نشریه پژوهش‌های تولید گیاهی
جلد بیست و یکم، شماره چهارم، ۱۳۹۳
http://jopp.gau.ac.ir

بهینه‌سازی باززایی مستقیم و با واسطه پینه جاتروفا (*Jatropha curcus*) به روش اندام‌زایی درون شیشه‌ای

فاطمه فخرالدین‌نژاد[۱]، *مهناز اقدسی[۲]، کامبیز مشایخی[۳] و مهناز خلفی[۴]

[۱]دانشجوی کارشناسی‌ارشد گروه فیزیولوژی گیاهی، دانشگاه گلستان، [۲]استادیار گروه زیست‌شناسی، دانشگاه گلستان، [۳]دانشیار گروه باغبانی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، [۴]استادیار گروه آمار، دانشگاه گلستان

تاریخ دریافت: ۱۳۹۱/۱۲/۱۳ ؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۳/۲/۱۷

چکیده

جاتروفا (*Jatropha curcas* L.) گیاهی متعلق به خانواده فرفیون است که از نظر اقتصادی و دارویی اهمیت فراوانی دارد. در بذر این گیاه مقادیر زیادی روغن وجود دارد. مقدار روغن بذر این گیاه از ٤ تا ٤٠ درصد متغیر است که در تهیه سوخت‌زیستی، شمع، واکس، گریس و صابون مورد استفاده قرار می‌گیرد. تکثیر این گیاه با بذر به‌علت جوانه‌زنی اندک آن چندان مورد توجه نمی‌باشد. در حال حاضر استفاده از کشت بافت روش مناسبی برای تکثیر گیاهانی است که دوره کشت طولانی داشته و یا ازدیاد آن‌ها با مشکلاتی همراه است. هدف از مطالعه حاضر بهینه‌سازی کشت‌بافت گیاه جاتروفا به‌منظور باززایی آن است. بدین منظور آزمایش در قالب طرح کاملا تصادفی در ۹ تکرار انجام گرفت. در این تحقیق اثر غلظت‌های مختلف (۰، ۰/۲۵، ۰/۵، ۱، ۱/۵، ۲ و ۳ میلی‌گرم در لیتر) تنظیم کننده رشد گیاهی ٦- بنزیل‌آدنین (BA) و اسید ایندول-۳-بوتیریک (IBA) بر پینه‌زایی ریزنمونه‌های برگ، دمبرگ و ساقه بررسی شده است. همچنین اثر غلظت‌های مختلف BA (۰/۵، ۱، ۲ و ۳ میلی‌گرم در لیتر) و IBA (۰، ۰/۲۵، ۰/۵، ۱، ۱/۵، ۲ و ۳ میلی‌گرم در لیتر) بر شاخه‌زایی گیاه در محیط کشت MS بررسی شده است. به‌منظور ریشه-زایی، شاخساره‌های تولید شده در محیط کشت حاوی غلظت‌های مختلف ۰/۵، ۱، ۱/۵ و ۲

*مسئول مکاتبه: m.aghdasi@gu.ac.ir

Archive of SID
www.SID.ir

میلی‌گرم در لیتر IBA قرار گرفتند. نتایج حاصل نشان داد که استفاده از ترکیب BA و IBA بر پینه‌زایی ریزنمونه‌ها بسیار مؤثر است. بالاترین درصد پینه‌زایی در ریزنمونه ساقه در محیط کشت حاوی ۲ میلی‌گرم در لیتر BA و ۱ میلی‌گرم در لیتر IBA دیده شد. بیشترین تعداد شاخساره در محیط کشت حاوی ۰/۵ و ۰/۲۵ میلی‌گرم در لیتر BA و IBA دیده شد. همچنین بیشترین تعداد ریشه نیز در محیط کشت حاوی غلظت ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر IBA مشاهده شده است. در نهایت گیاهچه‌های تولید شده به خاک انتقال یافتند. همچنین بررسی باززایی شاخساره با تشکیل پینه در ریزنمونه‌های برگ، دمبرگ و ساقه نشان داد که حداکثر تشکیل شاخساره (٦٤ درصد) در ریزنمونه دمبرگ در غلظت ۰/۵ و ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر BA و IBA بوده و ریزنمونه برگ نیز در غلظت ۳ و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BA و IBA ماکزیمم تشکیل باززایی شاخساره (٥٦ درصد) را نشان داده است.

واژه‌های کلیدی: باززایی، پینه، تنظیم‌کننده رشد گیاهی، جاتروفا، کشت بافت

مقدمه

جاتروفا (*Jatropha curcus*) گیاهی درختی متعلق به خانواده فرفیون است (دیواراکا و همکاران، ۲۰۱۰). این گیاه در فقیرترین خاک‌های سنگی و حتی در شکاف صخره‌ها قادر به رشد بوده و نسبت به دوره‌های طولانی خشکی مقاوم است (کومار و شارما، ۲۰۰۸). جاتروفا خواص دارویی فراوان و ارزش اقتصادی بالایی دارد و به‌علت داشتن بذر روغنی مورد توجه جهانیان قرار گرفته است (راجور و بارتا، ۲۰۰۷ و تی و همکاران، ۲۰۱۲). ساختار این روغن گیاهی به سوخت دیزل شباهت داشته و قابلیت جایگزینی سوخت‌های فسیلی را دارد (میسرا و میسرا، ۲۰۱۰). اسید چرب غیراشباع ۷۸ تا ٨٤ درصد روغن این گیاه را می‌سازد که آن را برای تولید سوخت‌زیستی مناسب می‌سازد (نایاک و پاتل، ۲۰۱۰). روغن گیاه علاوه‌بر تولید سوخت‌زیستی، کاربردها و مصارف فراوانی دارد. علاوه‌بر این روغن این گیاه قابلیت حشره‌کشی داشته و در هند و برخی کشورها در ساخت صابون مورد استفاده قرار می‌گیرد (راجور و بارتا، ۲۰۰۷). همچنین این روغن در درمان بیماری‌های پوستی (کومار و شارما، ۲۰۰۸)، درد سیاتیک و فلج مؤثر بوده و منبع قابل اطمینانی برای درمان رماتیسم، خارش، جذام، اگزما، عفونت قارچی، اسهال خونی مزمن، خودداری، دردهای شکمی، کم‌خونی و بیماری‌های قلبی است

