نشریه علوم باغبانی (علوم و صنایع کشاورزی)
جلد 28، شماره 3، پاییز 1393، ص. 326-319
شاپا: 4730 - 2008

Journal of Horticultural Science
Vol. 28, No. 3, Fall 2014, P. 319-326
ISSN: 2008 - 4730

بهینه‌سازی کشت درون شیشه‌ای جنین زیگوتیک گیاه نوروزک (*Salvia leriifolia* Benth.)

معصومه مدرس[1*] - مهرداد لاهوتی[2] - علی گنجعلی[3] - جواد اصیلی[4]

تاریخ دریافت: 1390/12/13
تاریخ پذیرش: 1392/02/03

چکیده

نوروزک بومی استان خراسان رضوی و سمنان و گیاهی در معرض خطر انقراض می‌باشد. باتوجه به درصد جوانه‌زنی کم بذر و رشد کند گیاهچه این گیاه در شرایط درون شیشه ای ،کشت جنین می‌تواند جهت تولید سریع گیاهچه بکار گرفته شود. هدف از این تحقیق بررسی اثر محیط کشت‌های مختلف و هورمون‌های NAA وBAP بر رشد و اندام‌زایی جنین زیگوتیک گیاه نوروزک می‌باشد. از این‌رو کشت جنین زیگوتیک، طی یک آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی شامل فاکتورهای محیط‌کشت، هورمون BAP و هورمون NAA انجام شد. درصد جوانه‌زنی جنین و صفات رشد گیاهچه‌ها در طی چهار هفته بررسی گردید. نتایج نشان داد جنین‌ها یک روز پس از قرار گرفتن در تمام محیط‌کشت‌ها شروع به جوانه‌زنی نمودند ولی محیط‌کشت‌های MS و 1/2MS نسبت به محیط B5 نتیجه بهتری در ارتباط با درصد جوانه‌زنی نشان دادند. هم‌چنین ترکیب هورمونی 1 میلی گرم بر لیتر BAP و NAA در دو محیط‌کشت مذکور به‌طور معنی‌داری در بهبود صفات رشد مؤثر بود به‌طوری‌که گیاهچه‌های حاصل نسبت به دیگر تیمارها مقاوم تر بودند و گیاهچه کامل ده روز پس ازکشت حاصل شد. براساس نتایج این تحقیق، کشت جنین در محیط‌کشت‌های MS و 1/2MSهمراه با تیمار هورمونی مذکور به عنوان بهترین گزینه برای دستیابی سریع به گیاهچه‌های قوی به منظور تکثیر گیاه و نیز کاربرد در مطالعات اصلاحی توصیه می‌شود.

واژه‌های کلیدی: بهینه‌سازی، کشت جنین، نوروزک

مقدمه

گیاه نوروزک متعلق به خانواده Lamiaceae، بومی استان خراسان رضوی و بخشی از استان سمنان است (19). بررسی‌های انجام شده روی این گیاه نشان دهندهٔ خواص دارویی آن مثل درمان و پیش‌گیری از آلزایمر (16)، ضد میکروبی (6 و 7) و آنتی‌اکسیدانی (5 و10) می‌باشد. هم‌چنین می‌توان به اثرات آرام بخشی (11) و ضد درد و التهابی (12) این گیاه اشاره کرد که کارآیی آن مشابه داروهای دیازپام و دیکلوفناک برآورد شده است.

گیاه نوروزک با وجود خواص با ارزش فراوان با محدودیت در تکثیر مواجه است. علاوه بر این برداشت بی‌رویه آن باعث شده است که این گیاه در گروه گیاهان در معرض خطر انقراض طبقه‌بندی شود (14) لذا لزوم استفاده از روش‌هایی برای کاهش دوره خواب و جوانه‌زنی بذر و تکثیر گیاه بیش‌تر احساس می‌شود. مطالعات انجام یافته بر روی بذر نشان داده است که جوانه‌زنی آن در خاک 28 درصد (1) و در صورت حذف پوشش بذر در شرایط آزمایشگاه روی کاغذ صافی مرطوب به 40 درصد می‌رسد (3).

گزارش‌های زیادی وجود دارد که نشان می‌دهد آزاد شدن جنین از پوسته و لپه‌ها در به حداقل رسیدن دوره خواب بذر و تکثیر گیاه در کوتاه مدت نقش مهمی دارد به‌عنوان مثال در گیاه *Cynara cardunculus* که دوره خواب بذر طولانی است، از کشت جنین در محیط کشت MS 1/2 برای تولید سریع‌تر گیاهچه استفاده شده است به‌طوری‌که 30 تا 45 روز پس از کشت جنین گیاهچه‌های کامل حاصل می‌شوند که این مدت 6 ماه زودتر از کشت بذر کامل است (9). هم‌چنین استفاده از هورمون‌های NAA[5] و BPA[6] و محیط‌کشت‌های MS و MS رقیق شده برای کشت جنین در گیاه *Ipomoea nil* موفقیت آمیز بوده است (22). به‌علاوه در کشت جنین گردو افزودن ترکیب مناسبی از هورمون‌های اکسین و سیتوکینین به محیط‌کشت جنین سبب بهبود صفات رشد در گیاهچه‌های حاصل از آن گردیده است (15).

