





دانشکده علوم

پایان نامه جهت دریافت درجه کارشناسی ارشد (M.Sc) رشته علوم گیاهی
(گرایش فیزیولوژی گیاهی)

**ریزازدیادی و بهینه سازی کشت در شیشه دو گونه گیاه دارویی
جاشیر (*Prangos ferulacea* & *P. uloptera*)**

پژوهش و نگارش:

زهرا ضیائی فرد

استاد راهنما:

دکتر منیژه میان آبادی

اساتید مشاور:

دکتر مهناز اقدسی و مهندس زهره کریمی

اسفند ۱۳۸۹

تعهدنامه پژوهشی

نظر به اینکه چاپ و انتشار پایان نامه (رساله) های تحصیلی دانشجویان دانشگاه گلستان مبین بخشی از فعالیت های علمی - پژوهشی بوده و همچنین با استفاده از اعتبارات دانشگاه انجام می شود، بنابراین به منظور آگاهی و رعایت حقوق دانشگاه، دانش آموختگان این دانشگاه نسبت به رعایت موارد ذیل متعهد می شوند:

۱) قبل از چاپ پایان نامه (رساله) خود، مراتب را قبلاً به طور کتبی به مدیریت تحصیلات تکمیلی دانشگاه اطلاع و کسب اجازه نمایند.

۲) در انتشار نتایج پایان نامه (رساله) در قالب مقاله، همایش، اختراع و اکتشاف و سایر موارد، ذکر نام دانشگاه گلستان الزامی است.

۳) انتشار نتایج پایان نامه (رساله) باید با اطلاع و کسب اجازه از استاد راهنما صورت گیرد.

اینجانب **زهرا ضیائی فرد** دانشجوی رشته **علوم گیاهی** مقطع **کارشناسی ارشد** تعهدات فوق و ضمانت اجرایی آن را قبول کرده و به آن ملتزم می شوم.

تقدیم به روح بزرگ پدرم که همیشه در کنارم بوده است

تقدیم به مادر عزیزم که دعایش همیشه بدرقه راهم بوده است

و تقدیم به همه علاقمندان به پژوهش و علم آموزی...

پاسکزاری

خداوند پاس و ستایش فراوان به درگاه با عظمت تو تقدیم می دارم که همیشه و همه جا تکیه گاه و راهنمای اصلی ام در زندگی بوده ای...
مرتب قدردانی و پاس خویش را از تمامی اساتید گروه زیست شناسی دانشگاه گلستان و کلیه کسانی که در انجام مراحل مختلف این پروژه مرا یاری نمودند ابراز می نمایم.

از استاد راهنمای بزرگوارم سرکار خانم دکتر نیشرو میان آبادی که بارها بنمودهای ارزشمند خود در تمامی مراحل این پیمان نامه مرایاری نمودند و همچنین از اساتید مشاورم دکتر مهنزاد قوسی و مهندس زحره کریمی تشکر و قدردانی می نمایم.

از تلاش های دلسوزانه سرکار خانم دکتر مهنزاد خلفی که در انجام تحلیل های آماری این پژوهش مرا همراهی کردند پاسکزارم.

از کارشناس ارشد آزمایشگاه سرکار خانم مهندس نوشین مقدم و کلیه دانشجویان کارشناسی ارشد فیزیولوژی گیاهی به پاس یاری و بهکاری دوستانه شان کمال تشکر را دارم.

در پیمان از خانواده عزیزم که در همه مراحل شغلی و تحصیلی مشوقم بوده اند پاسکزاری می نمایم.

