Downloaded from jmp.ir at 3:18 +0430 on Tuesday May 22nd 2018

بررسی کشت درون شیشه‌ای گیاه ژینکو بیلوبا (*Ginkgo biloba* L.) از طریق کشت بافت ریزنمونه‌های مختلف

سیدمجید تولیت[1]*، محمد عبدلی[2]، محمد قربانی مشگین[3]، فرحناز خلیقی سیگارودی[4]، منصور امیدی[5]

۱- مربی پژوهش، گروه بیوتکنولوژی گیاهان دارویی، پژوهشکده گیاهان دارویی جهاددانشگاهی

۲- مربی پژوهش، گروه بیوتکنولوژی گیاهان دارویی، پژوهشکده گیاهان دارویی جهاددانشگاهی و دانشجوی دکترا، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس تهران

۳- مربی پژوهش، عضو هیات علمی جهاددانشگاهی استان سمنان

٤- استادیار پژوهش، گروه فارماکوگنوزی و داروسازی، پژوهشکده گیاهان دارویی جهاددانشگاهی

۵- دانشیار، گروه زراعت و اصلاح نباتات، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران

* آدرس مکاتبه: تهران، خیابان انقلاب اسلامی، خیابان فخررازی، خیابان ژاندارمری شرقی، شماره ۷۲، طبقه سوم، صندوق‌پستی: ١٤٤٦ - ١٣١٤٥، تلفن و نمابر: ٦٦٩٧١١٩١ (۰۲۱)

پست الکترونیک: Toliat@acecr.ac.ir

تاریخ دریافت: ۸۷/۷/۱۵ **تاریخ تصویب:** ۸۷/۱۲/۱۱

چکیده

مقدمه: ژینکو بیلوبا که اغلب به آن فسیل زنده نیز می‌گویند، یکی از قدیمی‌ترین گونه‌های درختی روی زمین می‌باشد که در برابر شرایط بد آب و هوایی مقاوم بوده و به عنوان یک گیاه زینتی نیز مشهور می‌باشد. ژینکو به عنوان مکمل غذایی برای افزایش هوشیاری ذهنی و سلامت گردش خون و عروق خونی استفاده شده است. اثرات مفید آن مدیون حضور ترکیبات فعال ژینکولیدها و بیلوبالید به همراه فلاونوییدها می‌باشد.

هدف: این تحقیق به منظور بررسی کشت درون شیشه‌ای آن از طریق کشت بافت جهت تعیین بهترین ریزنمونه، محیط کشت و ترکیب هورمونی انجام شد.

روش بررسی: آزمایش‌ها به صورت فاکتوریل با طرح پایه کاملاً تصادفی در سه تکرار انجام شد و هر تیمار شامل ٦ پتری‌دیش حاوی هفت ریزنمونه بود. ریزنمونه‌ها پس از ضدعفونی سطحی، روی محیط کشت باززایی گیاه پایه MS، BS و WPM با ۰/۷ درصد آگار- آگار و pH ۵/۷ به مدت ٦ هفته در معرض تیمارهای مورد نظر قرار گرفتند. به این منظور، پاسخ ریز نمونه حاصل از برگ، دمبرگ و مریستم انتهایی در سه نوع محیط کشت WPM، B5، MS در حضور شش ترکیب هورمونی بررسی شد.

نتایج: در این تحقیق فقط کالوس تولید و نوساقه تشکیل نشد. نتایج نشان داد که تولید کالوس از ریزنمونه مریستم در محیط MS حاوی ترکیب هورمونی BAP mgl^{-1} ۰/۵ و NAA mgl^{-1} ۱ بیشترین تاثیر را در تولید کالوس داشت. (قسمتهای آبی با Abstract انگلیسی هماهنگ شود)