طبق بررسی‌های به عمل آمده تاکنون کشت درون شیشه‌ای بذر

1- استادیار دانشگاه فرهنگیان، پردیس شهید هاشمی نژاد مشهد
(*- نویسنده مسئول: Email: m_modarres70@yahoo.com)
2و 3- استاد و انشیار گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه فردوسی مشهد
4- دانشیار فارماکوگنوزی و بیوتکنولوژی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد

5- Naphthalinacetic acid
6- 1-6- Benzylaminopurine

نوروزک گزارش نشده است. تنها پژوهش انجام شده مربوط به نحوه کشت و بررسی شرایط مختلف نوری روی کشت جنین زیگوتیک توسط نویسندگان مقاله صورت گرفت که نشان داد کشت جنین زیگوتیک، می‌تواند به‌عنوان یک روش مؤثر برای غلبه برخواب بذر استفاده شود. هم‌چنین در پژوهش مذکور مشخص شد که جوانه‌زنی جنین زمانی موفقیت‌آمیز است که اتصال جنین به لپه‌ها کاملاً قطع شده باشد. به‌علاوه گذراندن یک دوره تاریکی به مدت یک هفته برای باززایی گیاهچه ضروری است (4).

باتوجه به اهمیت دارویی، صنعتی و مرتعی این گیاه بومی و در معرض خطر انقراض، استفاده از روش‌های کشت بافت، مهندسی ژنتیک و بیوتکنولوژی برای اصلاح، حفظ ژرم پلاسم و افزایش تولید متابولیت‌های ثانویه آن ضروری به نظر می‌رسد و اولین قدم برای رسیدن به این هدف توانایی تولید انبوه و سریع گیاهچه‌هایی با بنیه مناسب می‌باشد.

از آن‌جا که روش جوانه‌زنی مستقیم جنین بدون عبور از فاز کال‌زایی از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است، در تحقیق حاضر تلاش شد با به‌کارگیری محیط‌کشت‌ها و تنظیم کننده‌های رشد مناسب کشت درون شیشه‌ای جنین زیگوتیک گیاه دارویی نوروزک بهینه‌سازی گردد تا علاوه بر تکثیر آن راه را برای تحقیقات بیوتکنولوژی این گیاه ارزشمند هموار سازد.

مواد و روش‌ها

شناسایی گونه نوروزک توسط هرباریوم دانشگاه فردوسی مشهد تأیید گردید (شماره هرباریومی: 11293) و بذرهای رسیده گیاه در خرداد ماه سال 1389از اطراف شهرستان بجستان واقع در استان خراسان رضوی جمع‌آوری شد. بذرها جهت استراتیفیکاسیون به‌مدت سه هفته در دمای 4 درجه سانتگیراد نگهداری شدند. به‌منظور دستیابی به گیاهچه‌های استریل اقدامات زیر انجام گرفت:

کشت بذر: برای کشت بذر محیط‌کشت MS به‌همراه ساکارز (30گرم بر لیتر)، گلایسین (2 میلی گرم بر لیتر) ، زغال فعال (2 گرم بر لیتر) و آگار (7 گرم بر لیتر) استفاده شد. pH محلول روی 5/8 تنظیم شد. سپس 20 میلی لیتر از محلول به ویال‌های 200 میلی گرمی منتقل و به‌مدت 20 دقیقه در دمای 121 درجه سانتگیراد و فشار 1 اتمسفر اتوکلاو شد. بذرها ابتدا به‌مدت دو ساعت در آب مقطر استریل خیسانده شدند سپس به‌مدت یک دقیقه در اتانل 70 درصد و ده دقیقه در محلول هیپوکلریت‌سدیم تجاری 3 درصد قرار گرفتند. و نهایتاً با آب مقطر استریل سه بار شستشو داده شدند.30 ویال حاوی محیط کشت تهیه و در هر ویال دو عدد بذر کشت شد. نیمی از ویال‌ها دردمای 25 درجه سانتی‌گراد و تاریکی قرار گرفت. از آن‌جا که مناسب‌ترین دمای جوانه‌زنی بذر دمای 8-4 درجه سانتگیراد گزارش شده است (2)، نیمی دیگر ویال‌ها به دمای 5-4 درجه سانتگیراد و شرایط تاریکی منتقل شدند. بعد از یک هفته تمامی ویال‌ها به شرایط فتوپریود 16 ساعت نور و 8 ساعت تاریکی و دمای 25 درجه سانتگیراد انتقال یافتند و از نظر جوانه‌زنی مورد بررسی قرار گرفتند.

کشت بذر بدون پوشش: ابتدا پوشش بذرها حذف گردید. سپس جهت استریل کردن به‌مدت 30 ثانیه در اتانل 70 درصد و 5 دقیقه در محلول هیپوکلریت سدیم تجاری 3 درصد قرار گرفتند. سپس سه مرتبه با آب مقطر استریل شسته شدند. 30 ویال حاوی محیط کشت MS به روش ذکر شده تهیه شد. در هر ویال دو بذر بدون پوشش قرار گرفت. محیط‌کشت ها یک هفته در تاریکی و دمای 25 درجه سانتگیراد و سه هفته به شرایط 16 ساعت نور و 8 ساعت تاریکی و دمای 25 درجه سانتگیراد منتقل شدند.

