مقاله کوتاه

Iranian Journal of Horticultural Science
Vol 48, No 1, Spring 2017 (249-252)
DOI: 10.22059/ijhs.2017.213707.1063

علوم باغبانی ایران
دورهٔ ۴۸، شمارهٔ ۱، بهار ۱۳۹۶ (ص ۲۵۲-۲۴۹)

تأثیر محیط‌های کشت MS و B_5 بر شاخص‌های رشدی به‌لیمو در شرایط درون شیشه‌ای

حسن نورافکن[1*] و فرشته انصاری[2]

۱ و ۲. استادیار مرکز تحقیقات گیاهان دارویی و محصولات ارگانیک و دانشجوی سابق کارشناسی ارشد، دانشکدهٔ کشاورزی، واحد میانه، دانشگاه آزاد اسلامی، میانه، ایران

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۶/۱۳ - تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۱/۲۵)

چکیده

انتخاب محیط کشت مناسب یکی از ضرورت‌های موفقیت در کشت بافت به‌لیمو *Lippia citriodora* H.B.K. است. قطعه‌های گرهٔ حاوی یک جوانهٔ جانبی به‌منظور ریز ازدیادی نوساقه‌ها در غلظت‌های مختلف محیط کشت MS و B_5 با غلظت‌های یک‌چهارم، یک‌دوم و کامل نمک‌های عنصرهای ریز و مغذی (میکرو) و عنصرهای اصلی غذایی (ماکرو)، کشت شدند. همهٔ محیط‌های کشت حاوی ۱ گرم در لیتر زغال فعال بود. نمونه‌ها به مدت ٦ هفته در اتاقک رشد نگهداری شدند. آزمایش در قالب طرح کامل تصادفی با سه تکرار انجام شد. ریشه‌زایی ۱۰۰ درصد در غلظت کامل محیط کشت MS و B_5 به‌دست آمد. بالاترین میزان از شاخص‌های شمار گره در بلندترین شاخساره، طول بلندترین شاخساره، شمار برگ در بلندترین شاخساره، طول بزرگ‌ترین برگ، شاخص سبزینه (کلروفیل)، شمار ریشه، قطر پینه (کالوس)، وزن تر ریشه و وزن خشک‌ریشه در غلظت کامل MS به‌دست آمد که می‌تواند ناشی از بالاتر بودن توان یونی محیط کشت MS نسبت به دیگر محیط‌های کشت مورد استفاده باشد. کمترین شمار برگ‌های بافت مرده (نکروزه) در بلندترین شاخساره و شمار برگ‌های بافت مردهٔ گیاهچه در محیط کشت B_5 کامل مشاهده شد. با توجه به یافته‌های پژوهش، محیط کشت MS با ۱ گرم بر لیتر زغال فعال برای افزایش در شرایط کشت بافتی به‌لیمو توصیه می‌شود.

واژه‌های کلیدی: به‌لیمو، غلظت محیط کشت، کشت بافت، گمبورگ، موراشیگ و اسکوگ.

The effect of MS and B_5 media on growth indices of lemon verbena in *in vitro* condition

Hassan Nourafcan[1*] and Fereshteh Ansari[2]
1. Assistant Professor, Research Center of Medicinal Plant and Organic Products, and Former M. Sc. Student, Faculty of Agriculture, Miyaneh branch, Islamic Azad University, Miyaneh, Iran
(Received: Sep. 3, 2016 - Accepted: Apr. 14, 2017)

ABSTRACT

Choose a suitable culture medium for Lemon verbena (*Lippia citriodora* H.B.K.) is one of the prerequisite for success in tissue culture. The nodal explants containing a lateral node for shoot micropropagation were cultured in different concentrations of MS and B_5 medium with ¼, ½ or full micro and macro elements concentration. All culture media amended by activated charcoal in 1 gL^{-1}. They were stored for six weeks in growth chamber condition. Experiment was conducted based on completely randomized design in three replications. Full root generation was obtained in full micro- and macro-elements concentrations of MS and B_5. The most number of nodes in the highest shoot, the longest shoot, the most number of leaves in highest shoot, the largest leaves, the highest leaf chlorophyll content index, the most number of roots, the widest callus, and the heaviest fresh and dry root were observed in full concentration of MS. It could be because of higher ionic strength of MS medium compared to other media use. The least leaf necrosis on the highest shoots and plantlet was observed in full concentration of B_5. Regarding research finding, MS medium with activated charcoal (1 gL^{-1}) would be recommendable for lemon verbena high performance propagation in tissue culture condition.