Archive of SID

www.SID.ir

(راجور و بارتا، ۲۰۰۷). وجود بعضی از ترکیبات (کورکاسیلین A) با فعالیت ضدتوموری نیز در این گیاه گزارش شده است (کومار و شارما، ۲۰۰۸). از طرفی اثرات ضد ویروسی گیاه در برابر هپاتیت B نشان داده شده است (کوندامویی و همکاران، ۲۰۰۹). علاوه‌بر خواص دارویی، جاتروفا گونه‌ای عالی برای برنامه‌ریزی و ایجاد جنگل‌های مصنوعی است (راجور و بارتا، ۲۰۰۵).

تکثیر گیاه جاتروفا از طریق بذر و قلمه صورت می‌گیرد. به‌دلیل پدیده دگرگرده افشانی تنوع ژنتیکی فراوانی در بذر این گیاه دیده می‌شود (خورانا کائول و همکاران، ۲۰۱۰). به‌طور طبیعی تکثیر این گیاه از طریق بذرهای هتروزیگوت صورت می‌گیرد که در نهایت سبب می‌شود که میزان روغن بذر این گیاه از ٤ تا ٤٠ درصد در پایه‌های مختلف متغیر باشد (جها و همکاران، ۲۰۰۷). در حال حاضر تکثیر جاتروفا به‌دلیل توان پایین جوانه‌زنی بذر وریشه‌زایی کم قلمه‌ها با مشکلات فراوانی همراه است (مازومدار و همکاران، ۲۰۱۰). در حال حاضر در برخی کشورها تحقیقاتی در زمینه تکثیر این‌گیاه به طریق کشت بافت در جریان است. سوجاتا و موکاتا (۱۹۹٦) با استفاده از ریزنمونه‌های برگ، دمبرگ و هیپوکوتیل در محیط کشت پایه موراشیگ و اسکوگ (MS حاوی) ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر بنزیل‌آدنین (BA) و ۱ میلی‌گرم در لیتر اسید ایندول-۳- بوتیریک (IBA) موفق به تولید شاخساره شدند. پورکایاستا و همکاران (۲۰۱۰) نیز با افزودن ۰/۵ و ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر BA و اسیدجیبرلیک (GA_3) به محیط کشت MS تولید شاخساره را در ریزنمونه ساقه القا کردند. کاوپو و تکاتو (۲۰۱۰) تولید اندام‌های نوپدید را بر روی پینه‌های حاصل از کشت ریزنمونه اپی‌کوتیل و هیپوکوتیل به‌ترتیب در محیط کشت MS حاوی ۰/۵ و ۰/۲۵ میلی‌گرم در لیتر کینتین (Kin) و تیدیازورون (TDZ) و نیز ۰/۵ و ۰/۲۵ میلی‌گرم در لیتر IBA و Kin گزارش دادند. عده‌ای از محققین نیز با افزودن ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر TDZ، ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BA و ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر IBA به محیط کشت موفق شدند تا باززایی مستقیم شاخساره را در ریزنمونه‌های جوانه و برگ‌های بالغ گیاهان تحریک کنند (دئور و جانسون، ۲۰۰۸). کومار و همکاران (۲۰۱۰) با قراردادن ریزنمونه‌های دمبرگ لپه‌ای در محیط کشت MS حاوی ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر TDZ، ۲ میلی‌گرم در لیتر Kin و ۱ میلی‌گرم در لیتر BA و ۱ میلی‌گرم در لیتر نفتالین اسید استیک (NAA) سبب القاء مستقیم شاخساره شدند. تپسامران و همکاران (۲۰۰٦) با قرار دادن جوانه‌های جانبی در محیط کشت MS حاوی ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BA و ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر IBA تشکیل جوانه‌های نوپدید را القاء کردند. داتا و همکاران (۲۰۰۷) با استفاده از ریزنمونه‌های گره در محیط کشت MS حاوی ۵ میلی‌گرم در لیتر BA، ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر Kin،

Archive of SID

www.SID.ir

۰/۱ میلی‌گرم در لیتر IBA و ۱۰-۵ میلی‌گرم در لیتر آدنین سولفات موفق به تولید مستقیم شاخساره شدند. خورانا کائول و همکاران (۲۰۱۰) افزودن ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر TDZ، ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر IBA، ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BA، ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر GA_3 و ۰/۱۵ میلی‌گرم در لیتر سولفات مس به محیط کشت MS با استفاده از ریزنمونه‌های برگ، باززایی مستقیم شاخساره را فراهم نمودند. کاوپو و همکاران (۲۰۰۹) با استفاده از ریزنمونه‌های ساقه، جوانه جانبی و جوانه راسی در محیط کشت MS حاوی ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BA و ۰/۲۵ میلی‌گرم در لیتر IBA تولید بیشترین تعداد جوانه نوپدید را فراهم نمودند.