کشت جنین: برای کشت جنین از سه محیط‌کشت MS و 1/2MS و B5 به‌همراه ساکارز (30 گرم بر لیتر)، گلایسین (2 میلی گرم بر لیتر)، زغال فعال (2 گرم بر لیتر) و آگار (7 گرم بر لیتر) استفاده شد. به‌منظور بررسی تأثیر تنظیم کننده‌های رشد بر رشد جنین، غلظت‌های مختلف از هورمون BAP (0، 1، 2، 3 میلی گرم بر لیتر) و NAA (0، 0/5 و1 میلی گرم بر لیتر) به‌تنهایی و به‌صورت توام، به هرکدام از سه نوع محیط‌کشت اضافه شد. pH محلول‌ها روی 5/8 تنظیم شد. سپس 20 میلی لیتر از محلول به ویال‌های200 میلی لیتری منتقل شد و به‌مدت 20 دقیقه در$^{\circ}$C 121 و فشار 1 اتمسفر اتوکلاو شد. ابتدا پوشش روی بذرها حذف گردید و بذرهای بدون پوشش به روش ذکر شده در بالا استریل شدند. در مرحله بعد با استفاده از پنس و سوزن تشریح جنین چند میلی‌متری با دقت از میان دو لپه خارج شده و در سطح هریک از محیط‌کشت‌های بدون هورمون قرار داده شد. به ازای هر محیط‌کشت 12 تیمار و از هر تیمار 10 ویال و در مجموع 360 جنین به روش ذکر شده کشت و انکوبه گردید. جنین‌ها به مدت یک هفته در شرایط تاریکی و سپس سه هفته به شرایط 16 روشنایی و دمای 25-24 درجه سانتگیراد منتقل شدند. پس از گذشت 4 هفته، درصد رویان‌های رشد یافته، طول اندام هوایی، طول ریشه، تعداد برگ، وزن تر و خشک گیاهچه‌ها مورد ارزیابی قرار گرفت. آزمایش‌ها در قالب فاکتوریل و طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار و تجزیه و تحلیل داده‌ها با نرم افزارآماریJMP انجام شد. مقایسه میانگین‌ها توسط آزمون HSD (Tukey) در سطح اطمینان 95 درصد محاسبه گردید.

نتایج

کشت بذر: نتایج کشت بذر درمحیط MS نشان داد درصد جوانه‌زنی بذرهای کشت شده در 25 درجه سانتی‌گراد پس از سه هفته بسیار کم و به‌میزان 0/016 درصد بود. بذرهایی که در دمای 4 درجه

سانتی‌گراد و تاریکی قرار داشتند، پس از انتقال به شرایط نوری، بعد از سه هفته جوانه‌زنی نداشتند و لذا کشت بذر از آزمایش حذف شد.

کشت بذر بدون پوشش: نتایج حاصل از این آزمایش نشان داد که 27/2 درصد از بذرهای بدون پوشش، 6-5 روز پس از کشت شروع به ریشه‌زایی نمودند. بررسی‌های بعدی نشان داد رشد این گیاهچه‌ها بسیار کند بوده به‌طوری که پس از گذشت سه هفته تنها جوانه انتهایی و برگ‌های اولیه ظاهر شدند. 34/7 درصد از بذرهای بدون پوشش پس از باز شدن لپه‌ها متورم و سیاه شدند و 38/1 درصد از آن‌ها جوانه‌زنی نداشتند. با توجه به نتایج ضعیف این آزمایش، این نوع کشت نیز از ادامه آزمایش حذف شد.

کشت جنین: نتایج حاصل از کشت جنین نشان داد در اغلب تیمارها، ریشه‌چه پس از گذشت 24 ساعت از زمان کشت شروع به رشد نمود. قابل ذکر است که جنین در هیچ کدام از تیمارهای هورمونی کالوس تولید نکرد. از آن‌جا که تولید گیاه‌چه از جنین نسبت به کشت بذر نتیجه بسیار بهتری نشان داد، آزمایش‌های بعدی تنها روی کشت جنین متمرکز شد.

اثر محیط‌کشت بر رشد و نمو جنین

درصد جوانه‌زنی در محیط‌کشت‌های MS، MS 1/2و B5 به‌ترتیب 98/4، 97/5 و 66 درصد بود. نتایج حاصل از آنالیز داده‌ها پس از چهار هفته نشان داد صفات وزن تر، وزن خشک، طول بخش هوایی، طول ریشه و نیز درصد باززایی گیاه‌چه‌ها به‌طور معنی‌داری در محیط‌های MS و MS 1/2 بیش‌تر از محیط B5 است. اما بین دو محیط MS و MS 1/2 تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد (جدول‌های 1 و 2).

