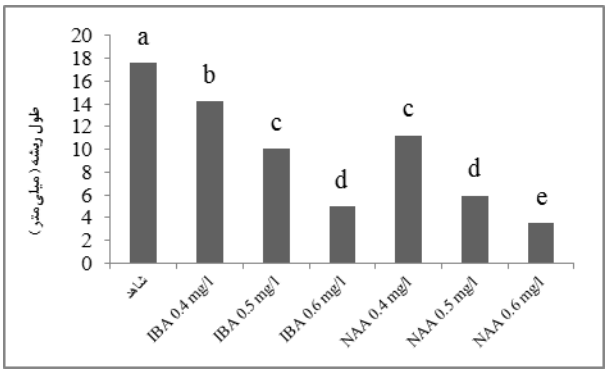
نمودار۲. اثر هورمون IBA و NAA بر درصد ریز نمونه های ریشه دار شده کلیماتیس در شرایط کشت درون شیشه



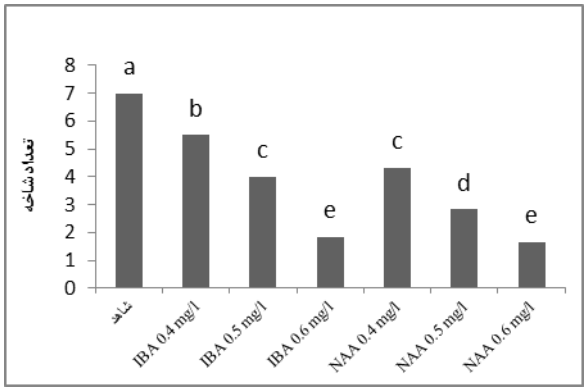
نمودار۳. اثر هورمون IBA و NAA بر تعداد ریشه کلیماتیس



نمودار۱. اثر نوع ریز نمونه بر تعداد شاخه کلیماتیس در شرایط کشت درون شیشه



نمودار۴. اثر هورمون IBA و NAA بر طول ریشه کلیماتیس



نمودار۵. اثر هورمون IBA و NAA بر تعداد شاخه کلیماتیس

از آنجایی که در این آزمایش در مرحله اول از نمونه های بذری تازه رشد کرده (سن فیزیولوژیکی پایین) استفاده شده و در مرحله دوم نیز از ساقه های رشد کرده در شرایط درون شیشه ای، و نمونه های جانبی بلافاصله بعد از جداکردن ریز نمونه های انتهایی گرفته شد، پس فاصله زیادی بین محل قرار گرفتن قلمه های جانبی و قلمه های انتهایی وجود نداشته بنابراین از لحاظ سن فیزیولوژیکی تفاوت چندانی بین ریز نمونه ها وجود نداشته است. گیاهانی که ریز نمونه ها از آن‌ها تهیه شدند همگی در مرحله رشد رویشی قرار داشتند و همه قلمه ها از ساقه های در حال رشد سریع گرفته شده و تقریباً یک اندازه بودند، بنابراین هیچ یک از موارد فوق تفاوت چندانی نداشته و در نتیجه اثری آن چنان که تفاوت معنی داری بین نتایج مشاهده شود، نداشته اند.

از بین صفات اندازه گیری شده صرفا تعداد شاخه تفاوت معنی داری داشت که دلیل آن بر اثر وجود تعداد جوانه بیشتر (حداقل دو برابر) در نمونه های جانبی بوده است. لذا از هر دو نوع ریز نمونه (انتهایی و جانبی) به راحتی می توان در تکثیر درون شیشه ای کلماتیس بومی استفاده کرد. موضوعی که باید مد نظر داشت این‌که در مرحله اصلی آزمایش هدف ریشه دار کردن ریز نمونه هاست، وجود جوانه بیشتر باعث تولید شاخه بیشتر و بروز محدودیت فضا و اثر مخرب آن بر ریز نمونه ها می شود. از سوی دیگر تهیه ریز نمونه انتهایی سخت تر است زیرا از هر ساقه تنها یک ریز نمونه انتهایی می توان تهیه کرد و این در حالی است که به تعداد خیلی بیشتری می توان ریز نمونه جانبی تهیه کرد. بنابراین با استفاده از ظروف کشت بزرگ تر مشکل یاد شده مرتفع می گردد.

شکل ۱. مقایسه اثر تیمارهای هورمونی بر رشد گیاه کلیماتیس در شرایط کشت درون شیشه (شکل سمت راست گیاه رشد یافته در شرایط فاقد هورمون و شکل وسط و آخر گیاه رشد یافته در تیمار ۰/۵ میلی گرم در لیتر NAA و IBA).