امروزه استفاده از روش کشت بافت به‌منظور تولید انبوه گیاهان مورد توجه فراوان قرار گرفته است. با توجه به ارزش اقتصادی بالای گیاه جاتروفا در تولید سوخت‌زیستی و استفاده از این گیاه در برنامه‌های جنگل‌کاری در خاک‌های فقیر، در این تحقیق سعی شده است تا برای اولین بار در ایران با استفاده از روش کشت بافت تولید پینه و در نهایت باززایی با واسطه و یا باززایی مستقیم این گیاه را بهینه سازیم.

مواد و روش‌ها

شرایط کشت: بذرها گیاه جاتروفا رقم ماتانسیس از کمپانی تولید بذر (AUM Consultancy Company) از کشور هند خریداری شد. سپس بذرها روی خاک سبک کشت شدند. جوانه‌زنی بذرها پس از گذشت تقریباً ۱۰ روز آغاز شد. آزمایش به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملا تصادفی انجام شد. اثرات اصلی شامل نوع تنظیم کننده رشد (IBA و BA)، غلظت تنظیم کننده‌های رشد (۰، ۰/۲۵، ۰/۵، ۱، ۱/۵، ۲ و ۳ میلی‌گرم در لیتر) و نوع ریزنمونه (دمبرگ، برگ و ساقه) بود.

به‌منظور بررسی پینه‌زایی، ریزنمونه‌های برگ، دمبرگ و ساقه از گیاهان ۳ ماهه جدا و درون دستگاه لامینار ایرفلو به مدت ۱۳ دقیقه در آب ژاول ۲۰ درصد ضدعفونی و سپس ۵-۳ بار با آب مقطر استریل شستو شدند. پس از ضدعفونی، ریزنمونه‌ها به پتری دیش‌های حاوی محیط کشت انتقال یافتند. برای هر تیمار ۹ ظرف و در هر ظرف ۵ ریزنمونه قرار داده شد. ظروف کشت شده به اتاق رشد با دمای ۲±۲۵ درجه سانتی‌گراد و رژیم نوری ۱٦ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی انتقال داده شدند. عملیات واکشت پس از هر ۲۰ روز انجام گرفت. پس از دو ماه درصد پینه‌زایی، شکل، اندازه ظاهری، رنگ پینه‌ها و در صد باززایی مورد مطالعه قرار گرفت.

Archive of SID

www.SID.ir

به‌منظور القا شاخه‌زایی، قطعات تک‌گره گیاه جاتروفا به اندازه تقریبی ۳ سانتی‌متر در محیط کشت حاوی غلظت‌های مختلف BA (۰/۵، ۱، ۲ و ۳ میلی‌گرم در لیتر) و IBA (۰، ۰/۲۵، ۰/۵، ۱، ۱/۵، ۲ و ۳ میلی‌گرم در لیتر) کشت داده شدند. عملیات واکشت پس از هر ۲۰ روز انجام گرفت. سرانجام پس از دو ماه بهترین غلظت تنظیم‌کننده‌های رشد مورد استفاده برای تولید شاخساره تعیین شد. سپس شاخساره‌های تولید شده به محیط کشت حاوی غلظت‌های مختلف (۰/۵، ۱، ۱/۵ و ۲ میلی‌گرم در لیتر) IBA انتقال یافته تا بهترین غلظت برای ریشه‌دار شدن شاخساره‌ها مورد بررسی قرار گیرد. پس از ۳۰ روز درصدریشه‌زایی و متوسط تعداد ریشه‌های ایجاد شده در هر تیمار تعیین شد.

به‌منظور سازگاری گیاهچه‌های حاصل از کشت بافت با محیط طبیعی، گیاهچه‌ها از ظروف شیشه‌ای خارج و پس از شست و شوی آگار به ظروف پلاستیکی حاوی خاک مخلوط با ورمیکولایت و شن (۱:۱:۱) در شرایط اتاق رشد و رطوبت نسبی (۵۵ درصد–۵۰) انتقال یافته و نهایتاً به گلخانه منتقل شدند.

آنالیز آماری داده‌ها توسط نرم‌افزار SPSS انجام گرفت. از تجزیه و تحلیل طرح فاکتوریل خرد شده، طرح یک عاملی، طرح فاکتوریل و آزمون دقیق فیشر جهت مشخص نمودن اختلافات معنی‌دار بین نتایج استفاده شد. نمودارها در نرم‌افزار Excel رسم گردیدند.

نتایج و بحث

تولید پینه از ریزنمونه برگ، ساقه و دمبرگ: از بین ٤٩ تیمار مورد استفاده، در ٤٢ تیمار حداقل در یک نوع ریزنمونه پینه‌زایی مشاهده شد. نتایج به‌دست آمده از بررسی اثر تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی نشان داد که هیچ یک از غلظت‌های استفاده شده IBA به تنهایی پینه‌زایی را در ریزنمونه‌ها تحریک نکرد. همچنین BA نیز به تنهایی در هیچ یک از غلظت‌های به‌کار رفته قادر به تحریک پینه‌زایی در ریزنمونه برگ نبود. در حالی‌که ریزنمونه‌های دمبرگ و ساقه در این غلظت‌ها پینه تولید کردند. توان متفاوت در تولید پینه در بین ریزنمونه‌های مورد بررسی ممکن است به‌علت فعالیت مریستمی سلول‌های سازنده آن‌ها باشد (کاوپو وتکائو، ۲۰۱۰). نتایج تحقیقات دیگر محققان نیز نشان داده که ریزنمونه برگ نسبت به ریزنمونه‌های جوانه راسی و دمبرگ توان پینه‌زایی پایین‌تری در تیمارهای مختلف BA، IAA و NAA دارد (ورما و گائور، ۲۰۱۱).