اثر تنظیم کننده‌های رشد بر رشد و نمو جنین

تجزیه و تحلیل داده‌ها نشان داد BAP در غلظت 1 میلی‌گرم بر لیتر سبب افزایش معنی‌داری در طول بخش هوایی و ریشه نسبت به شاهد گردید اما با افزایش غلظت BAP از وزن تر و خشک و طول ساقه کاسته شد. هم‌چنین هورمون NAA سبب افزایش معنی‌دار طول بخش هوایی در غلظت 0/5 میلی‌گرم بر لیتر شد ولی در غلظت‌های 0/5 و 1 میلی‌گرم بر لیتر NAA به‌طور معنی‌داری از طول ریشه کاسته شد. مقایسه میانگین تیمارهای مختلف هورمونی نشان داد بیش‌ترین طول بخش هوایی و وزن خشک در تیمار NAA 0/5 میلی گرم بر لیتر و تیمار BAP 1 میلی گرم بر لیتر+ NAA 1 میلی گرم بر لیتر به دست آمد که با دیگر تیمارها تفاوت معنی‌داری داشتند. هم‌چنین طول ریشه به‌طور معنی‌داری درتیمارهای BAP 1 میلی گرم بر لیتر+ NAA 1 میلی گرم بر لیتر (شکل 1) وBAP 1 میلی گرم بر لیتر نسبت به دیگر تیمارها بیش‌تر بود. به‌علاوه مشخص شد با افزایش غلظت سیتوکینین تا1 میلی گرم بر لیتر در تعامل با اکسین میانگین وزن خشک و طول بخش هوایی و تعداد برگ به‌طور معنی‌داری کاهش می‌یابد. از نظر کیفی در تیمارهایBAP 2 میلی گرم بر لیتر+ NAA 0/5 میلی گرم بر لیتر وBAP 2 میلی گرم بر لیتر+ NAA 1 میلی گرم بر لیتر گیاهچه‌های حاصل شیشه‌ای شده و دارای برگ‌های پیچ‌خورده بودند (جدول‌های 1 و3 و شکل‌های 2 تا 4).

جدول1- تجزیه واریانس اثر سه فاکتور محیط‌کشت، هورمون BAP و هورمون NAA بر پارامترهای رشد در کشت جنین زیگوتیک نوروزک

منابع تغییرات	درجه آزادی	طول ساقه(S.S)	طول ریشه(S.S)	وزن خشک(S.S)	وزن تر(S.S)	تعداد برگ(S.S)
BAP	3	2867/9699*	29648/324*	0/00208180*	0/1939040*	33/879630*
NAA	2	1072/1157*	30817/463*	0/00138155^{ns}	0/1634969^{ns}	17/388889^{ns}
محیط کشت	2	702/1435*	14569/019*	0/00826436*	0/8358250*	82/666667*
NAA×BAP	6	649/9398*	23955/870*	0/01103200*	1/4431547*	16/981481^{ns}
BAP×محیط‌کشت	6	1289/6898*	36600.315*	0/00200416^{ns}	0/5571068^{ns}	36/370370*
NAA×محیط‌کشت	4	2274/2130*	75060/574*	0/01518472*	2/4553820*	86/685185*
BAP×NAA×محیط‌کشت	12	644/4537*	38112/981*	0/00435991*	0/9902525*	21/611111*
خطا	72	1096/167	66539/33	0/00427835	0/134444	22/12000

ns ، ** و* به تر تیب غیر معنی‌دار، معنی‌دار در سطح احتمال 1 درصد و 5 درصد

جدول2 - مقایسهٔ میانگین پارامترهای رشد در گیاهچه‌های حاصل از جنین زیگوتیک گیاه نوروزک در محیط کشت‌های مختلف

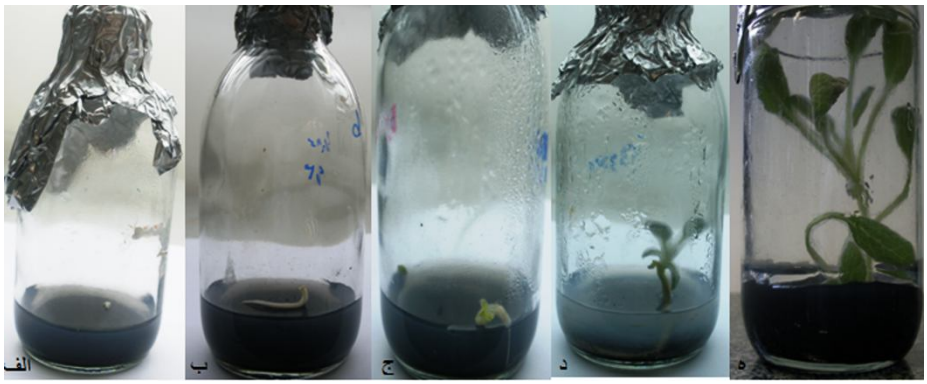
محیط کشت	وزن تر (گرم)	وزن خشک (گرم)	طول ساقه (میلی متر)	طول ریشه (میلی متر)	تعداد برگ
MS	0/412[a]	0/037[a]	17/79[a]	105/5[a]	4/75[a]
1/2MS	0/310[a]	0/029[a]	15/97[a]	89/69[ab]	3/75[a]
B5	0/196[b]	0/015[b]	11/55[b]	77/10[b]	3/08[a]

حروف یکسان بیانگر عدم تفاوت معنی‌دار با استفاده از آزمون توکی در سطح احتمال 5 درصد می‌باشد.

