Displayed by FPDFSDK.DLL. For Evaluation Only.
Copyright (c) 2000 Foxit Software Company.

ششمین همایش ملی بیوتکنولوژی جمهوری اسلامی ایران
۲۴-۲۲ مردادماه ۱۳۸۸، سالن همایشهای برج میلاد
The 6th National Biotechnology Congress of Iran
13-15 Aug, 2009, Milad Tower Conference Hall, Tehran-Iran

کاربرد تیمارهای مختلف ضدعفونی سطحی و چینه سرمایی بر جوانه‌زنی بذر گیاه دارویی Levisticum officinaleKoch. در شرایط In vitro

خطیب زاده راحله*، عزیزی مجید، آرویی حسین، خداشناس منصوره**

دانشجوی کارشناسی ارشد باغبانی دانشگاه فردوسی مشهد
دانشیار گروه باغبانی دانشکده کشاورزی دانشگاه فردوسی مشهد
استادیار گروه باغبانی دانشکده کشاورزی دانشگاه فردوسی مشهد
عضو هیأت علمی مرکز تحقیقات کشاورزی استان کرمان
پژوهشکده علوم گیاهی دانشگاه فردوسی مشهد
khatibzadeh_rahele@yahoo.com

چکیده

روش‌های بیوتکنولوژیک, امکانی برای تولید مداوم مواد مؤثره ویژه به منظور استفاده در صنایع دارویی, آرایشی و غذایی و همچنین, مجالی برای انتخاب, تکثیر و حفظ ژنوتیپ‌های مهم و نادر گیاهان دارویی فراهم نموده‌اند. تکنیک کشت بافت و باززایی در محیط درون شیشه‌ای به عنوان یکی از این ابزار توانسته است گیاهان دارویی بااهمیت را به نحو مؤثرتری در مقایسه با روش‌های سنتی ازدیاد رویشی تکثیر و حفظ نماید. انجدان رومی (Levisticum officinale Koch.) متعلق به تیره‌ی Apiaceae گونه‌ی مهم و در عین حال، فراموش شده‌ای از گیاهان دارویی بومی ایران است که دارای خواص متعدد، نظیر خاصیت مدر, ضداسپاسم و ضدنفخ بوده، یکی از ترکیبات اصلی اغلب دم‌کرده‌های دیورتیک می‌باشد. به منظور تکثیر درون شیشه‌ای و دستیابی به ماده گیاهی کافی، آزمایشی در قالب طرح کاملاً تصادفی و به صورت فاکتوریل، برای استقرار گیاهچه‌های استریل از کشت بذر ترتیب داده شد. در این بررسی اثر روش‌های مختلف ضدعفونی با هیپوکلریت سدیم و سطوح متفاوت سرمادهی بر سرعت و درصد جوانه‌زنی بذور در کشت درون شیشه‌ای مطالعه شد. کاربرد چینه سرمایی در دمای ۴ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۳ ماه بیشترین درصد جوانه‌زنی به‌میزان ۹۲ درصد و حداکثر سرعت جوانه‌زنی را در پی داشت. با بررسی نتایج، بهترین تیمار استریلیزاسیون، شستشو با اتانول ۷۰ درصد برای ۳۰ ثانیه, سپس کاربرد هیپوکلریت سدیم ۲ درصد به مدت ۱۵ دقیقه و در ادامه ۳ بار آبشویی با آب مقطر استریل تعیین شد.

واژه های کلیدی: Levisticum officinale ، گیاهان دارویی، جوانه‌زنی، ریزازدیادی

Displayed by FPDFSDK.DLL. For Evaluation Only.
Copyright (c) 2000 Foxit Software Company