گل‌واژگان: ژینکو بیلوبا، کشت بافت، مریستم انتهایی، کالوس، هورمون‌های گیاهی

Downloaded from jmp.ir at 3:18 +0430 on Tuesday May 22nd 2018

مقدمه

گیاه ژینکو بیلوبا یکی از پرمصرف‌ترین گیاهان دارویی دنیا می‌باشد. درخت ژینکوبیلوبا تنها عضو خانوادهٔ ژینکوآسه[1] می‌باشد که حدود دویست میلیون سال پیش در دوران ژوراسیک[2] ظاهر شد و قدیمی‌ترین گونهٔ درختی موجود روی زمین است و به همین دلیل آن‌را فسیل زنده می‌نامند. درختان ژینکو گاهی تا ۱۰۰۰ سال عمر می‌کند، در چین، فرانسه و آمریکا حدود ۸۰۰۰ تن برگ خشک در هر سال از آنها برداشت می‌شود. این گیاه بومی کشور چین است و در نواحی که سایر درختان به سختی رشد می‌کند، به راحتی رشد می‌کند، به آلودگی‌های قارچی و نیز حشرات مقاوم است [۱]. نام علمی آن *Ginkgo biloba* L. از دو کلمه ژینکو که در زبان چینی به معنای آلو مانند و بیلوبا که در متون علمی به معنای برگ‌های قلبی شکل تشکیل شده است [۲].

سیستم آوندی ژینکو نسبتاً ابتدایی است و رگبرگ‌ها به دو دسته تقسیم می‌شود که فقط در ژینکو مشاهده شده است [۳]. در طبقه‌بندی گیاهی در زیرشاخه بازدانگان[3] شاخه ژینکوفیتا[4] و رده ژینکوآ[5] و راسته ژینکوآل[6] قرار دارد و تنها بازمانده خانواده ژینکوآسه[7] است [٤]. ژینکو گیاهی دو پایه و خزان‌کننده است، جنس ماده فقط در حضور جنس نر بارور می‌شود و پس از ۳۰ تا ٤۰ سال برای اولین بار اندام‌های زایشی نر و ماده در آنها تولید می‌شود [۱،۵].

ارتفاع این درخت به بیش از ۳۵ متر و قطر تنه آن بین ۳ تا ٤ متر و گاهی تا ۷ متر هم می‌رسد، میوه گیاه از نوع شفت است [٦]. تولیدمثل در فصل بهار صورت گرفته و گل نر و ماده هر دو روی زمین افتاده و پرچم نر توسط مژک به سمت گل ماده روی زمین حرکت می‌کند. گل‌های نر و ماده جدا از هم به روی پایه‌های جداگانه قرار دارند. این گونه دارای دو سری کرموزوم جنسی به صورت جنس ماده (XX) و جنس نر (XY) است [۷].

[1] Ginkgoaceae
[2] Jurassic
[3] Gymnosperms
[4] Ginkgophyta
[5] Ginkgoae
[6] Ginkgoales
[7] Ginkgoaceae

عصاره ژینکو[1] با افزایش الاستیسته رگ‌ها جریان خون را افزایش می‌دهد، تحقیقات نشان می‌دهد که عصاره ژینکو سبب تسریع انتقال اکسیژن و قند به سیستم عصبی می‌شود و نیز به عنوان آنتی‌اکسیدانت در ترمیم بافت‌های صدمه دیده در سلول‌های نگهدارنده موثر است. ژینکو در بهبود آلزایمر مخصوصاً در اوایل بیماری مفید است و تحقیقات نشان داده است که عصاره ژینکو با افزایش جریان خون در مغز سبب تقویت حافظه می‌شود، این گیاه در درمان و بهبود سرگیجه، زنگ زدن گوش، سردردهای میگرنی، اضطراب، افسردگی و زوال عقل (آلزایمر)، درمان ناتوانی جنسی[2] کاربرد دارد [۸].

چمپر[3] و همکارانش (۱۹۹۷) با کشت بافت ریزنمونه‌های ژینکو (جنین و یا جنین همراه با لپه‌ها و بافت کوتیلدون) در محیط کشت MS با غلظت‌های مختلفی از 2,4- D یا NAA و BA در نور دریافت که هر سه ریزنمونه، کالوس تولید کردند و جنین همراه با کوتیلدون بیشترین تولید کالوس را داشت.