جدول3- مقایسهٔ میانگین پارامترهای رشد در گیاهچه‌های حاصل از جنین زیگوتیک گیاه نوروزک تحت تأثیر ترکیب‌های مختلف هورمون‌های BAP و NAA

هورمون ها	وزن تر (گرم)	وزن خشک (گرم)	طول ساقه (میلی متر)	طول ریشه (میلی متر)	تعداد برگ
BAP0,NAA0	0/029[b]	0/294[b]	19/44[b]	96/33[b]	30/80[a]
BAP0,NAA0.5	0/047[a]	0/636[a]	30/77[a]	19/88[c]	3/45[a]
BAP0,NAA1	0/017[b]	0/191[bc]	22/44[b]	15[c]	3/67[a]
BAP1,NAA0	0/031[b]	0/317[b]	28/66[a]	160/22[a]	3/12[a]
BAP1,NAA0.5	0/017[b]	0/194[bc]	21/89[b]	89/33[b]	3/56[a]
BAP1,NAA1	0/044[b]	0/422[a]	31/33[a]	128/56[a]	4/56[a]
BAP2,NAA0	0/022[b]	0/30[bc]	11/83[c]	99[b]	4/21[a]
BAP2,NAA0.5	0/012[b]	0/208[c]	12/55[c]	63/34[bc]	3[ab]
BAP2,NAA1	0/026[b]	0/182[bc]	15/55[bc]	88[b]	4/12[a]
BAP3,NAA0	0/012[b]	0/256[c]	8/88[c]	66/32[bc]	2/34[b]
BAP3,NAA0.5	0/013[b]	0/226[c]	5/45[c]	58/88[bc]	2/35[b]
BAP3,NAA1	0/016[b]	0/195[c]	9/45[c]	115/34[b]	3/13[ab]

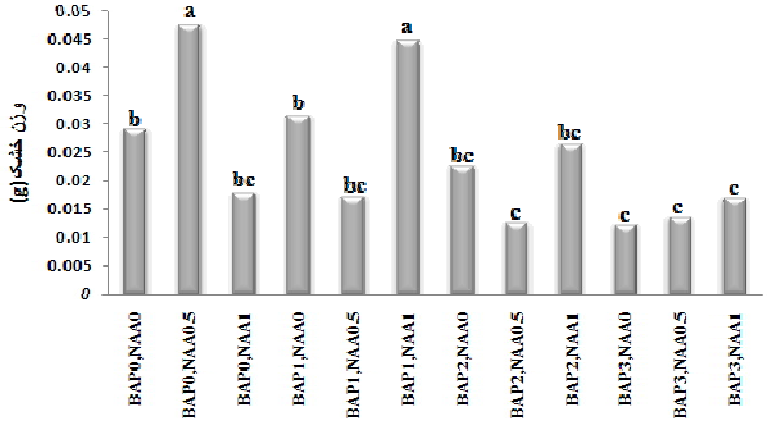
حروف یکسان بیانگر عدم تفاوت معنی‌دار با استفاده از آزمون توکی در سطح احتمال 5 درصد می‌باشد.



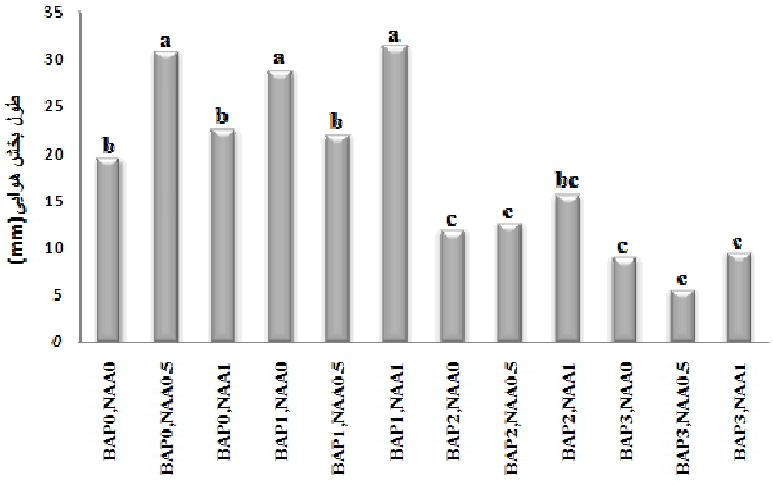
شکل1- مراحل رشد جنین نوروزک در محیط‌کشت MS حاوی BAP 1 میلی گرم بر لیتر+ NAA 1 میلی گرم بر لیتر . الف تا ه به ترتیب جنین کشت شده در روز اول، روزچهارم ،یک هفته، دو هفته و یک ماه پس از کشت