Keywords: Gamborg, medium concentration, Murashige and Skoog, tissue culture.

* Corresponding author E-mail: hassannourafcan@gmail.com Tel: +98 914 4145339

مقدمه

به‌لیمو *Lippia citriodora* H.B.K. از خانوادهٔ Verbenaceae، درختچه‌ای با ارتفاع ۱/۵ تا ۲ متر است (Shahhosseini *et al*., 2012). جنس *Lippia* بیش از ۲۰۰ گونه داشته و گونهٔ *citriodora* اهمیت ویژه‌ای دارد. ازآنجایی‌که در کشور ظرفیت زیادی برای تولید گیاهچه‌های به‌لیمو وجود دارد با افزایش سریع و گسترش سطح زیر کشت آن می‌توان تحولی اقتصادی در صنعت این گیاه دارویی ایجاد کرد. ازدیاد به‌لیمو از راه بذر به دلیل وجود پدیده دگرگشنی و تفرق ژنتیکی صفات در نتاج، مورد توجه نیست. افزایش به‌لیمو با قلمه یا خوابانیدن شاخه‌ها صورت می‌گیرد ولی شمار محدودی گیاه تولید می‌شود. با استفاده از کشت درون شیشه‌ای می‌توان نسبت به تولید انبوه و بدون آلودگی گیاه به‌لیمو اقدام کرد (Oladzad *et al*., 2013). عامل‌های زیادی در پاسخ به کشت بافت و ریز ازدیادی گیاهان مؤثرند و می‌توان به نوع ژنوتیپ، نوع ریزنمونه‌ها، دما، طول روز، شدت نور، pH محیط کشت، منبع غذایی، تنظیم‌کننده‌های رشد و غیره اشاره کرد (Nourafcan *et al*., 2014). در تحقیقی Gupta *et al*. (2001) تأثیر تنظیم‌کننده‌های رشد را بر ریزازدیادی گونهٔ *L. alba* بررسی کردند و بیشترین شمار نوساقه‌ها را در محیط کشت MS حاوی ۵ میلی‌گرم در لیتر BAP و بیشترین طول شاخساره را در محیط کشت MS حاوی ۱ میلی‌گرم در لیتر BAP به‌دست آوردند. همچنین محیط کشت بدون تنظیم‌کنندهٔ رشد را مناسب‌ترین محیط کشت برای ریشه‌زایی گزارش کردند. در گزارشی تأثیر غلظت‌های محیط کشت و مواد تنظیم‌کنندهٔ رشد را بر پرآوری قطعه‌های گره بررسی کردند و ۲۸ روز پس از کشت به این نتیجه رسیدند که میانگین شمار شاخساره‌های تولیدی به قطعه‌های گره در محیط کشت نیم غلظت MS بدون تنظیم‌کنندهٔ رشد، بالاترین نسبت را داشته است (Severin *et al*., 2006). انتخاب محیط کشت مناسب یکی از ضرورت‌های موفقیت در کشت بافت است (Nourafcan *et al*., 2014). مهم‌ترین بخش اقتصادی این گیاه برگ‌های آن است و هدف از این پژوهش معرفی غلظت‌های مناسب محیط‌های کشت MS و B_5 برای دستیابی به گیاهانی است که از نظر ویژگی‌هایی مانند طول برگ، شمار برگ، ارتفاع گیاه و دیگر ویژگی‌های رشدی، ارزش اقتصادی بالاتر و برتری داشته باشند.