در تحقیق دیگری تولید و کشت کالوس و کنترل قهوه‌ای شدن کالوس از طریق ریزنمونه‌های برگی ژینکو، مورد بررسی قرار گرفت که معلوم شد محیط MS با مکمل‌های BA (۱ میلی‌گرم بر لیتر) و NAA (۳ میلی‌گرم بر لیتر) بهترین محیط کشت برای تولید و کشت کالوس است. اسید فیتیک، رشد کالوس را تقویت کرده و قهوه‌ای شدن آن را کنترل می‌کند [۹].

تحقیقاتی را یوآنلی[4] (۱۹۹۸) بر روی کشت آندوسپرم بالغ ژینکو انجام دادند. در این آزمایش‌ها کالوس از آندوسپرم ژینکوی بالغ بدون جنین بر روی محیط وایت با اکسین و یا اکسین به همراه سیتوکنین به نسبت (۰/۹ – ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر) تولید شد. بالاترین میزان تکثیر ریزنمونه‌های تولیدکننده کالوس، از طریق کشت در محیط همراه با کینیتن (۲/۷ میلی‌گرم بر لیتر) و 2,4-D (یک میلی‌گرم بر لیتر) و NAA (۲ میلی‌گرم بر لیتر) به دست آمد [۱۰].

[1] *Ginkgo biloba* Extract (GBE)
[2] Impotency
[3] Champer
[4]

Downloaded from jmp.ir at 3:18 +0430 on Tuesday May 22nd 2018

تحقیقات قائم مقامی و همکارانش (۱۳۸٤) بر روی کشت بافت ژینکو نشان داد که بهترین ریزنمونه برای کشت بافت ژینکو، ریزنمونه‌های به دست آمده از جنین است و بهترین ترکیب هورمونی برای کشت بافت ژینکو غلظت ۰/۵ میکرومول از هورمون‌های BA و NAA است. در آزمایش بعدی که هورمون‌های مختلف (Zeatin; kin; 2,4-D; BA; NAA; IBA; IAA) را مورد بررسی قرار داد، نتیجه گرفت که ترکیب دو هورمون IBA و Zeatin با غلظت ۰/۵ نسبت به بقیه ترکیبات بهتر است و آزمایش سوم نتیجه گرفت ۰/۲۵ میکرومول Zeatin و ۰/۰۱ میکرو مول IBA بهترین تیمار برای کشت درون شیشه‌ای ریزنمونه‌های درخت بالغ ژینکو است [۱۱].

مونتس[1] و همکاران (۲۰۰۱) از مقایسه کشت بافت جوانه‌های جانبی و انتهایی گیاه ژینکو (در محیط کشت MS) دریافت که فصل برداشت ریز نمونه و محل آن روی شاخه و سن آن در پاسخ به محیط کشت موثر است [۱۲].

آینویو[2] و همکاران (۱۹۹٦) پاسخ ریزنمونه‌های حاصل از دمبرگ و جنین را نسبت به هورمون‌های مختلف بررسی کردند، آنها نتیجه گرفتند که افزودن 2,4-D یا NAA در هر دو ریزنمونه سبب تشکیل کالوس سبز رنگ شد. افزودن IAA یا IBA به تنهایی جوانه‌زنی جنین‌های نابالغ را افزایش داد و جنین‌های بالغ در محیط کشت بدون هورمون جوانه زدند [۱۳].

چوی[3] و همکاران (۲۰۰۳) جنین‌های نارس کشت شده در محیط کشت MS که با مقادیر مختلف ترکیب 2,4-D، NAA، BA، زئین و یا 2,4-D به تنهایی کشت کردند. بیشترین مقدار جوانه‌های نابجا از کوتیلدون‌های جنین‌های کشت شده در مرحله قلبی شکل در محیط MS حاوی یک میلی‌گرم BA و ۰/۰۱ میلی‌گرم NAA به دست آمد و پس از بیست روز جوانه‌ها نابجا به محیط MS بدون هورمون منتقل شدند ولی تولید گیاه انجام نگرفت زیرا جوانه‌ها نتوانستند ریشه تولید نمایند [۱٤].