اثر برهمکنش محیط‌کشت،BAP و NAA بـر رشـد و نمـو جنین

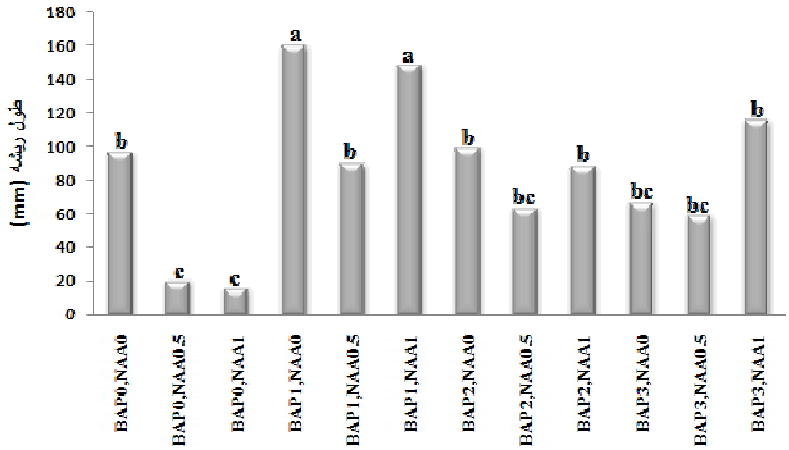
نتایج حاصل از آزمایش بررسی مقایسه میانگین‌هـای حاصـل از سطوح مختلـف هورمـون BAP و هورمـون NAA و محـیط‌کشـت نشان داد که تیمار هورمونی BAP 1 میلـی گـرم بـر لیتـر+ NAA 1 میلی گرم بر لیتر در محیط کشت‌های MS و MS 1/2مناسـب‌تـرین تیمار برای رشد طبیعی جنین می‌باشد. در این تیمار وزن تر و خشـک، طول بخش هوایی و طول ریشه با دیگـر تیمارهـا تفـاوت معنـی‌داری داشت. اگرچه در بعضی از تیمارها بین صفات به لحـاظ کمـی تفـاوت معنی‌داری نبود، اما از نظـر کیفـی متفـاوت بودنـد بـه‌طـوری کـه در تیمارهای مذکور گیاهچه‌های قوی با بـرگ‌هـای پـرزدار و طبیعـی از رشد جنین به دست آمد. در تیمار هایBAP 3 میلی گـرم بـر لیتـر+ MS و BAP 3 میلی گرم بر لیتـر+ NAA 0/5 میلـی گـرم بـر لیتـر +1/2MS جنین دارای ریشه اما فاقد بخش هوایی بود.



شکل 2- وزن خشک گیاهچه‌های باززایی شده در سه محیط‌کشت MS و1/2MS و B5 حاوی غلظت‌های مختلف هورمون BAP و NAA و ترکیب‌های مختلف آن‌ها. حروف یکسان بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار با استفاده از آزمون (توکی) در سطح احتمال 5 درصد است.



شکل3- نمودارطول بخش هوایی گیاهچه‌های باززایی شده در سه محیط‌کشت MS و1/2MS و B5 حاوی غلظت‌های مختلف هورمون BAP و NAA و ترکیب‌های مختلف آن‌ها. حروف یکسان بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار با استفاده از آزمون با استفاده از آزمون (توکی) در سطح احتمال 5 درصد است.



شکل 4- طول ریشه گیاهچه‌های باززایی شده در سه محیط‌کشت MS و1/2MS و B5 حاوی غلظت‌های مختلف هورمون BAP و NAA و ترکیب‌های مختلف آن‌ها. حروف یکسان بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار با استفاده از آزمون با استفاده از آزمون (توکی) در سطح احتمال 5 درصد است.

بحث

قوه نامیه پایین و درصد جوانه‌زنی کم در بذر گیاه نوروزک برای تکثیر این گیاه ارزشمند در خاک و در کشت درون شیشه‌ای یک مشکل اساسی به‌حساب می‌آید. نتایج تحقیق حاضر نشان داد کشت درون شیشه‌ای جنین گیاه نوروزک نسبت به کشت درون شیشه‌ای بذر آن برتری دارد. در این رابطه می‌توان به جوانه‌زنی قابل ملاحظه جنین در مقایسه با بذر و سرعت جوانه‌زنی جنین اشاره نمود. در کشت بذر با پوشش در هردو شرایط دمایی متفاوت نتیجه‌ای حاصل نشد. در کشت بذر بدون پوشش نیز تنها 27 درصد از بذرها جوانه زدند و رشد گیاه‌چه‌های حاصل بسیار کند بود. این نتیجه با گزارش حسینی و حداد خداپرست (3) در مورد کشت بذر بدون پوشش روی کاغذ صافی قابل مقایسه است. طبق این گزارش حذف پوشش بذر جوانه‌زنی را تا 40 درصد افزایش داده است. در مجموع کشت درون‌شیشه‌ای بذر به دلیل تعداد کم گیاه‌چه‌های سالم به‌دست آمده و رشد کند گیاه‌چه‌ها، موفقیت‌آمیز نبود. بنابراین آزمایش‌های بعدی فقط روی کشت جنین متمرکز شد. از آن‌جا که در همه محیط کشت‌های مورد بررسی، جنین 24 ساعت پس از جدا شدن از پوشش دانه و لپه‌ها شروع به رشد نمود، احتمالاً مواد بازدارنده رشد در پوسته و لپه‌ها وجود دارند. گزارش‌های زیادی وجود دارد که نشان می‌دهد جدا شدن جنین از پوسته دانه و لپه‌ها سرعت جوانه‌زنی آن را تا حد زیادی سرعت می‌بخشد. به‌عنوان مثال کشت جنین گیاه *Cynaria cardunculus* زمان تولید گیاه‌چه را به‌طور چشم‌گیری کاهش می‌دهد (9). سانچز زامورا و همکاران (20) نیز با کشت جنین گردو گیاه‌چه را در مدت کوتاهی به‌دست آوردند. بررسی محیط‌کشت‌های مختلف برای رشد جنین نشان داد که محیط‌کشت‌های MS و 1/2MS به‌طور معنی‌داری نسبت به محیط B5 برای رشد جنین مناسب‌تر است. در مورد برتری محیط‌کشت MS و 1/2MS نسبت به محیط‌کشت B5 می‌توان به کارآیی محیط‌کشت MS از نظر نوع املاح و مجموع قدرت یونی آن اشاره کرد. در توافق با این نتیجه جنین *Salvia brachyodon* در محیط‌کشت 1/2MS رشد مناسب‌تری داشته است (17). در این پژوهش تأثیر هورمون‌های BAP و NAA بر رشد جنین بررسی گردید و مشخص شد که هورمون BAP در غلظت 1 میلی‌گرم بر لیتر اثرات مثبتی بر رشد جنین داشت درحالی‌که در غلظت‌های بالاتر اثر کاهشی بر طول جنین وکیفیت رشد آن دارد. هم‌چنین این پژوهش نشان داد با افزایش غلظت اکسین از طول ریشه کاسته می‌شود. این نشان می‌دهد که احتمالاً در جنین گیاه نوروزک به خاطر قرار گرفتن در معرض نور اکسین درونی به مقدار کافی وجود دارد و افزودن اکسین خارجی بدون افزودن سیتوکینین مانع از رشد ریشه می‌شود. اثر بازدارنده اکسین ناشی از بیوسنتز اتیلن القا شونده توسط اکسین است (2). از طرفی احتمال دارد میزان هورمون سیتوکینین درونی در جنین به اندازه کافی نباشد، بنابراین وجود آن در محیط کشت اثرات مثبتی بر رشد جنین و تولید گیاه‌چه‌های طبیعی می‌گذارد. در تحقیق حاضر بهترین تیمار برای رشد سریع و مناسب جنین محیط‌کشت MS و 1/2MS به همراه BAP و NAA به میزان 1 میلی‌گرم بر لیتر تعیین گردید. این نتیجه با گزارش اوگانسولا و ایلوری (18) در مورد کشت جنین *Synsepalum dulcificum* در محیط‌کشت MS مطابقت دارد. به علاوه کئی چی و همکاران (15) گزارش کردند باززایی گیاه‌چه از جنین گیاه نیلوفر ژاپنی در محیط‌کشت‌های حاوی تعدادی از اکسین‌ها و سیتوکینین‌ها تنها در محیط‌کشت MS حاوی BAP و NAA موفقیت‌آمیز بوده است. هم‌چنین تحقیق حاضر موید گزارش چین و همکاران (8) در مورد کشت جنین 11 گونه گیاهی می‌باشد .طبق گزارش مذکور، جنین این گیاهان که با مشکل در جوانه‌زنی بذر مواجه بودند، در محیط کشت MS با هورمون‌های NAA یا IBA به میزان 1 میلی‌گرم بر لیتر و هورمون‌های BAP یا کینتین به میزان 1 میلی‌گرم بر لیتر رشد مناسب‌تری داشته است. هم‌چنین استفاده از 2 گرم برلیتر زغال فعال در محیط‌کشت این گونه‌ها به‌طور معنی‌داری در اندام‌زایی و نمو جنین نسبت به محیط بدون زغال فعال مؤثر بوده است. در تحقیق حاضر نیز از 2 گرم زغال فعال استفاده شد که احتمالاً در جذب هورمون‌های اضافی و فنل‌های اکسید شده، مواد شیمیایی بازدارنده رشد و اندام‌زایی نقش دارد (21).