چکیده

P. uloptera و *Prangos ferulacea* دو گونه جاشیر از خانواده چتریان می‌باشند که در طب سنتی به دلیل داشتن خواص ضدنفخ و ضدسرطان استفاده می‌گردند. در بعضی از رویشگاه‌ها به دلیل چرای بی‌رویه دام، نسل آن‌ها رو به انقراض است. بنابراین، تکثیر گیاه به‌خصوص از طریق ازدیاد غیرجنسی به روش کشت بافت ضروری به‌نظر می‌رسد. در ابتدا، جوانه‌زنی بذرهای دو گونه جاشیر مورد ارزیابی قرار گرفت. بالاترین درصد جوانه‌زنی در *P. ferulacea* تحت تیمار با ۱۰۰ ppm و ۱۰۰۰ ppm ژیرلیک اسید (به ترتیب ۷۰٪ و ۶۶٪) و در *P. uloptera* تحت تیمار سرمادهی در دمای ۳-۵°C و تیمار با محلول ۱۵۰۰ ppm ژیرلیک اسید به ترتیب ۵۵٪ و ۴۷٪ مشاهده شد. به منظور تکثیر درون شیشه‌ای این دو گونه گیاه، از محیط کشت MS حاوی ترکیبی از غلظت (۲، ۱/۵، ۱، ۰/۵، ۰) کینتین (Kin) و غلظت (۰/۵ mg/L و ۰) دی کلرو فنوکسی استتیک اسید (2,4-D)، غلظت‌های مختلف (۲، ۱/۵، ۱، ۰/۵، ۰) نفتالن‌استیک‌اسید (NAA) و بنزیل آمینو پورین (BA)، و ترکیبی از غلظت‌های ۱ mg/L NAA همراه با ۰/۲ mg/L BA و همچنین ۰/۲ mg/L NAA همراه با ۰/۸ mg/L BA استفاده شد. در بررسی کالزایی، قطعات جداگشت ریشه‌چه *P. ferulacea* در محیط کشت حاوی ۰/۵ mg/L 2,4-D و تیمار ۰/۵ mg/L 2,4-D همراه با ۰/۵ mg/L Kin بالاترین درصد (به ترتیب ۹۳٪ و ۸۷٪) را به خود اختصاص دادند. بهترین نتایج ساقه‌زایی در *P. ferulacea* مربوط به قطعات جداگشت یقه بود. به گونه‌ای که در تیمارهای ۰/۵ mg/L 2,4-D همراه با ۱ mg/L Kin و ۰/۵ mg/L 2,4-D همراه با ۱/۵ mg/L Kin بیشترین درصد ساقه‌زایی (۶۷٪) و در تیمار ۰/۸ mg/L NAA و ۱ mg/L BA و ۱ ماکزیمم طول ساقه (۲۷/۳ میلی‌متر) مشاهده شده است. بهترین تیمارها جهت ساقه‌زایی در *P. uloptera* مربوط به قطعات جداگشت هیپوکوتیل در تیمار ۰/۵ mg/L NAA (۳۳/۳٪) و یقه در تیمارهای ۰/۵ mg/L BA و ۲ mg/L BA (۳۳/۳٪) بود. ماکزیمم طول ساقه نیز در قطعات جداگشت یقه در تیمار ۱ mg/L Kin (۱۵/۳ میلی‌متر) مشاهده شد. ساقه‌های باززایی شده از قطعات جداگشت *P. ferulacea* در محیط کشت MS پایه فاقد هورمون ریشه‌زایی نمودند.

واژه‌های کلیدی: جاشیر، تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی، ریزازدیادی، محیط کشت MS

فهرست مطالب

صفحه

عنوان

فصل اول

۲	مقدمه
۲	۱-۱- گیاهان دارویی و اهمیت کشت بافت
۳	۲-۱- کشت بافت گیاهی
۳	۳-۱- پیشرفت‌های کشت بافت و سلول گیاهی در ایران
۴	۴-۱- ریزازدیادی
۴	۱-۴-۱- برخی از مزایای ریزازدیادی
۴	۲-۴-۱- برخی معایب ریزازدیادی
۵	۵-۱- تاثیر تنظیم‌کننده‌های رشد بر اندام‌زایی مستقیم از قطعات جداگشت
۶	۶-۱- اثر تنظیم‌کننده‌های رشد بر کشت کالوس و اندام‌زایی غیرمستقیم
۷	۷-۱- جنین‌زایی سوماتیکی و اثر تنظیم‌کننده‌های رشد
۸	۸-۱- کشت پروتوپلاست
۸	۹-۱- معرفی گیاه جاشیر خوراکی (<i>Prangos ferulacea</i> یا <i>Cachrys ferulacea</i>)
۸	۱-۹-۱- جایگاه گیاه
۸	۲-۹-۱- مشخصات ظاهری گیاه و نواحی رویش
۹	۳-۹-۱- ترکیبات شیمیایی موجود در گیاه
۱۰	۴-۹-۱- کاربردهای دارویی، صنعتی و علوفه‌ای جاشیر خوراکی
۱۲	۱۰-۱- معرفی گیاه جاشیر صخره‌روی (<i>Prangos uloptera</i>)
۱۲	۱-۱۰-۱- مشخصات ظاهری گیاه و نواحی رویش
۱۲	۲-۱۰-۱- ترکیبات شیمیایی موجود در گیاه
۱۳	۳-۱۰-۱- کاربردهای دارویی، غذایی و صنعتی این گیاه
۱۳	۱۱-۱- پیشینه تحقیق
۱۵	۱۲-۱- اهداف تحقیق