مواد و روش‌ها

این تحقیق در آزمایشگاه کشت بافت گروه بیوتکنولوژی پژوهشکده گیاهان دارویی جهاددانشگاهی واقع در هلجرد انجام شد، سه نوع ریزنمونه شامل برگ، دمبرگ و مریستم انتهایی ژینکو از پایه نر گیاه ۵ ساله برداشت شد و ریزنمونه‌های برگ و دمبرگ و مریستم انتهایی پس از شستشو با آب در اتانول ۷۰ درصد به مدت ۳ دقیقه ضدعفونی و سپس با آب مقطر شستشو شده و به مدت ۳۰ دقیقه در هیپوکلریت سدیم ۳ درصد قرار گرفتند و پس از آن سه مرتبه (هر مرتبه ۵ دقیقه) با آب مقطر سترون شستشو شدند. سپس قطعات برگ در ابعاد ۱۰ میلی‌متر و دمبرگ به طول ۱۰ میلی‌متر و مریستم انتهایی پس از برداشتن چند لایه پوسته اطراف مریستم کشت شدند.

کلیه مواد شیمیایی، هورمون‌های مورد استفاده برای تهیه محیط‌های کشت ساخت شرکت DUCHEFA (هلند) بود.

ویتامین‌ها به میزان لازم به محیط کشت اضافه شد و غلظت ساکاروز ۳۰ گرم در لیتر بود. در این تحقیق از هورمون‌های NAA، BAP، کینین kin و 2,4-D استفاده شد. pH محیط کشت ۵/۷ تنظیم شد. ۲۵ میلی‌لیتر محیط کشت ریخته و داخل هر پتری دیش ٦ ریز نمونه کشت شد. برای هر تیمار ۵ پتری دیش در نظر گرفته شد. سپس نمونه‌ها به ژرمیناتور در دمای ۱ ± ۲۵ درجه سانتی‌گراد و دوره نوری ۱٦ ساعت روشنائی و ۸ ساعت تاریکی که شدت نور حدود ۵۰ میکرو مول بر متر مربع در ثانیه بود، منتقل شدند. ۲۸ روز بعد از کشت درصد کالوس و وزن تر آن یادداشت شد. در این آزمایش اثر سه نوع محیط کشت WPM، B5، MS بر ریزازدیادی از سه ریز نمونه برگ، دمبرگ و مریستم انتهایی در حضور شش ترکیب هورمونی به صورت زیر بررسی شد.

$T_{1=}$ ۱mgl^{-1} BAP + ۰/۵ mgl^{-1} NAA

$T_{2=}$ ۱mgl^{-1} BAP + ۱ mgl^{-1} NAA

$T_{3=}$ ۰/۵mgl^{-1} BAP + ۱ mgl^{-1} NAA

$T_{4=}$ ۱/۵mgl^{-1} BAP + ۰/۵ mgl^{-1} NAA

$T_{5=}$ ۰/۵mgl^{-1} BAP

$T_{6=}$ ۱mgl^{-1} BAP

[1] Montes
[2] Inoue
[3] Choi

Downloaded from jmp.ir at 3:18 +0430 on Tuesday May 22nd 2018

نتایج بـر اسـاس آزمـایش فاکتوریـل برپایـه طـرح کـاملاً تصادفی مقایسه شد و با نرم‌افزار آماری MSTATC تجزیـه و تحلیل شد و مقایسه میانگین با آزمون دانکن انجام گرفت.

نتایج

نتایج کشت بافت سه ریز نمونه بـرگ، دمبـرگ و مریـستم انتهایی بر روی سه نـوع محـیط کـشت WPM، B5، MS در حضور شش تیمار ترکیب هورمونی بر باززایی نوساقه و درصد و وزن تر کالوس در ژینکوبیلوبا نشان داد که این ریزنمونـه‌هـا بر روی این محیط کشت‌ها و ترکیبات هورمونی قادر به ایجـاد نوساقه نیستند. نتایج به دست‌آمده برای درصد کـالزایی و وزن تر کالوس به شرح زیر است. برای نرمال نمودن توزیع داده‌هـا از جذر داده‌ها به علاوه نیم استفاده شد ولی در جدول مقایـسه میانگین از میانگین‌های اصلی و تبدیل نشده استفاده شد [۱۵].