Archive of SID

www.SID.ir

رنگ پینه‌های تولیدشده در ریزنمونه‌های دمبرگ سفید مایل به سبز، سبز روشن و سبز تیره و رنگ پینه‌های حاصل از ریزنمونه‌های ساقه سبز روشن و سبز تیره بود (شکل ۱).

نتایج حاصل از جدول تجزیه واریانس طرح فاکتوریل خرد شده (جدول ۱) نشان داد که اثر ریزنمونه در سطح ۱ درصد معنی‌دار است. به‌عبارتی بین ریزنمونه‌های برگ، دمبرگ و ساقه در توانایی ایجاد پینه اختلاف معنی‌داری وجود دارد. به‌علاوه اثر متقابل BA و IBA، اثر متقابل BA و ریزنمونه، اثر متقابل IBA و ریزنمونه و اثر متقابل ترکیب تنظیم‌کننده رشد (BA و IBA) و ریزنمونه بر پینه‌زایی در سطح ۱ درصد معنی‌دار است. به‌دلیل وجود اثرات متقابل، در ادامه از آزمون LSD استفاده شده است. نتایج به‌دست آمده از این آزمون نشان داد که استفاده توام BA و IBA در محیط کشت برای پینه‌زایی بسیار مؤثر بوده و درصد پینه‌زایی را در هر سه ریزنمونه افزایش می‌دهد. بیشترین درصد پینه‌زایی در ریزنمونه ساقه در غلظت‌های (۲ و ۱)، (۱/۵ و ۲)، (۱/۵ و ۱/۵) و (۱ و ۱/۵) میلی‌گرم در لیتر به‌ترتیب BA و IBA مشاهده شد (شکل ۲).

همچنین نتایج نشان داد که کاربرد غلظت‌های مختلف IBA به‌تنهایی قادر به القا پینه‌زایی در هیچ-یک از ریزنمونه‌ها نمی‌باشد. آتایا و همکاران (۲۰۱۲) نیز نشان دادند که IBA به تنهایی قادر به تحریک پینه‌زایی نمی‌باشد.

محیط کشت حاوی ۲ و ۱ میلی‌گرم در لیتر BA و IBA به‌علت درصد پینه‌زایی بالا (۹۰/٦۳ درصد) به‌عنوان تیمار مناسب جهت القا پینه‌زایی در ریزنمونه ساقه شناخته شد. ریزنمونه دمبرگ نیز در محیط کشت حاوی ۲ و ۱ میلی‌گرم در لیتر BA و IBA بیشترین درصد پینه‌زایی (۷۹/۱۱ درصد) را نشان داد. حداقل میزان پینه‌زایی نیز در ریزنمونه برگ مشاهده شد. به طوری‌که در بیشتر غلظت‌های مورد بررسی ریزنمونه برگ یا کالوس تولید نکرد و یا میزان پینه‌زایی آن بسیار اندک بود. بهترین ترکیب تنظیم‌کننده‌های رشد برای تحریک پینه‌زایی در ریزنمونه برگ غلظت (۲ و ۱) میلی‌گرم در لیتر BA و IBA شناخته شد. همچنین این نتایج نشان داد که غلظت ۲ میلی‌گرم در لیتر BA و ۱ میلی‌گرم در لیتر IBA، بهترین ترکیب تنظیم کننده رشد برای تحریک پینه‌زایی در هر سه ریزنمونه است (شکل ۳). نتایج حاضر با یافته‌های تپسامران و همکاران (۲۰۰۸) مشابهت دارد. اما در گزارش‌های آن‌ها بهترین تیمار جهت القاء پینه در ریزنمونه دمبرگ، تیمار ۱ و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BA و IBA معرفی شده است که با نتایج به‌دست آمده از ریزنمونه دمبرگ در این آزمایش مغایرت دارد. این پاسخ‌های متفاوت ممکن است به‌علت سن خاص و شرایط فیزیولوژیکی گیاه مادر که ریزنمونه از آن گرفته شده

Archive of SID

www.SID.ir

است باشد (داتا و همکاران، ۲۰۰۷). تنظیم کننده‌های رشد عواملی هستند که می‌توانند به‌طور انتخابی ژن‌های آغاز کننده تمایز سلول‌ها را در کشت تحت‌تأثیر قرار دهند (ورما و گائور، ۲۰۱۱). اثر متقابل اکسین‌ها و سیتوکینین‌ها نقشی حیاتی در تقسیم، رشد و نمو، تمایز و تشکیل ارگان‌های گیاه بازی می‌کند (شریواستاوا و بنرجی، ۲۰۰۸).

مقایسه نتایج به‌دست آمده از آزمون LSD در تیمارهای ۰/۲۵ میلی‌گرم در لیتر BA به‌همراه غلظت‌های مختلف IBA (۰، ۰/۲۵، ۰/۵، ۱، ۱/۵، ۲ و ۳ میلی‌گرم در لیتر) نشان داد که کمترین مقدار پینه‌زایی در ریزنمونه‌های دمبرگ و ساقه در غلظت ۰/۲۵ میلی‌گرم در لیتر BA دیده شده و بیشترین درصد پینه‌زایی در ریزنمونه دمبرگ و ساقه در غلظت‌های (۰/۲۵ و ۱)، (۰/۲۵ و ۱/۵)، (۰/۲۵ و ۲) و (۰/۲۵ و ۳) میلی‌گرم در لیتر BA و IBA مشاهده شده است (شکل ٤ الف).