فهرست مطالب

صفحه

عنوان

فصل دوم

۱۸	مواد و روش‌ها.....	
۱۸	۱-۲- نمونه‌های گیاهی مورد استفاده جهت کشت بافت.....	
۱۸	۲-۲- تهیه استوک هورمون.....	
۱۸	۳-۲- تهیه استوک ویتامین.....	
۱۸	۴-۲- روش تهیه محیط کشت MS جامد.....	
۲۰	۵-۲- استریل نمودن محیط کشت و وسایل.....	
۲۱	۶-۲- شرایط اتاق رشد.....	
۲۲	۷-۲- استریل کردن بذرها.....	
۲۳	۸-۲- تیمارهای جوانه‌زنی بذر <i>P. ferulacea</i>	
۲۴	۱-۸-۲- تیمار سرمادهی در خاک مرطوب (استراتیفیکاسیون سرما).....	
۲۴	۲-۸-۲- تیمار با غلظت‌های مختلف محلول ژیرلیک اسید همراه با سرمادهی.....	
۲۴	۳-۸-۲- تیمار در محلول ۱۰۰ ppm ژیرلیک اسید به مدت ۴۸ و ۷۲ ساعت همراه با سرمادهی... ..	
۲۵	۴-۸-۲- تیمار با غلظت‌های ppm ۱۰۰۰، ۵۰۰، ۱۰۰، ۰ ژیرلیک اسید حین سرمادهی.....	
۲۵	۵-۸-۲- تیمار با محلول ۰/۲٪ نیترات پتاسیم به مدت ۷۲ ساعت همراه با سرمادهی.....	
۲۵	۶-۸-۲- تیمار با محلول ۱ مولار تیوره به مدت ۷۲ ساعت همراه با سرمادهی.....	
۲۵	۷-۸-۲- تیمار سرمادهی در محیط کشت 1/2MS.....	
	۸-۸-۲- تیمار سرمادهی جنین بذرها در محیط MS حاوی غلظت‌های	
۲۵	۰، ۳۰۰، ۱۰۰، ۵۰۰ ppm ژیرلیک اسید.....	
۲۶	۹-۸-۲- تیمار سرمادهی جنین بذرها در محیط MS حاوی یک گرم در لیتر زغال فعال.....	
۲۶	۱۰-۸-۲- تیمار سرمادهی جنین بذرها در محیط کشت 1/2MS.....	
۲۶	۹-۲- تیمارهای جوانه‌زنی بذر <i>P. uloptera</i>	
۲۶	۱۰-۲- ایجاد گیاهچه استریل.....	