درصد ریزنمونه‌های کالوس‌دارشده

جدول تجزیه واریانس برای صفت درصد ریـزنمونـه‌هـای کالوس‌دار شده (جدول شماره ۱) نشان داد که بین انواع محیط کشت، ریزنمونه و ترکیبات هورمونی اختلاف بسیار معنی‌داری وجود دارد. هم‌چنین اثر متقابل دوگانه و سه‌گانه آنها بر درصد ریزنمونه‌های کالوس‌دار شده در سطح احتمال ۱ درصد بـسیار معنی‌دار است، یعنی فاکتورها به طور مستقل از یکدیگر عمـل نکرده‌اند.

مقایسه میانگین نشان داد محـیط کـشت B5 و WPM در کلاس a و MS در کلاس b قرار گرفت. ریزنمونه مریـستم بـا ۶۳/۲ درصد بیشترین کـالزایی را سـبب شـد و محـیط کـشت MS× مریستم با ۷۱/۲ درصد بهترین درصد کالزایی را داشـت. با توجه به جوان بودن بافت مریستم چنین نتـایجی منطقـی بـه نظر می‌رسد (جدول شماره ۲).

مقایسه میانگین‌های اثر متقابـل محـیط کـشت و ترکیبـات هورمونی بر صفت درصـد ریزنمونـه‌هـای کـالوس‌دارشـده در جـدول شـماره ۳ نـشان مـی‌دهـد محـیط کـشت WPM × NAA ۱ mgl^{-1} + BAP ۰/۵ mgl^{-1} بـا ۷۹/٤ درصد بیشترین درصد کـالزایی را دارد و محـیط کـشت WPM × BAP ۱ mgl^{-1} بـا ۵/۷ درصـد کمتـرین درصـد کالزایی را نشان می‌دهد.

جدول شماره ۱ – تجزیه واریانس برای صفت درصد ریزنمونه‌های کالوس‌دار شده

منبع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات
محیط کشت (A)	۲	۰/۰۳۸**
ریزنمونه (B)	۲	۰/۵۸۷**
اثر متقابل (A×B)	٤	۰/۰۷۲**
ترکیب هورمونی (C)	۵	۰/۲۸۱**
اثر متقابل (A×C)	۱۰	۰/۰۷۵**
اثر متقابل (B×C)	۱۰	۰/۰۳٤**
اثر متقابل (A× B×C)	۲۰	۰/۰۲٦**
خطای آزمایشی	۱۰۸	۰/۰۰۱
C.V. (٪)		۳/٦٦

** دارای تفاوت بسیار معنی‌دار در سطح احتمال ۱ درصد

Downloaded from jmp.ir at 3:18 +0430 on Tuesday May 22nd 2018

جدول شماره ۲- مقایسه میانگین‌های اثر محیط کشت، ریزنمونه و اثر متقابل آنها بر صفت درصد ریزنمونه‌های کالوس‌دارشده

تیمارها	میانگین درصد کالزایی
محیط کشت B_5	٤٢/٣ a
محیط کشت MS	٣٤/٤ b
محیط کشت WPM	٤٣/٦ a
دمبرگ	٢٤/٥ c
برگ	٣٢/٧ b
مریستم	٦٣/٢a
محیط کشت B_5 × دمبرگ	٣٣/٩ e
محیط کشت B_5 × برگ	٣٧/٤ e
محیط کشت B_5 × مریستم	٥٥/٥ c
محیط کشت MS × دمبرگ	١٥/٧ g
محیط کشت MS × برگ	١٦/٤ g
محیط کشت MS × مریستم	***٧١/٢a***
محیط کشت WPM × دمبرگ	٢٣/٧ f
محیط کشت WPM × برگ	٤٤/٣ d
محیط کشت WPM × مریستم	٦٢/٨ b

جدول شماره ۳- مقایسه میانگین‌های اثر متقابل محیط کشت و ترکیبات هورمونی بر صفت درصد ریزنمونه‌های کالوس‌دارشده