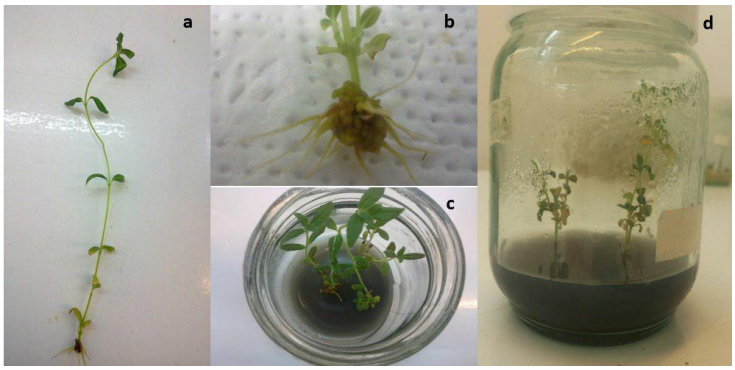
مواد و روش‌ها

پس از پرآوری مقدماتی به‌لیمو و تولید حجم کافی از ریزنمونه‌های سالم در مرحلهٔ افزایش، محیط‌های کشت MS و B_5 با غلظت‌های یک‌چهارم، یک‌دوم و کامل نمک‌های میکرو و ماکرو تهیه شد. همهٔ محیط‌های کشت حاوی ۱ گرم بر لیتر زغال فعال بود. پس از ۶ هفته ریزنمونه‌های قطعه‌های گرهٔ حاوی یک جوانهٔ جانبی از بطری‌های شیشه‌ای خارج و صفات مورفوفیزیولوژیکی ارزیابی شد. درصد ریشه‌زایی، طول بلندترین شاخساره، طول و عرض بزرگ‌ترین برگ، قطر پینه (کالوس) و طول بلندترین ریشه، شمار شاخساره‌ها، شمار گره‌ها، برگ‌های سالم و بافت مرده (نکروزه) در بلندترین شاخساره، شمار برگ‌های سالم و بافت مرده در هر ریزنمونه، شاخص سبزینهٔ (کلروفیل) برگ، شمار ریشه‌ها، وزن‌تر شاخساره و ریشه، وزن خشک شاخساره و ریشه اندازه‌گیری و ثبت شد (شکل۱). آزمایش در قالب طرح کامل تصادفی با سه تکرار و سه ریزنمونه در هر تکرار انجام شد، تجزیه با نرم‌افزار آماری SAS ver.9.1 و مقایسهٔ میانگین‌ها به روش آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ۵ درصد صورت گرفت.

نتایج و بحث

تأثیر غلظت‌های مختلف محیط کشت در بیشتر صفات مورد ارزیابی معنی‌دار بود. با توجه به جدول ۲ بیشترین درصد ریشه‌زایی (۱۰۰ درصد) در محیط‌های کشت با غلظت کامل MS و B_5 مشاهده شد. بالاترین میزان از شاخص‌های شمار گره و شمار برگ در بلندترین شاخساره در محیط کشت MS مشاهده شد و با کاهش غلظت محیط‌های کشت MS و B_5 میزان این شاخص‌ها کاهش یافت. بالاترین میزان از شاخص طول بلندترین شاخساره در محیط کشت MS به‌دست آمد و با کاهش غلظت محیط‌های کشت MS طول بلندترین شاخساره