فهرست مطالب

عنوان	صفحه
۱-۱۰-۲- ایجاد گیاهچه‌های استریل از بذره‌های جوانه‌زده <i>P. ferulacea</i>	۲۶
۲-۱۰-۲- ایجاد گیاهچه استریل از بذره‌های جوانه‌زده <i>P. uloptera</i>	۲۶
۱۱-۲- موارد و پارامترهای اندازه‌گیری شده در کشت بافت <i>P. uloptera</i> و <i>P. ferulacea</i>	۲۷
۱-۱۱-۲- بررسی کالوس‌زایی قطعات جداگشت ریشه‌چه، هیپوکوتیل، محل اتصال هیپوکوتیل به ریشه‌چه (یقه) و کوتیلدون (برگ لپه‌ای).....	۲۷
۲-۱۱-۲- بررسی ساقه‌زایی و ریشه‌زایی قطعات جداگشت ریشه‌چه، هیپوکوتیل، یقه و کوتیلدون.....	۲۸
۳-۱۱-۲- بررسی باززایی گیاهچه از قطعات جداگشت جنین با و بدون مریستم ساقه در دو گونه گیاه.....	۲۹
۴-۱۱-۲- آزمایشات انجام شده بر روی گیاه طبیعی جمع‌آوری شده از طبیعت یاسوج.....	۳۰
۵-۱۱-۲- باززایی گیاه کامل.....	۳۱
۶-۱۱-۲- سازگار نمودن گیاهچه باززایی شده.....	۳۲
۱۲-۲- تجزیه و تحلیل آماری.....	۳۲
فصل سوم	
نتایج.....	۳۴
۱-۳- نتایج حاصل از استریل‌سازی بذرها.....	۳۴
۲-۳- نتایج حاصل از جوانه‌زنی بذرها.....	۳۶
۱-۲-۳- نتایج جوانه‌زنی بذره‌های <i>P. ferulacea</i>	۳۶
۲-۲-۳- نتایج جوانه‌زنی بذر <i>P. uloptera</i>	۳۸
۳-۳- نتایج کالوس‌زایی قطعات جداگشت ریشه‌چه، هیپوکوتیل، یقه و کوتیلدون.....	۴۰
۴-۳- نتایج ساقه‌زایی و ریشه‌زایی قطعات جداگشت ریشه‌چه، هیپوکوتیل، یقه و کوتیلدون.....	۴۱
۱-۴-۳- بررسی نتایج درصد ساقه‌زایی در <i>P. ferulacea</i>	۴۱
۲-۴-۳- بررسی میانگین طول، و ماکزیمم طول ساقه‌های ایجاد شده در <i>P. ferulacea</i>	۴۵

فهرست مطالب

صفحه	عنوان
۴۵	۳-۴-۳- بررسی تغییر اندازه قطعات جداکشت <i>P. ferulacea</i>
۴۶	۳-۴-۴- بررسی نتایج ساقه‌زایی در <i>P. uloptera</i>
	۳-۴-۵- بررسی نتایج میانگین طول و ماکزیمم طول ساقه ایجاد شده در قطعات جداکشت <i>P. uloptera</i>
۴۹	۳-۴-۵- بررسی نتایج کشت بافت با استفاده از قطعات جداکشت جنین با و بدون مریستم ساقه در دو گونه گیاه.....
۵۰	۳-۶- نتایج آزمایش‌های انجام شده روی گیاه طبیعی <i>P. ferulacea</i> تهیه شده از یاسوج.....
۵۱	۳-۷- نتایج باززایی گیاهچه کامل.....
۵۱	۳-۸- نتایج سازگار کردن گیاهچه‌ها با شرایط محیط.....
	فصل چهارم
۵۴	بحث.....
۵۴	۴-۱- بحث.....
۵۹	۴-۲- جمع‌بندی نهایی.....
۶۰	۴-۳- پیشنهادات.....
۶۱	فهرست منابع.....

فهرست جداول

صفحه

عنوان

۱۰	جدول ۱-۱- ترکیبات شناسایی شده در اسانس گیاه <i>P. ferulacea</i>
۱۹	جدول ۱-۲- محلول‌های پایه مورد استفاده جهت تهیه محیط کشت MS.....
۲۱	جدول ۲-۲- خلاصه‌ای از نقش مواد غذایی در گیاهان.....
	جدول ۳-۲- تیمارهای هورمونی به کار رفته جهت کالوس‌زایی و ساقه‌زایی قطعات جداگشت
۲۹	<i>P. uloptera</i> و <i>P. ferulacea</i>
	جدول ۱-۳- مقایسه تیمار ژیرلیک اسید ۱۰۰ppm در زمان‌های مختلف همراه با سرمادهی بر
۳۷	درصد جوانه‌زنی بذور بدون غلاف <i>P. ferulacea</i>
۳۸	جدول ۲-۳- تجزیه واریانس درصد جوانه‌زنی بذورهای بدون غلاف <i>P. ferulacea</i>
۳۹	جدول ۳-۳- تجزیه واریانس درصد جوانه‌زنی بذورهای بدون غلاف <i>P. uloptea</i>
۴۰	جدول ۴-۳- تجزیه واریانس درصد کالوس‌زایی قطعات جداگشت <i>P. ferulacea</i>
۴۴	جدول ۵-۳- تجزیه واریانس درصد ساقه‌زایی قطعات جداگشت <i>P. ferulacea</i>
۴۹	جدول ۶-۳- تجزیه واریانس درصد ساقه‌زایی قطعات جداگشت <i>P. uloptera</i>