مقایسه تیمارهای حاصل از ترکیب ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BA با غلظت‌های مختلف IBA نشان داد که کمترین مقدار پینه‌زایی در ریزنمونه‌های دمبرگ و ساقه در غلظت ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BA دیده شده و بیشترین درصد پینه‌زایی در ترکیب (۰/۵ و ۲) و (۰/۵ و ۳) میلی‌گرم در لیتر BA و IBA حاصل شده است (شکل ٤- ب).

بررسی نتایج حاصل از اثر ترکیب غلظت ۱ میلی‌گرم در لیتر BA با غلظت‌های مختلف IBA نیز نشان داد که کمترین مقدار پینه‌زایی در غلظت ۱ میلی‌گرم در لیتر BA در ریزنمونه‌های دمبرگ و ساقه حاصل می‌شود. بیشترین درصد پینه‌زایی در ریزنمونه دمبرگ و ساقه در غلظت‌های (۱ و ۰/۵) و (۱ و ۱/۵) میلی‌گرم در لیتر BA و IBA دیده می‌شود (شکل ٤- ج). همچنین نتایج نشان داد که کمترین مقدار پینه‌زایی در ریزنمونه‌های دمبرگ و ساقه در تیمار ۱/۵، ۲ و یا ۳ میلی‌گرم در لیتر BA به‌دست آمده و بیشترین درصد پینه‌زایی در ریزنمونه ساقه در ترکیب غلظت‌های (۱/۵ و ۲)، (۱/۵ و ۱/۵) و (۱/۵ و ۱)، (۲ و ۱)، (۳ و ۱/۵)، (۳ و ۲)، (۳ و ۱) و (۳ و ۳) میلی‌گرم در لیتر BA و IBA حاصل می‌شود (شکل‌های ٤-د، ٤-ه و ٤-ز).

Archive of SID

www.SID.ir

شکل ۱- پینه‌زایی ریزنمونه‌های ساقه، برگ و دمبرگ گیاه جاتروفا در محیط کشت پایه MS حاوی به‌ترتیب ۲ و ۱ میلی‌گرم در لیتر BA و IBA. الف: ساقه، ب: برگ ج: دمبرگ.

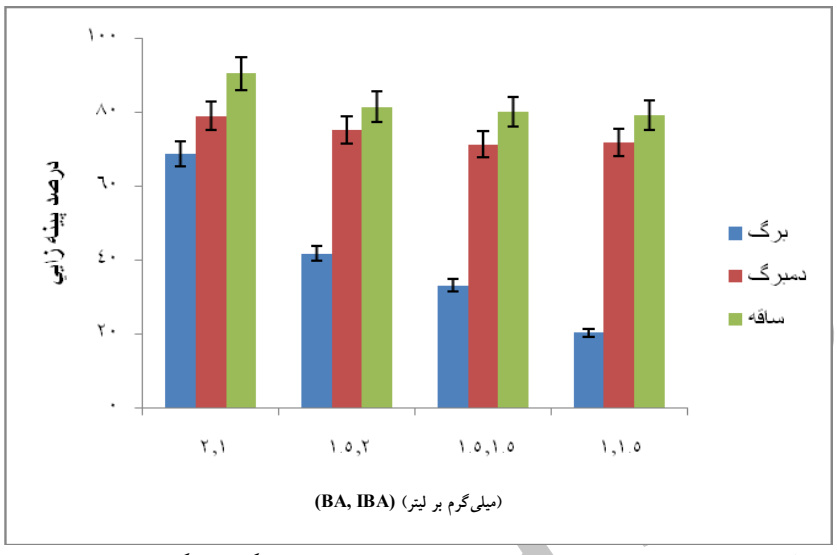
جدول ۱- تجزیه واریانس داده‌های پینه‌زایی ریزنمونه‌های برگ، دمبرگ و ساقه گیاه جاتروفا در محیط کشت پایه MS حاوی تنظیم‌کننده رشد BA و IBA.

منبع تغییر	درجه آزادی	میانگین مربعات
ریزنمونه	۲	۱۵/٤٤٦٧٨٢١٦**
تنظیم‌کننده رشد BA	٥	۱/۳٤٤۷۸۱٥۱**
تنظیم‌کننده رشد IBA	٦	۳/۲۳۷۳٤۷۱۸**
اثر متقابل BA×IBA	۳۰	۰/۲۸۷۹۷٦٥۸**
اثر متقابل BA و ریزنمونه	۱۰	۰/۰۸٥۰٦٥۲۸**
اثر متقابل IBA و ریزنمونه	۱۲	۰/۱۱۱٥۸۷٤۹**
اثر متقابل BA×IBA و ریزنمونه	٦۰	۰/۰۲۷۸۱۷۰٦**
خطا	۹۸٤	۰/۰۱۲٤۳٤۱۷