تیمارها	میانگین درصد کالزایی (درصد)
محیط کشت B5 × ١mgl^{-1} BAP + ٠/٥ mgl^{-1} NAA	٦٨/٨ b
محیط کشت B5 × ١mgl^{-1} BAP + ١ mgl^{-1} NAA	٧٢/٦ ab
محیط کشت B5 × ٠/٥mgl^{-1} BAP + ١ mgl^{-1} NAA	٤٩/٨ c
محیط کشت B5 × ١/٥mgl^{-1} BAP + ٠/٥ mgl^{-1} NAA	٢٢/١ efg
محیط کشت B5 × ٠/٥mgl^{-1} BAP	١٩/٧ fg
محیط کشت B5 × ١mgl^{-1} BAP	٢٠/٦ fg
محیط کشت MS × ١mgl^{-1} BAP + ٠/٥ mgl^{-1} NAA	٢٧/٥ ef
محیط کشت MS × ١mgl^{-1} BAP + ١ mgl^{-1} NAA	٥٠/٢ c
محیط کشت MS × ٠/٥mgl^{-1} BAP + ١ mgl^{-1} NAA	٤٧/٨ c
محیط کشت MS × ١/٥mgl^{-1} BAP + ٠/٥ mgl^{-1} NAA	٣٦/١ d
محیط کشت MS × ٠/٥mgl^{-1} BAP	١٤/٩ gh
محیط کشت MS × ١mgl^{-1} BAP	٣٠/٠ de
محیط کشت WPM × ١mgl^{-1} BAP + ٠/٥ mgl^{-1} NAA	٤٥/٥ c
محیط کشت WPM × ١mgl^{-1} BAP + ١ mgl^{-1} NAA	٤٩/٩ c
محیط کشت WPM × ٠/٥mgl^{-1} BAP + ١ mgl^{-1} NAA	***٧٩/٤ a***
محیط کشت WPM × ١/٥ mgl^{-1} BAP + ٠/٥ mgl^{-1} NAA	٧٢/٣ ab
محیط کشت WPM × ٠/٥ mgl^{-1} BAP	٨/٩ hi
محیط کشت WPM × ١mgl^{-1} BAP	٥/٧ i

Downloaded from jmp.ir at 3:18 +0430 on Tuesday May 22nd 2018

مقایسه میانگین‌های اثر متقابل ریزنمونه و ترکیبات هورمونی بر صفت درصد ریزنمونه‌های کالوس‌دارشده در جدول شماره ٤ نشان می‌دهد اثر متقابل مریستم به همراه ۱ mgl^{-1} BAP + ۱ mgl^{-1} NAA با ۹۷/۱ درصد در کلاس a قرار می‌گیرد.

وزن تر کالوس

جدول تجزیه واریانس برای صفت وزن تر کالوس (جدول شماره ۵) نشان می‌دهد که از نظر این صفت بین انواع محیط کشت، ریزنمونه‌ها و ترکیبات هورمونی اختلاف بسیار معنی‌داری وجود دارد. همچنین اثر متقابل دوگانه و سه‌گانه آنها بر صفت وزن تر کالوس در سطح احتمال ۱ درصد بسیار معنی‌دار شده است، یعنی فاکتورها به طور مستقل از همدیگر عمل نکرده‌اند.

مقایسه میانگین‌ها نشان داد که ریزنمونه مریستم در محیط کشت MS با تولید ۸/۱۰۳ گرم کالوس بهترین کالزایی را دارد.

جدول شماره ٤- مقایسه میانگین‌های اثر متقابل ریزنمونه و ترکیبات هورمونی بر صفت درصد ریزنمونه‌های کالوس‌دارشده