پژوهش‌های ژائو و همکاران (23) نشان داده است ژن‌های تنظیم کننده AAR[1] که در مریستم انتهایی حضور دارند، در ترارسانی علامت سیتوکینین نقش منفی دارند. از طرفی مشخص شده است که اکسین بر ARR ها اثر بازدارندگی دارد. پس وجود اکسین به همراه سیتوکینین سبب تقویت نقش سیتوکینین می‌شود. بنابراین در تحقیق حاضر اثر مثبت اکسین و سیتوکینین در رشد جنین منطقی به نظر می‌رسد.

مقایسه اثر تنظیم کننده‌های رشد استفاده شده در تحقیق حاضر بر صفات رشد گیاه‌چه‌های باززایی شده از جنین، با اثر 2,4-D و کینتین بر رشدگیاه‌چه‌ها در تحقیق مدرس و همکاران (4) نشان می‌دهد که گیاهچه‌های حاصل از باززایی جنین در حضور هورمون‌های BAP و NAA با برگ‌های پرزدار طبیعی، قوی‌تر و دارای ریشه‌های بلند تر در مقایسه با گیاه‌چه‌های رشد یافته در حضور 2,4-D و کینتین می‌باشند.

به‌طورکلی این پژوهش نشان داد استفاده از محیط‌کشت‌های MS یا 1/2MS و هورمون‌های BAP و NAA به میزان یک میلی‌گرم بر

1- A-type Arabidopsis Response Regulator

لیتر و زغال فعال به میزان 2 گرم بر لیتر مناسب‌ترین تیمار برای تولید گیاهان مقاوم می‌باشد که قابلیت استفاده در مهندسی ژنتیک را داشته باشند. هم‌چنین به‌کارگیری کشت جنین می‌تواند گام مهمی برای تولید انبوه آن و جلوگیری از انقراض این گیاه ارزشمند و بومی، حفظ ژرم پلاسم و افزایش متابولیت‌های ثانویه از طریق بیوتکنولوژی باشد.

سپاسگزاری

بدین‌وسیله از معاونت پژوهشی و پرسنل پژوهشکده علوم گیاهی دانشگاه فردوسی مشهد تشکر و قدردانی می‌شود.

منابع

1- پور ح.، نعمتی س.ح.، تهرانی‌فر ع.، شور م.، و جوهرچی م.ر. 1389. بررسی آرایش و عمق کشت بذر بر خصوصیات جوانه‌زنی و استقرار گیاهچه (*Salvia leriifolia* Benth.) به منظور اهلی سازی نوروزک. نشریه علوم باغبانی علوم و صنایع کشاورزی.24: 136-141.