مقدمه

در ارتباط با گیاهان دارویی سه مقوله یعنی انتخاب، تکثیر و حفظ ژنوتیپ‌های مهم از اهمیت ویژه‌ای برخوردار می‌باشند و بیوتکنولوژی به عنوان ابزاری در این راستا به کار گرفته می‌شود (۱۰). به منظور بهنژادی، گیاه مادری که حاوی سطوح بالایی از متابولیت‌های موردنظر است انتخاب شده، کال‌زایی در آن القا می‌شود تا لاین‌های سلولی با تولید بالا به دست آیند. در حال حاضر استفاده از این تکنیک در تولید معدودی از مواد دارویی با حجم کم و قیمت بالا, از قبیل ترکیبات ضدسرطان و ضدایدز، ارزش اقتصادی بالایی را به همراه داشته است. امید می‌رود با پیشرفت علم در زمینه‌های بیوشیمی، مهندسی مسیر تولید متابولیت‌های ثانویه و مهندسی ژنتیک، این تکنولوژی به سمت تولید طیف وسیعی از مواد دارویی طبیعی به پیش رود (۲). استفاده از تکنیک کشت بافت و باززایی درون شیشه‌ای توانسته است گیاهان دارویی مهم را در حد گسترده و قابل مقایسه با روش‌های سنتی ازدیاد تکثیر نماید. روش حفاظت از طریق منجمد کردن مواد گیاهی در درجه حرارت‌های پایین[1]، فرصت بسیار خوبی را برای نگهداری گیاهان دارویی در حال انقراض فراهم آورده است (۱۰).

از سوی دیگر، سلول‌های گیاهی از نظر بیوستزی، خاصیت توتی‌پوتنسی دارند، بدین معنی که هر سلول تحت کشت تمام اطلاعات ژنتیکی گیاه والد را دارا است و این توانایی را دارد تا دامنه‌ای از مواد شیمیایی را که در گیاه والد یافت می‌شود، تولید نماید. امکان تولید تجاری متابولیت‌های ثانویه با بیوراکتورها فراهم گردیده است. برخی مزایای این روش در مقایسه با تولید از طریق کشت‌های رایج, مستقل بودن از تغییرات فصلی و جغرافیایی و فاکتورهای محیطی مختلف, امکان تولید ترکیبات جدیدی که در شرایط طبیعی در گیاه مادری وجود ندارند, هزینه کم و سرعت بالا می‌باشد. از این رو صنایع مختلف مانند صنایع دارویی، استفاده از کشت‌های بافت گیاهی و جایگزین کردن آن در بعضی موارد به جای گیاهان طبیعی را در دستور کار خود قرار داده‌اند (۲ و ۹).

انجدان رومی[2] با نام عمومی Lovage ، از تیره‌ی چتریان[3] بوته‌ای چندساله با ساقه‌ای به ارتفاع ۲۰ تا ۲۰۰ سانتی‌متر است. برگ‌ها سبز تیره، درخشان، ۲ تا ۳ بار شانه‌ای، با دمبرگ بلند و سطحی فاقد کرک و براق هستند. ریشه‌ی این گیاه، مخروطی شکل و طول آن با توجه به شرایط اقلیمی محل رویش، متفاوت و بین ۴۰ تا ۵۰ سانتی‌متر است. گیاهان از سال دوم به ساقه می‌روند (۱). این گیاه بومی منطقه‌ی ایرانی تورانی بوده، منشأ آن احتمالاً آسیای مرکزی است و پراکندگی جغرافیایی آن اروپا، ایران و افغانستان را دربرمی‌گیرد. در ایران جنوب شرق در کرمان شیب جنوبی کوه هزار ارتفاع ۳۲۰۰ متر از سطح دریا رویش دارد (۵ و ۷). انجدان رومی یکی از قدیمی‌ترین گیاهان دارویی و ادویه‌ای است. در صنعت به عنوان عطر دهنده در مواد آرایشی و همچنین در صنایع غذایی به عنوان طعم دهنده استفاده می‌شود. اثرات خلط‌آور، مسکن و ضد اسپاسم آن نشان داده شده است. در طب عامیانه، از ریشه‌ی آن برای رفع سوء هاضمه، سوزش و ورم معده و نفخ شکم استفاده می‌کنند. دم‌کرده‌ی ریشه به عنوان ماده‌ای مدر و در صنایع داروسازی، عصاره‌ی الکلی آن برای معالجه‌ی سنگ کلیه و مجاری ادراری استفاده می‌شود (۱ , ۳ و ۴).