کاهش یافت اما در غلظت‌های مختلف محیط کشت B_5 اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد. کمترین شمار برگ‌های بافت مرده در بلندترین شاخساره در محیط کشت B_5 مشاهده شد و با کاهش غلظت این محیط کشت شمار برگ‌های بافت مرده به‌طور معنی‌داری افزایش یافت همچنین در محیط‌زیست MS با کاهش غلظت محیط کشت شمار برگ‌های بافت مرده افزایش یافت. بالاترین میزان از شاخص‌های طول بلندترین شاخساره، طول بزرگ‌ترین برگ، شمار ریشه، وزن‌تر و خشک ریشه، شاخص سبزینهٔ برگ و قطر پینه در محیط کشت MS مشاهده شد. بالاترین میزان شاخص طول بلندترین ریشه در محیط کشت B_5 و ½B_5 به‌دست آمد. بین محیط‌های کشت، اختلاف معنی‌داری از نظر شمار برگ گیاهچه مشاهده نشد اما به‌طورکلی شمار برگ گیاهچه در غلظت‌های مختلف محیط کشت MS بیشتر از غلظت‌های مختلف محیط کشت B_5 بود. بیشترین وزن تر شاخساره در محیط کشت MS و ½MS و وزن خشک شاخساره در محیط کشت ½MS مشاهده شد. با توجه به نتایج به‌دست‌آمده از این پژوهش در مورد اغلب صفات، محیط کشت MS کامل نسبت به دیگر محیط‌های کشت برتری داشت که می‌توان آن را ناشی از بالاتر بودن توان یونی محیط کشت MS کامل نسبت به محیط‌های کشت یک‌دوم و یک‌چهارم MS (که غلظت نمک‌های عنصرهای اصلی غذایی (ماکرو) و ریزمغذی‌های (میکرو) آن‌ها کاهش‌یافته است) و همهٔ غلظت‌های محیط کشت B_5 دانست و از سویی، میزان یون نیترات در محیط کشت MS بیشتر از محیط کشت B_5 است (Pierik, 1997; Taji *et al.*, 1997).



شکل ۱. ریزازدیادی به‌لیمو. a) گیاهچه، b) ریشه‌زایی و پینه‌زایی، c) شاخه‌زایی، d) برگ‌های نکروزه

Figure 1. micropropagation of lemon verbena, a)plantlet, b) rooting and callus formation, c) proliferation, d) Necrotic leaf

جدول ۲. تأثیر محیط‌های کشت بر شاخص‌های رشدی به‌لیمو در شرایط کشت درون شیشه‌ای

Table 2. Effect of media on growth characteristics of lemon verbena in *in vitro*

Growth characteristics / Culture media	Rooting (%)	Node number / shoot	The longest shoot	Leaf number / shoot	Necrotic leaf number / shoot	Leaf number in plantlet	Necrotic leaf number / plantlet	Leaf length
MS	100^{a}	5.56^{a}	78.67^{a}	10.89^{a}	0.33^{c}	18.67^{a}	1.33^{b}	7.22^{a}
1/2 MS	55.55^{b}	3.89^{b}	41.78^{b}	8.89^{b}	0.66^{b}	18.89^{a}	3.55^{a}	5.22^{b}
1/4 MS	55.55^{b}	3.33^{bc}	21.56^{c}	6.89^{bc}	0.89^{a}	15.22^{ab}	1.78^{b}	3.78^{b}
B_5	100^{a}	4^{b}	31.78^{bc}	7.78^{b}	0^{d}	10.67^{bc}	0^{c}	5.11^{b}
1/2 B_5	66.66^{b}	3.33^{bc}	22.56^{c}	7.22^{b}	0.44^{c}	9.45^{bc}	0.44^{c}	3.55^{b}
1/4 B_5	66.66^{b}	2.56^{c}	20^{c}	5^{c}	0.66^{b}	7.33^{c}	1.33^{b}	3.89^{b}

ادامه جدول ۲. تأثیر محیط‌های کشت بر شاخص‌های رشدی به‌لیمو در شرایط کشت درون شیشه‌ای

Continued table 2. Effect of media on growth characteristics of lemon verbena in *in vitro*