فهرست اشکال

صفحه

عنوان

- شکل ۱-۱-الف- تصویر چتر مرکب و ب- بذر تولید شده روی گیاه *Prangos ferulacea*..... ۹
- شکل ۱-۲- جنین‌های بذرهای سرمادیده *P. ferulacea* در دمای ۵ °C به مدت ده هفته ۱۵
- شکل ۱-۲- دستگاه لامینار ایر فلو..... ۲۲
- شکل ۲-۲- بذرهای غلاف‌دار (سمت راست) و بدون غلاف *P. uloptera* (سمت چپ)..... ۲۳
- شکل ۳-۲- گیاهچه‌های حاصل از جوانه‌زنی بذرهای گیاه جاشیر پس از انتقال به محیط MS..... ۲۸
- شکل ۲-۴-الف- جنین خارج شده از بذر زیره سبز ب- قطعه جداگشت جنین با مریستم ساقه
ج- قطعه جداگشت جنین بدون مریستم ساقه..... ۳۰
- شکل ۲-۵- گیاه طبیعی *P. ferulacea* تهیه شده از یاسوج..... ۳۱
- شکل ۱-۳- گیاهچه‌های *P. uloptera* آلوده به باکتری در محیط کشت MS همراه با ایجاد
رنگ بنفش مایل به صورتی..... ۳۴
- شکل ۲-۳- تست تعیین حساسیت به آنتی بیوتیک..... ۳۵
- شکل ۳-۳- اثر سرمادهی بر درصد جوانه‌زنی بذرهای غلاف‌دار *P. ferulacea* در خاک مرطوب.. ۳۶
- شکل ۳-۴- تاثیر تیمارهای مختلف بر درصد جوانه‌زنی بذرهای بدون غلاف *P. ferulacea*
بعد از ۴۰ روز..... ۳۸
- شکل ۳-۵- مقایسه تاثیر تیمارهای مختلف بر درصد جوانه‌زنی بذرهای بدون غلاف *P. uloptera*
بعد از ۴۰ روز سرمادهی..... ۳۹
- شکل ۳-۶- تصاویر میکروسکوپی از کالوس‌های ایجاد شده از قطعات جداگشت ریشه‌چه در
محیط کشت MS حاوی ۲,۴-D ۰/۵ mg/L همراه با ۰/۵ mg/L kin..... ۴۱
- شکل ۳-۷- ساقه‌زایی قطعات جداگشت *P. ferulacea*..... ۴۲
- شکل ۳-۸- درصد ساقه‌زایی قطعات جداگشت *P. ferulacea* در تیمارهای هورمونی مختلف ... ۴۳
- شکل ۳-۹- مقایسه درصد ساقه‌زایی قطعات جداگشت یقه، هیپوکوتیل و ریشه چه گیاه
P. ferulacea در تیمارهای مختلف هورمونی..... ۴۴