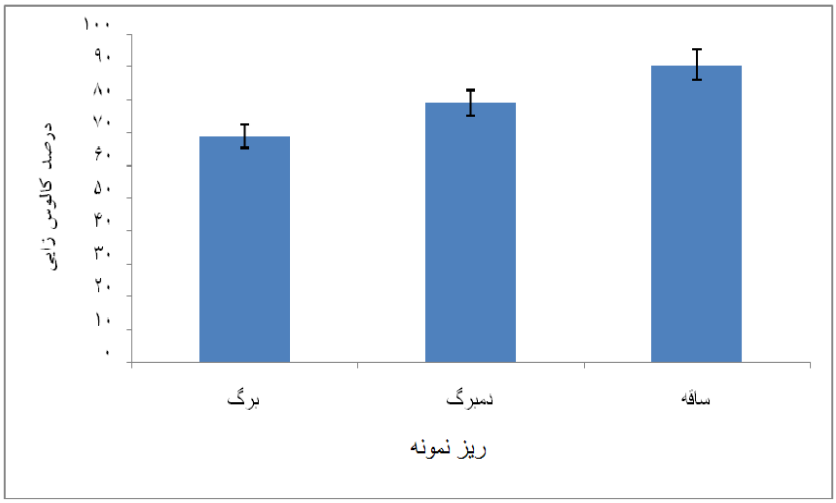
** معنی‌دار در سطح ۱ درصد.

Archive of SID

www.SID.ir

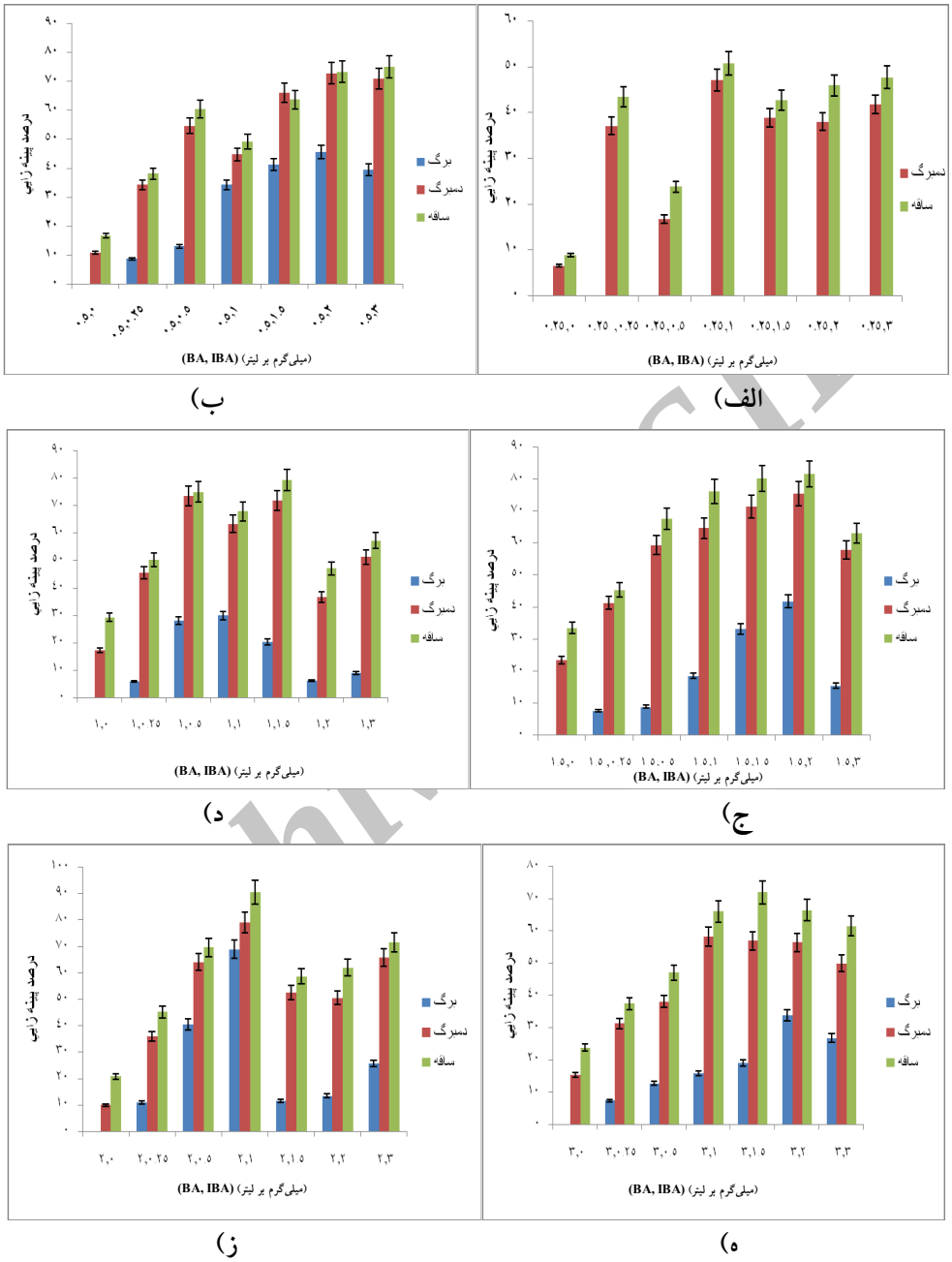


شکل ۲- اثر تنظیم‌کننده رشد BA و IBA بر پینه‌زایی ریزنمونه برگ، دمبرگ و ساقه جاتروفا.