Growth characteristics / Culture media	Leaf width	Chlorophyll index	Root number	The longest root	Callus diameter	Shoot fresh weight	Root fresh weight	Shoot dry weight	Roots dry weight
MS	3.89^{a}	23.06^{a}	8.67^{a}	5.55^{b}	2.56^{a}	0.0776^{a}	0.0263^{a}	0.0149^{b}	0.0044^{a}
1/2 MS	2.89^{ab}	8.85^{c}	1.67^{d}	1.66^{c}	0.22^{c}	0.074^{a}	0.0133^{b}	0.0182^{a}	0.0024^{b}
1/4 MS	2.33^{b}	8.81^{c}	2.33^{bcd}	5.44^{b}	0.78^{b}	0.0424^{b}	0.0128^{b}	0.0088^{c}	0.0025^{b}
B_5	2.56^{b}	17.06^{b}	3^{bc}	10.22^{a}	1.11^{b}	0.0347^{b}	0.017^{b}	0.0065^{cd}	0.0029^{b}
1/2 B_5	1.67^{b}	8.2^{c}	3.33^{b}	9.22^{a}	0.67^{b}	0.025^{b}	0.0136^{b}	0.0047^{d}	0.0023^{b}
1/4 B_5	2.22^{b}	7.93^{c}	2^{cd}	5.56^{b}	1^{b}	0.0207^{b}	0.0099^{b}	0.0046^{d}	0.0022^{b}

میانگین‌های دارای حرف‌های همسان در هر ستون از لحاظ آماری اختلاف معنی‌داری ندارند.

* Means in each column followed by the same letter(s) are not significantly different.

نتیجه‌گیری کلی

یکی از محیط‌های کشت بافت گیاهی که بیشتر موارد مورد نیاز گیاهان بوده و در بسیاری از تحقیقات از آن استفاده‌شده و نتایج رضایت‌بخشی به دنبال داشته است، محیط کشت MS است (Nourafcan *et al*., 2014). با توجه به نتایج آزمایش، محیط کشت MS کامل نسبت به دیگر محیط‌های کشت تأثیر بهتری داشت و می‌توان آن را ناشی از بالاتر بودن قدرت یونی محیط کشت MS کامل نسبت به محیط‌های یک‌دوم و یک‌چهارم MS و همهٔ غلظت‌های محیط کشت B_5 دانست و از سویی، میزان یون نیترات در محیط کشت MS بیشتر از محیط کشت B_5 است (Pierik, 1997; Taji *et al*., 1997). محیط کشت MS با داشتن بالاترین میزان از شاخص‌های شمار گره در بلندترین شاخساره، طول بلندترین شاخساره، شمار برگ‌ها در بلندترین شاخساره، طول بزرگ‌ترین برگ، شاخص سبزینه، شمار ریشه‌ها، قطر پینه، وزن تر ریشه و وزن خشک ریشه به‌عنوان محیط کشت مناسب در شرایط آزمایشگاهی انتخاب شد.

REFERENCES

1. Gupta, S. K., Khanuja, S. P. S. & Kumar, S. (2001). *In vitro* micropropagation of *Lippia alba. Current Science*, 81(2), 206-210.
2. Nourafcan, H., Sefidkon, F., Mousavi, A., Sharifi, M. & Khalighi, A. (2014). Effects of different medium on some morpho-physiological index of lemon verbena under *in vitro* conditions. *Journal of Herbal Drugs*, 5(3), 143-150. (in Farsi)
3. Oladzad, A., Qaderi, A., Naqdibadi, H. A. & Zare Karizi, A. R. (2013). Rapid propagation of Lemon verbena (*Lippia citriodora* H.B.K.) by *in vitro* culture. *Journal of Medicinal Plants*, 11(2), 145-153. (in Farsi)
4. Pierik, R. L. M. (1997). *In Vitro Culture of Higher Plants*, Springer Netherlands, 348 pages.
5. Severin, C., Bruzzese, D., Di Sapio, O., Gattuso, M. & Gattuso, S. (2006). Evaluation of *in vitro* behaviour of *Aloysia citriodora* Palau: histogical and chemical study. *Molecular Medicinal Chemistry*, 11, 19-20.
6. Shahhosseini, R., Ghorbani, H., Saleh, R. & Omidbeigi, R. (2012). Identification of essential oil content and composition of *Lippia citriodora* seed. *Journal of Plant Production*, 18(4), 91-96. (in Farsi)
7. Taji, A. M., Dodd, W. A. & Williams, R. R. (1997). *Plant Tissue Culture Practice*, University of New England press, Armidale, Australia.