تیمارها	میانگین درصد کالزایی (درصد)
دمبرگ × ۱ mgl^{-1} BAP + ۰/۵ mgl^{-1} NAA	۳۰/۱ fg
دمبرگ × ۱mgl^{-1} BAP + ۱ mgl^{-1} NAA	۳۰/۱ fg
دمبرگ × ۰/۵mgl^{-1} BAP + ۱ mgl^{-1} NAA	۳۵/۰ ef
دمبرگ × ۱/۵mgl^{-1} BAP + ۰/۵ mgl^{-1} NAA	۲۰/۹ hi
دمبرگ × ۰/۵mgl^{-1} BAP	۱۲/۵ jk
دمبرگ × ۱mgl^{-1} BAP	۱۸/۱ ij
برگ × ۱mgl^{-1} BAP + ۰/۵ mgl^{-1} NAA	٤۱/۰ de
برگ × ۱mgl^{-1} BAP + ۱ mgl^{-1} NAA	٤۵/۵ d
برگ × ۰/۵mgl^{-1} BAP + ۱ mgl^{-1} NAA	٦۵/۸ c
برگ × ۱/۵mgl^{-1} BAP + ۰/۵ mgl^{-1} NAA	۳۹/۱ de
برگ × ۰/۵mgl^{-1} BAP	٤/۸ kl
برگ × ۱mgl^{-1} BAP	۰/۰ l
مریستم × ۱mgl^{-1} BAP + ۰/۵ mgl^{-1} NAA	۷۰/۷ bc
مریستم × ۱ mgl^{-1} BAP + ۱ mgl^{-1} NAA	***۹۷/۱ a***
مریستم × ۰/۵mgl^{-1} BAP + ۱ mgl^{-1} NAA	۷٦/۳ b
مریستم × ۱/۵mgl^{-1} BAP + ۰/۵ mgl^{-1} NAA	۷۰/۵ bc
مریستم × ۰/۵mgl^{-1} BAP	۲٦/۳ gh
مریستم × ۱mgl^{-1} BAP	۳۸/۲ def

Downloaded from jmp.ir at 3:18 +0430 on Tuesday May 22nd 2018

جدول شماره ۵- مقایسه میانگین‌های اثر محیط کشت، ریزنمونه و اثر متقابل آنها بر صفت وزن تر کالوس

تیمارها	وزن تر کالوس (g)
محیط کشت B_5	۲/۸۹٦ b
محیط کشت MS	***۵/۸۷۵ a***
محیط کشت WPM	***۵/۹٦۵ a***
دمبرگ	٤/۹۵۳ b
برگ	۳/۲۲۳ c
مریستم	***٦/۵٦a***
محیط کشت B_5 × دمبرگ	۳/۰۷۸ b
محیط کشت B_5 × برگ	۱/۲۳۹ f
محیط کشت B_5 × مریستم	٤/۳۷ d
محیط کشت MS × دمبرگ	۵/۸۹۷ c
محیط کشت MS × برگ	۳/٦۲٤ e
محیط کشت MS × مریستم	***۸/۱۰۳a***
محیط کشت WPM × دمبرگ	۵/۸۸۳ c
محیط کشت WPM × برگ	٤/۸۰۵ d
محیط کشت WPM × مریستم	۷/۲۰۸ b

مقایسه میانگین‌های اثر متقابل محیط کشت و ترکیبات هورمونی بر صفت وزن تر کالوس نشان می‌دهد که محیط کشت MS به همراه (۱ mgl^{-1} BAP + ۱ mgl^{-1} NAA) با ۱۰/٤٤۲ گرم بیشترین تولید را برای وزن تر کالوس دارد. مقایسه میانگین‌های اثر متقابل ریزنمونه و ترکیبات هورمونی بر صفت وزن تر کالوس نشان داد که اثر متقابل مریستم × (۱/۵mgl^{-1} BAP + ۰/۵ mgl^{-1} NAA) با ۹/۹۹۳ گرم و اثر متقابل مریستم × (۱ mgl^{-1} BAP + ۱ mgl^{-1} NAA) با ۹/۸٤ گرم در کلاس a قرار دارند.

بحث و نتیجه‌گیری

با توجه به نتایج به دست آمده به نظر می‌رسد گیاه ژینکو بیلوبا یک گیاه ریکالسیترانت باشد، یعنی این گیاه توانایی تولید نوساقه را در محیط کشت ندارد، با این‌حال استفاده از ریزنمونه مریستم انتهایی به همراه ۱mgl^{-1} BAP + ۱ mgl^{-1} NAA برای تولید کالوس از طریق کشت بافت بسیار موثر است. هم‌چنین محیط کشت WPM به همراه ۰/۵mgl^{-1} BAP + ۱ mgl^{-1} NAA بیشترین اثر را در تولید کالوس دارد که شبیه نتایج آزمایش شین[1] و همکارانش (۱۹۹٤) بود [۳] و محیط کشت MS با به کار بردن ترکیب هورمونی مناسب می‌تواند مفید باشد. مقادیر مناسب ترکیبات اکسین به خصوص NAA تاثیر خوبی در رشد کالوس دارد، کنتین و BAP در مقادیر پایین (نیم میکرومول در لیتر) در رشد کالوس تاثیر دارند. اثر متقابل ریزنمونه مریستم در محیط کشت MS که با یک میلی‌گرم در لیتر NAA به همراه یک میلی‌گرم در لیتر BAP تیمار شده بیشترین تاثیر را در تولید کالوس دارد، بنابراین پیشنهاد می‌شود تحقیقات بعدی با توجه به نتایج این تحقیق طراحی شده تا شرایط تولید گیاهچه ژینکو بیلوبا در شرایط In Vitro مشخص شود.