2- تایز ل. و زایگر ا. 1386. فیزیولوژی گیاهی . ترجمه انجمن زیست شناسی ایران. انتشارات خانه زیست شناسی.تهران.

3- حدادخداپرست م.ح. و حسینی م. 1372. اثر عوامل محیطی بر جوانه‌زنی گیاه نوروزک در شرایط آزمایشگاهی. مجله پژوهش و سازندگی، 37: 42-45.

4- مدرس م.، ابریشم چی پ.، اجتهادی ح.، و رمضانی ع. 1386الف. تکثیر گیاه نوروزک با استفاده از کشت رویان. فصلنامه علمی پژوهشی تحقیقات ژنتیک و اصلاح گیاهان مرتعی و جنگلی ایران، 15: 141-129.

5- مدرس م.، ابریشم چی پ.، فرهوش ر.، و اجتهادی ح. 1386ب. بررسی تغییر فعالیت آنتی‌اکسیدانی ریشه و برگ نوروزک(*Salvia leriifolia*) در مراحل رشد و نمو. مجله علمی پژوهشی تحقیقات گیاهان دارویی و معطر ایران، 23: 294-285.

6- مدرس م.، و ابریشم‌چی پ. 1389. بررسی فعالیت ضد باکتریایی ریشه گیاه نوروزک (*Salvia leriifolia*)، در مراحل مختلف رشد و نمو ،مجله زیست شناسی ایران23 :717-707.

7- مدرس م.، و ابریشم‌چی پ. 1387 بررسی تأثیر زمان برداشت بر فعالیت ضد باکتریایی برگ گیاه نوروزک (*Salvia leriifolia*)، مجله علمی پژوهشی علوم دانشگاه تربیت معلم 8: 343-356.

8- Chin H.F., Krishnapillay B., and Alang Z.C. 1998. Media for embryo culture of some tropical recalcitrant species. Pertanika, 11: 357-363.

9- Craverol V., and Cointry E. 2007. Shortening the seed-to-seed cycle in artichoke breeding by embryo culture. Plant Breeding, 126: 222-224.

10- Hadad Khodaparast M.H., Haghdoost A., Elhami-Rad A.H., Movahhed, G., and Karazhiyan, H. 2006. Antioxidant activity and thermal Properties of salvia leriifolia (Norozak) root extract. Proceedings of the international conference on Innovations in Food and Bioprocess Technologies, 378.

11- Hosseinzadeh H., and Lary P. 2000. The effect of *Salvia leriifolia* Benth root extracts on morphine dependence in mice. Phytotherapy Research, 14:384-387.

12- Hosseinzadeh H., and Yavary M. 1999. Anti-inflammatory effect of *Salvia leriifolia* Benth leaf extract in mice and rat. Pharmaceutical and Pharmacological Letters, 9: 60-61.

13- Hosseinzadeh H., Haddad Khodaparast M.H., and Hosseini E. 2000.Anti-ulcer effect of *Salvia leriifolia* Benth leaf extract in mice. Pharmaceutical and Pharmacological Letters, 10:63-64.

14- Jalili A., and Jamzad Z. 1999. Red Data Book Of Iran .A Preliminary Survey of Endemic, Rare and Enudaugered Plants species in Iran. Research Institute of Forests and Rangelands (RIFR) Publication, Tehran,750 p.

15- Keiichi S., Tetsuya T., Fumio H., and Yusuke S. 2005. In vitro propagation of sterile mutant strains in Japanese morning glory by sub-culturing embryoids derived from an immature embryo. Journal of the Japanese Society for Horticultural Science, 74: 311-317.

16- Loizze M.R., Menchini F., Tundis R., Bonesi M., and Cenforti F. 2009. In vitro biological activity of Salvia leriifolia Benth essential oil relevant to the treatment of Alzheimer's disease Journal of Oleo Science, 58: 443-446.

17- Misic D., Grubisic D. and Konjevic R. 2006. Micropropagation of *Salvia brachyodon* through nodal explants. Biologia Plantarum, 50: 473-476.

18- Ogunsola K.E., and Ilori C.O. 2008. *In vitro* propagation of miracle berry (*Synsepalumdulcificum* Daniel) through embryo and nodal cultures. African Journal of Biotechnology, 7: 244-248.

19- Rechinger K.H. 1982. Flora Iranica. N.150, Academishe Druk.u.Verlag sustalt Gratz.

20- Sanchez-Zamora M., Cos-terrer A., Frutos-Tomas D., and Garcia-Lopez R. 2006. Embryo germination and proliferation in vitro of Juglans regia L. Scientia Horticulture, 108: 317-321.
21- Thomas T.D. 2008. The role of activated charcoal in plant tissue culture. Biotechnology Advances, 26: 618-631.
22- Toosi S., Dilmagani K., and Hecmatshoar H. 2010. Proliferation of Juglans regia L. by in vitro embryo culture. (JCBG)Journal of Cell Biology and Genetics, 1:13 - 20.
23- Zhao Z., Andersen S.U., Ljung K., Dolezal K., Miotk A., Schultheiss S.J., and Lohmann J.U. 2010. Hormonal control of the shoot stem-cell niche. Nature, 465: 1089-1092.