فهرست اشکال

صفحه

عنوان

- شکل ۳-۱۰- میانگین طول ساقه‌های ایجاد شده از قطعات جداگشت *P. ferulacea* در غلظت‌های مختلف هورمونی ۴۵
- شکل ۳-۱۱- درصد تغییر اندازه قطعات جداگشت *P. ferulacea* در تیمارهای هورمونی مختلف... ۴۶
- شکل ۳-۱۲- ساقه‌زایی قطعات جداگشت *P. uloptera* ۴۷
- شکل ۳-۱۳- درصد ساقه‌زایی قطعات جداگشت *P. uloptera* در تیمارهای مختلف هورمونی... ۴۷
- شکل ۳-۱۴- مقایسه درصد ساقه‌زایی قطعات جداگشت هیپوکوتیل و ریشه‌چه گیاه *P. uloptera* در تیمارهای مختلف هورمونی ۴۸
- شکل ۳-۱۵- میانگین طول ساقه‌های ایجاد شده از قطعات جداگشت *P. uloptera* در تیمارهای مختلف هورمونی ۴۹
- شکل ۳-۱۶- کشت جنین گیاه *P. ferulacea* ۵۰
- شکل ۳-۱۷- ریشه‌زایی ساقه باززایی شده گیاه *P. ferulacea* دو هفته بعد از انتقال به محیط کشت MS فاقد هورمون ۵۱
- شکل ۳-۱۸- انتقال گیاهان باززایی شده *P. ferulacea* به خاک ۵۲
- شکل ۴-۱- آلودگی بذرها *P. uloptera* به لاروهای سوسک بذرخوار ۵۵

فصل اول

مقدمه

مقدمه

۱-۱- گیاهان دارویی و اهمیت کشت بافت

گیاهان دارویی یکی از منابع مهم جهت درمان انواع مختلف بیماری‌ها بوده و بشر سالیان دراز از آن‌ها استفاده نموده است. سابقه استفاده از گیاهان دارویی به زمان‌های بسیار دور برمی‌گردد، حتی در کتب مقدس مانند انجیل و کتاب مقدس باستانی هند (ودا)، استفاده از بعضی گیاهان جهت درمان بیماری‌ها سفارش شده است. اما قدمت استفاده از گیاهان دارویی، به مفهوم کاهش استفاده از آن در دنیای مدرن امروزی نیست. امروزه در جوامع صنعتی و در بسیاری از کشورهای پیشرفته و در حال توسعه، استفاده از طب سنتی و گیاهان دارویی برای حفظ سلامتی بسیار چشمگیر است. طبق برآورد سازمان بهداشت جهانی تقریباً یک چهارم داروهای تهیه شده دنیا دارای منشا گیاهی هستند که یا مستقیماً از گیاهان استخراج شده‌اند و یا براساس ترکیبات گیاهی سنتز گردیده‌اند. داروهای گیاهی به دلیل ماهیت طبیعی و وجود ترکیبات همولوگ دارویی در آن‌ها، با بدن سازگاری بهتری دارند و معمولاً فاقد عوارض ناخواسته داروهای شیمیایی هستند [۱۴].

در دهه اخیر در کنار هزاران فراورده دارویی، محصولات آرایشی و بهداشتی نیز از گیاهان تهیه و وارد بازار شده است. تهیه محصولات تقویتی و نیروبخش به صورت محصولات مکمل غذایی از گیاهان و تمایل صنایع به این خط تولید، اهمیت گیاهان دارویی را بیش از پیش نمایان می‌کند [۷ و ۱۱]. کشور ایران دارای قابلیت‌های گسترده‌ای در زمینه گیاهان دارویی است. تنوع گیاهی ایران به تنهایی، چیزی در حدود تمام قاره اروپاست و بسیاری از این اقلام را گیاهان دارویی تشکیل می‌دهند. تنوع اکولوژیکی در کشور، هم از جهت گیاهان دارویی که در عرصه‌های طبیعی می‌توان یافت و هم از جهت کشت و اهلی کردن این گیاهان زمینه مناسبی را فراهم می‌نماید. سابقه تاریخی طولانی و درخشانی از شناسایی و کاربرد گیاهان دارویی، طب سنتی و دانش بومی آن در ایران وجود دارد. حتی در زمان حاضر که طب جدید با داروهای جدید و عمدتاً غیرگیاهی در ایران به شدت رواج یافته، هنوز بازار داخلی قابل توجهی برای گیاهان دارویی وجود دارد [۱].

با توجه به رشد روز افزون علم داروشناسی و صنایع تولید گیاهان دارویی، ضروری است ما نیز هم‌گام با کشورهای پیشرفته با شناخت واقعی منابع گیاهی کشور در بهره‌برداری صحیح و علمی از آن‌ها تلاش نماییم [۱۰].