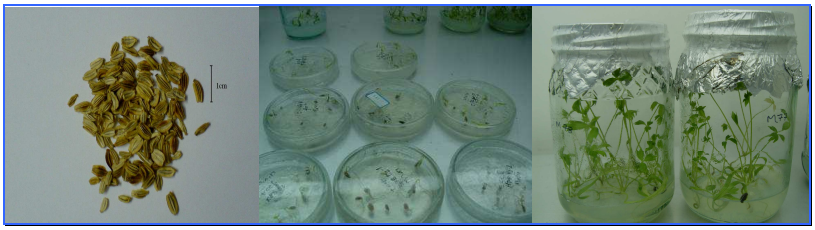
برطبق گزارش انجمن بین المللی آزمون بذر (ISTA) بذرهای این گیاه دارای خفتگی است (۶). به دلیل خشکسالی و بهره‌برداری بی‌رویه و با توجه به کاهش جمعیت و گسترش جغرافیایی محدود این گونه، لزوم حفظ ذخایر و تکثیر آن بیش از گذشته احساس می‌شود. از آنجا که تیمار سرمادهی و خیساندن بذور جهت شکست زود هنگام خواب بذر در بیشتر اعضای تیره‌ی چتریان مفید است (۵)، در پژوهش حاضر با هدف دستیابی به ماده گیاهی کافی برای کشت درون شیشه‌ای این گیاه، تأثیر تیمارهای مختلف چینه سرمایی و ضدعفونی بر جوانه‌زنی بذر و بهینه کردن استقرار گیاهان استریل، مورد مطالعه قرار گرفت.

1- Cryopreservation
2- Levisticum officinaleKoch.
3- Apiaceae

Displayed by FPDFSDK.DLL. For Evaluation Only.
Copyright (c) 2000 Foxit Software Company.

مواد و روش‌ها

در سال ۱۳۸۶ بذور رسیده‌ی انجدان رومی توده‌ی بومی کرمان، جمع‌آوری و مورد استفاده واقع شدند. به منظور رفع مشکل رکود بذر و بهبود فرآیند جوانه‌زنی و با هدف استقرار کشت استریل، آزمایشی در قالب طرح کاملاً تصادفی و به شکل فاکتوریل با ۲ فاکتور روش استریلیزاسیون و طول دوره‌ی سرمادهی مرطوب و ۵ تکرار اجرا شد. روش‌های ضدعفونی عبارت بودند از: استفاده از اتانول ۷۰ درصد به مدت ۳۰ ثانیه، سپس استفاده از هیپوکلریت سدیم (۱ و ۲ درصد به مدت ۱۰، ۱۵، ۲۰ و ۲۵ دقیقه) و آنگاه ۳ بار شستشو با آب مقطر استریل. پس از آن بذور در پتری دیش‌های حاوی محیط کشت استریل تشکیل شده از محلول ۰/۷ درصد آگار-آگار کشت گردیدند. روش‌های چینه سرمایی عبارت بودند از: ۶، ۸، ۱۰ و ۱۲ هفته سرمای ۴ درجه‌ی سانتی‌گراد. در نهایت، کشت‌ها به اتاق رشد با دمای ۲±۲۵ درجه‌ی سانتی‌گراد و شرایط نوری ۱۶ ساعت روشنایی ۴۰۰۰ لوکس و ۸ ساعت تاریکی منتقل شدند. پس از ظهور دانه‌رست‌ها، درصد جوانه‌زنی ثبت و سرعت جوانه‌زنی به روش ماگویر (۸) اندازه‌گیری شد و سپس دانه‌رست‌ها در محیط جامد MS واکشت گردیدند (شکل ۱). داده‌های حاصل با استفاده از نرم‌افزار JMP4 و Excel 2003 آنالیز شدند.



شکل ۱- کشت درون شیشه‌ای .Levisticum officinaleKoch و استقرار گیاهان استریل

نتایج و بحث

اختلاف روش‌های استریلیزاسیون و تیمارهای چینه‌سرمایی به کار برده شده و اثرات متقابل آن‌ها معنی‌دار بود ($p<0.0001$). با استفاده از آزمون LSD در سطح ۵ درصد، تیمار بهینه استریلیزاسیون، شستشو با اتانول ۷۰ درصد برای ۳۰ ثانیه و سپس کاربرد محلول ۲ درصد هیپوکلریت سدیم به مدت ۱۵ دقیقه تعیین شد. همچنین، اختلاف معنی‌داری بین سطوح مختلف ورنالیزاسیون در سطح ۵ درصد وجود داشت. استفاده از چینه سرمایی در دمای ۴ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۳ ماه (۱۲ هفته) بیشترین سرعت و درصد جوانه‌زنی (به‌طور میانگین ۹۲ درصد) را در پی داشت. این نتایج می‌تواند در هرگونه برنامه‌ریزی برای تولید و تکثیر بیشتر لحاظ گردد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان از معاونت پژوهشی دانشگاه فردوسی مشهد به‌خاطر حمایت مالی پروژه نهایت قدردانی را دارند.