شکل ۳- مقایسه درصد پینه‌زایی ریزنمونه برگ، دمبرگ و ساقه جاتروفا در محیط کشت MS حاوی ۲ و ۱ میلی‌گرم در لیتر BA و IBA.

www.SID.ir



شکل ٤- مقایسه درصد پینه‌زایی ریز نمونه‌های برگ، دمبرگ و ساقه در غلظت‌های مختلف BA و IBA.

www.SID.ir

باززایی شاخساره: از بین ٤٩ غلظت بررسی شده تنظیم کننده رشد BA و IBA تنها در ٢ غلظت باززایی در ریزنمونه‌ها مشاهده شد. استفاده از هر یک از تنظیم‌کننده‌های رشد BA یا IBA به تنهایی در القاء باززایی در ریزنمونه‌ها هیچ تأثیری نداشت. تنها ترکیب دو تنظیم‌کننده رشد BA و IBA القاء شاخساره را در ریزنمونه برگ و دمبرگ تحریک کرد. در ریزنمونه ساقه در هیچ‌یک از غلظت‌های مورد بررسی باززایی صورت نگرفت. اما در ریزنمونه‌های برگ و دمبرگ پس از ٤٥ روز، در دو غلظت باززایی مشاهده شد. ریزنمونه دمبرگ در غلظت ٠/٥ و ١/٥ میلی‌گرم در لیتر BA و IBA باززایی شاخساره (٦٤ درصد) را نشان داد. همچنین در ریزنمونه برگ در غلظت ٣ و ٠/٥ میلی‌گرم در لیتر BA و IBA باززایی شاخساره (٥٦ درصد) مشاهده شد (شکل ٥).

تولید شاخساره از قطعات جدا کشت گره: پس از دو ماه کشت، اکثر ریزنمونه‌های گره از نوک ایجاد شاخساره و از انتها پینه تولید کردند. نتایج حاصل از تجزیه آماری داده‌ها نشان داد که اثر غلظت‌های مختلف BA به تنهایی و نیز اثر متقابل BA و IBA بر شاخه‌زایی گیاه جاتروفا در سطح ١ درصد معنی‌دار است. اما اثر غلظت‌های مختلف IBA به تنهایی بر ایجاد شاخساره در گیاه جاتروفا در سطح ٥ درصد معنی‌دار است (جدول ٢). علاوه‌بر این نتایج حاضر نشان داد که استفاده از غلظت ٠/٥ و ٠/٢٥ میلی‌گرم در لیتر BA و IBA مناسب‌ترین تیمار برای القا شاخه‌زایی گیاه جاتروفا است (شکل‌های ٦ و ٧). همچنین بیشترین میزان شاخه‌زایی در غلظت‌های پایین‌تر ترکیب دو تنظیم‌کننده رشد BA و IBA اتفاق می‌افتد. تپسمان و همکاران (٢٠٠٨) محیط کشت MS حاوی ١ میلی‌گرم در لیتر BA را به‌عنوان محیط کشت بهینه جهت باززایی شاخساره از ریزنمونه‌های گره گزارش کردند که با یافته‌های این آزمایش هم‌خوانی ندارد. این تفاوت‌ها ممکن است به‌علت شرایط محیط کشتی باشد که ریزنمونه در آن رشد کرده است و همچنین چگونگی استریل نمودن ریزنمونه ممکن است در سطح درونی تنظیم‌کننده‌های رشد ریزنمونه تأثیر بگذارد (کاوپو و تکائو، ٢٠١٠).

القاء شاخساره به ٣ عامل نوع ریزنمونه، نوع و غلظت تنظیم‌کننده رشد وابسته است. از سه ریزنمونه مورد بررسی، در ریزنمونه ساقه در هیچ‌یک از غلظت‌های مورد بررسی باززایی صورت نگرفت. احتمالا تفاوت در فراوانی باززایی بین ریزنمونه‌ها ممکن است به‌علت توانایی تقسیم سلولی بسیار سریع بافت‌های برخی اندام‌ها نسبت به دیگر اندام‌ها باشد ولی مسلم است که حتی بافت‌های وابسته یک اندام می‌توانند پتانسیل‌های متفاوتی داشته باشند (سوجوتا و موکتا، ١٩٩٦).

Archive of SID

www.SID.ir

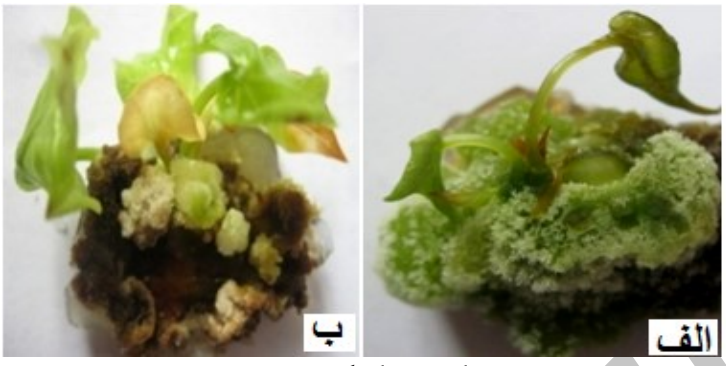
ریشه‌زایی در شاخساره‌های تولید شده در شرایط کشت بافت: به‌منظور ریشه‌زایی، شاخساره‌های تولید شده به محیط کشت حاوی غلظت‌های مختلف IBA انتقال یافتند. با توجه به آن‌که پس از گذشت ۳۵ روز از کشت در هیچ یک از شاخساره‌ها ریشه تولید نشد، پس از قطع پینه از انتهای آن‌ها شاخساره‌ها دوباره به محیط کشت حاوی غلظت‌های مختلف IBA منتقل شدند. پس از گذشت ۳۰ روز از کشت شاخساره‌ها، ریشه‌زایی صورت گرفت. سپس تعداد ریشه‌ها در هر یک از غلظت‌های تنظیم‌کننده رشد مورد بررسی شمارش شد. در ابتدا با استفاده از آزمون دقیق فیشر امکان تولید ریشه در غلظت‌های مختلف IBA مورد بررسی قرار گرفت. نتایج این آزمون نشان داد از نظر امکان تولید ریشه بین غلظت‌های مختلف مورد استفاده از IBA تفاوت معنی‌داری وجود ندارد. در مجموع نتایج به‌دست آمده نشان داد که غلظت ۰/۵ و یا ۱ میلی‌گرم در لیتر IBA می‌تواند به‌عنوان غلظت بهینه برای تحریک ریشه‌زایی در شاخساره‌ها مورد استفاده قرار داد (شکل ۸).