در این آزمایش از تیمار اکسین استفاده شد. کاربرد اکسین تمام صفات اندازه گیری شده (درصد نمونه های ریشه دارشده ، تعداد ریشه در هر ریز نمونه، طول ریشه، تعداد شاخه و طول شاخه) را نسبت به شاهد به طور معنی داری کاهش داده است. همچنین افزایش غلظت اکسین باعث کاهش معنی دار صفات اندازه گیری شده است و این کاهش با افزایش غلظت اکسین به کار رفته نیز مرتبط است به نحوی‌که با افزایش غلظت هورمون ریشه زایی کاهش یافته است. در بیان اثر اکسین در ریشه دار شدن ریز نمونه های کشت شده در شرایط درون شیشه ای آمده است که اکسین در غلظت کم باعث تشکیل ریشه های نابجا شده در حالی که در غلظت زیاد ، تشکیل ریشه صورت نمی‌گیرد و تشکیل کالوس اتفاق می‌افتد (Tabatabaei & Omidi, 2009). که با نتایج حاضر در این تحقیق مطابقت دارد. به نظر می‌رسد غلظت اکسین‌های به کار رفته در این آزمایش بالا بوده و همین موضوع باعث شده که درصد نمونه های ریشه دار شده و به تبع آن سایر صفات اندازه گیری شده کاهش یابد. در عمل نیز توده های بزرگ کالوس در انتهای ریز نمونه ها مشاهده شد و حتی در برخی شیشه‌ها و برخی نمونه ها علی رغم این‌که تیماری به منظور اندام زایی، اعمال نشده بود، ساقه های نابجا از بین توده های کالوس شروع به رشد کرد.

در بررسی اثرات متقابل نوع ریز نمونه و اکسین حالت هایی که تأثیرات خاص (سینرژیست یا آنتاگونیستی) این دو عامل مشخص باشد مشاهده نشد و تمام اعداد جمع جبری اعداد مورد استفاده در بررسی تک تک عوامل بود. بنابراین می توان گفت اثر اکسین در هر دو نوع ریز نمونه برابر بوده و اثر ریز نمونه هم در تمام تیمارهای اکسین شبیه بوده است.

۴. نتیجه گیری

با توجه به نتایج تحقیق محیط کشت MS حاوی غلظت بسیار اندک هورمون اکسین و استفاده از ریز نمونه های جانبی جهت ریز ازدیادی کلیماتیس توصیه می گردد.

۵. منابع

Bagheri, A.R. and Safari, M. 2009. *Introduction of plant tissue culture*. Mashhad Ferdowsi Publisher, Mashhad, Iran, pp. 406.

Ghasemi Pirbalouti, A., 2010. *Iranian medicinal plants (introduction and application)*. 3rd Ed. I.A.U. Publisher, Iran, pp. 557. (in Persian).

Jafari, M. and Bouzari, N. 2010. Effect of different times of collection and hormone concentrations on rooting of hard and semi-hard wood cuttings in gisela6 cherry Rootstock3. *Seed and Plant Production Journal*., 26 (3): 343-357

Khalighi, A. 2000. *Floriculture*. Rozbahan Publisher, Tehran, Iran, pp. 392.

Kreena, S., Svensson, M., Rumpunen, K. 2002. Short communication rooting of *Clematis* microshoots and stem cuttings in different substrates. *Scientia Horticulturae*., 96: 351–357.

Mandegaran, Z. and Sieber, V. K. 2000. Somatic embrogensis in Clematis. *Plant cell tissue and organ culture*., 62(2): 163-165.

Murashige, T. and Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiology Plant*., 15: 473–497.

Roh, M. D. and Song, C. Y. 1997. Effect of temperature and photoperiod on growth and flowering of potted dwarf clematis. *Korean Society* for *Horticultural Science*., 38: 429-434.

Tabatabaei, B. and Omidi, M. 2009. *Tissue culture and plant cell*. University of Tehran Publisher, Tehran, Iran, pp. 359.

Taiz, L. and Zeiger, D. E. 2006. *Plant Physiology*. Sinauer associated Inc. 4th Edn. p690.

Toomey, M. and Leeds, E. 2001. An illustrated encyclopedia of *Clematis*. Timber Press. Portland, OR. pp.426.

Zhang, W., Yao, M. N., Tang, H. F., Tian, X. R., Wang, M. C., Ji, L. J. and Xi, M. M. 2013. Triterpenoid saponins with anti-myocardial ischemia activity from the whole plants of *Clematis tangutica*. *Planta medica*, (e First).