Displayed by FPDFSDK.DLL. For Evaluation Only.
Copyright (c) 2000 Foxit Software Company.

منابع

۱. امیدبیگی، ر. تولید و فرآوری گیاهان دارویی. ج. ۳. تهران. به نشر. ۱۳۷۹.

۲. حبیبی خانیانی، ب.، معینی، ا. و عبدالهی، م. تولید متابولیت‌های ثانویه و مواد دارویی از طریق کشت بافت و سلول‌های گیاهی. فصلنامه گیاهان دارویی. ش. ۱۴(۱۳۸۴): ۶-۱.

۳. میرحیدری، ح. معارف گیاهی، کاربرد گیاهان در پیشگیری و درمان بیماری‌ها. ج. ۲. تهران. دفتر نشر فرهنگ اسلامی. ۱۳۷۲.

4. Bruneton, J. Pharmacognosy, phytochemistry, medicinal plants. Paris. Lavoisier publishing. 1995.
5. Duke, J. A. Ecosystematic data on medicinal plants. In: C. K. Atal and B.M. Kapur. Cultivation and utilization of medicinal plants. Jammu-Tawi, India. Regional Research Laboratory. 1982.
6. ISTA online–International Seed Testing Association. http://www.seedtest.org
7. Kroll, H. Literature on archaeological remains of cultivated plants. J. Veget. Hist. Archaeobot. Vol. 8 (1999): 129-163.
8. Maguire, J.D. Speed of germination. Aid in selection and evaluation for seedling emergence and vigor. J. Crops Sci. Vol. 2 (1962): 176–177.
9. Ramawat, K.G. and Merillon, J. M. Biotechnology; secondary metabolites. NH. USA. Science Publisher. 1999.
10. Tripathi, L. and Tripathi, J.N. Role of biotechnology in medicinal plants. Tropic. J. Pharma. Res. Vol. 2, No. 2 (2003): 243-253.

Effects of sterilization protocol and pre-chilling treatment on In vitro seed germination of Levisticum officinale Koch.

Khatibzadeh R.* Azizi M. Aroee H. Khodashenas M.**
Master student of Horticulture, Ferdowsi Univ.
Associate professor of Horticulture Dep., Faculty of Agriculture, Ferdowsi Univ.
Assistant professor of Horticulture Dep., Faculty of Agriculture, Ferdowsi Univ.
Faculty member of Agricultural Research Centre, Kerman Province
khatibzadeh_rahele@yahoo.com

Abstract
The biotechnological tools offer an opportunity for ongoing production of selected phytochemicals for application in pharmaceutical, cosmetic or food industries. They are also important to select, multiply and conserve the critical genotypes of endangered medicinal plants. To protect and multiply the medicinal plant resources, tissue culture and In vitro regeneration can be applied to serve as a more efficient alternative to traditional propagation approaches. Levisticum officinale Koch., a member of Apiaceae family, is a rare and endangered species in Iran. It has been shown to have diuretic, spasmolytic and carminative effect and is used as a principal ingredient in many diuretic tea mixtures. Our experiments dealt with an efficient protocol for In vitro seed germination and micropropagation of this herb in order to supply enough plant materials. The experiment was a factorial laid out in a completely randomized design. It was conclusive that pre-chilling treatment for 3 months was necessary to enhance the rate of seedling emerging and number of seedlings, whereby the maximum percent of germination (92%) was obtained. The best superficial sterilization protocol was proofed to be soaking in 70% (v:v) ethanol for 30 s and then, using of 2% (v:v) dilution of NaOCl for 15 min, followed by 3 rinses in sterile distilled water.

Key words: Levisticum officinale, medicinal plants, seed germination, micropropagation