[1] Sheen

تشکر و قدردانی

از کلیه همکاران عزیز به خصوص مسؤولین محترم پژوهشکده گیاهان دارویی جهاددانشگاهی که برای اجرای این طرح حمایت و پشتیبانی داشته‌اند، تقدیر وتشکر می‌شود.

منابع

1. Kristian S and Koji N. Chemistry and biology of terpene trilactones from *Ginkgo Biloba*. *Angew. Chem.* 2004; 43 (13): 1640 - 58.

2. Ghahreman A. *Plant systematics; Cormophytes of Iran*. 2nd ed. Iran University Press. Tehran. 1990, vol. 1, pp: 156 - 7.

3. Sheen MJ, Wang YN and Chiang CH. Tissue culture of *Ginkgo biloba*. *Quart. J. Exp. forest Nat.* 1994; 8 (1): 127 - 47.

4. Campbell C. Plant Systematics: A Phylogenetic Approach. 2nd ed. 2002, pp: 207 - 8.

5. Mozaffarian V. *A dictionary of Iranian plant names*. Farhang Moaser. Iran. 1996, pp: 246 - 7.

6. Mirheydar H. Herbal information: usage of plants in prevention and treatment of diseases. Islamic Culture Publishing Center. Tehran. 1996, vol. 4: pp: 195 - 202.

7. Champer ND, Coker PS, Wedge DE and Keese RJ. In vitro culture of Ginkgo. *In Vitro cell Dev. Biol. Plant* 1997; 33: 125 - 7.

8. Bajaj YPS. Biotechnology in agriculture and forestry 26. Medicinal and aromatic plants VI. Springer-Verlag, Berlin/Heidelberg. 1994; pp: 136 - 45.

9. Xuesen C, Xiuxin D and Wencai Z. Studies on in vitro culture and flavonoid production of *Ginkgo biloba* L. The effects of medium on callus inducing and browning. *Sci. Agri. Sinica.* 1997; 30 (6): 55 - 60.

10. Yuanli W. In vitro culture of the mature endosperm of *Ginkgo biloba* L. and cytohistological studies. *J. Fruit Sci.* 1998; 15 (4): 327 - 31.

11. Ghaem maghami SA and Labafi Y. Determination of suitable hormonal combination and concentration for *in vitro* culture of mature *Ginkgo biloba* explants. *J. Agric. Sci. Natur. Resour*. 2005; 12 (1): 137 - 46.

12. Montes-Lopez JJ and Rodriguez-de la O JL. In vitro establishment and sprouting of axillary buds and shoot apex of ginkgo (*Ginkgo biloba*). *Revista Chapingo Serie Hortic.* 2001; 7 (1): 49 - 59.

13. Inoue H, Sato S, Kamoda S, Terada T and Saburi Y. Hormonal responses of petioles and embryos in *Ginkgo biloba* cultures. *Bull. Tokyo Univ. For.* 1996; 96: 119 - 23.

14. Choi PS, Cho DY and Soh WY. Shoot organogenesis from immature zygotic embryo cutures of *Ginkgo biloba*. *Biol. Plantarum* 2003; 47 (2): 309 - 12.

15. Yazdi Samadi B, Rezaei A and Valyzadeh M. Statistical designs in agricultural research. 1st ed. University of Tehran Press. Tehran. 1997, pp: 764 - 5.

Downloaded from jmp.ir at 3:18 +0430 on Tuesday May 22nd 2018