بعد از باززایی تا هنگامی‌که شاخساره‌های نمو یافته ریشه تولید کنند، مرحله ریزازدیادی کامل نیست. بنابراین تولید ریشه مرحله مهمی در تشکیل گیاهچه کامل است (شریواستاوا و بنرجی، ۲۰۰۸). القاء ریشه‌زایی در شاخه‌ها و قلمه‌ها عموما با تیمار اکسین صورت می‌گیرد. گزارش‌های حاضر نشان می‌دهد که IBA تنظیم کننده رشد مؤثر در ریشه‌زایی گیاه جاتروفا است (آتایا و همکاران، ۲۰۱۲). سینگ و همکاران (۲۰۰۹) غلظت ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر IBA با میزان ریشه‌زایی (٤۰ درصد) پس از ۵ هفته و تپسامران و همکاران (۲۰۰۸) محیط کشت حاوی غلظت ۱ میلی‌گرم در لیتر IBA با میزان ریشه‌زایی (۸۵/۷۱ درصد) را به‌عنوان غلظت بهینه جهت ریشه‌زایی شاخساره معرفی نمودند. همچنین کاوپو و تچاتو (۲۰۰۹) بیشترین درصد ریشه‌زایی (٦۰ درصد) را پس از ٤۰-۳۰ روز در محیط کشت حاوی غلظت ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر IBA به‌دست آوردند. اگرچه تاکنون موفقیت‌هایی در زمینه ریشه‌زایی گیاه جاتروفا به‌دست آمده اما روشن است که ریشه‌زایی شاخساره‌های گیاه جاتروفا در محیط آزمایشگاه کاملاً بهینه نبوده و نیاز به تحقیقات بیشتری دارد.

در آخرین مرحله نیز گیاهان باززایی شده به شرایط خاک انتقال یافته و میزان ماندگاری گیاهان تولید شده مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که میزان ماندگاری گیاهان در خاک ٦۳ درصد است (شکل ۹).

Archive of SID

www.SID.ir

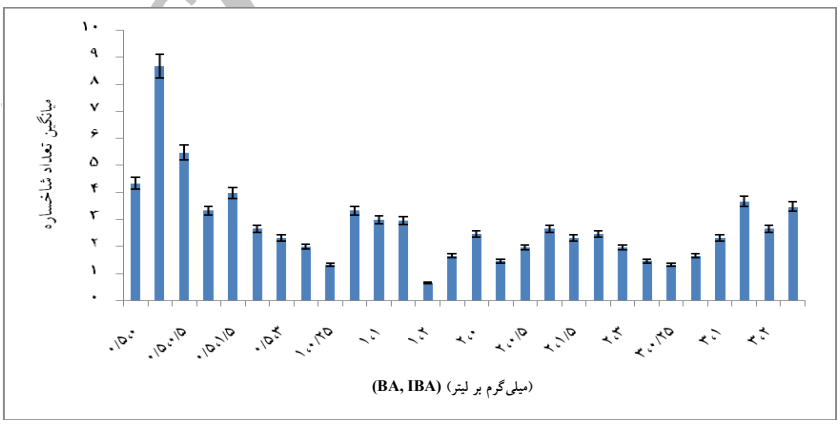


شکل ۵- باززایی شاخساره از ریزنمونه‌های برگ و دمبرگ گیاه جاتروفا. الف: باززایی شاخساره از ریزنمونه دمبرگ در غلظت ۰/۵ و ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر BA و IBA، ب: باززایی شاخساره از ریزنمونه برگ در غلظت ۳ و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BA و IBA.

جدول ۲- تجزیه واریانس مربوط به تولید شاخساره از قطعات جدا کشت گره در غلظت‌های مختلف تنظیم‌کننده رشد BA و IBA.

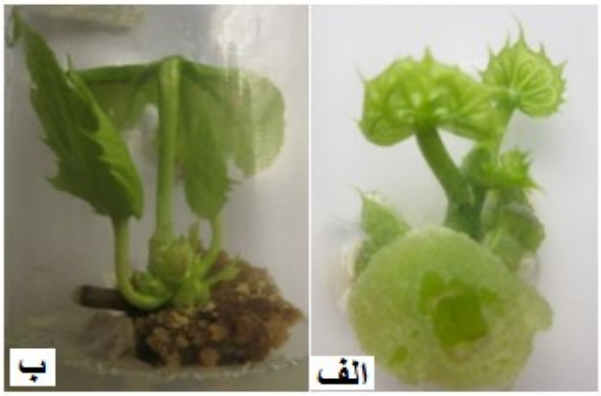
منبع تغییر	درجه آزادی	میانگین مربعات	مقدار F
تنظیم‌کننده رشد BA	۳	۲۱/٤٦٤٧٠٩٨٥	۳۲/۱۰**
تنظیم‌کننده رشد IBA	٦	۱/۹۵۹۸۰۱٤٤	۲/۹۳*
اثر متقابل BA×IBA	۱۸	۵/۵۱٤۷۳۹۲۹	۸/۲۵**
خطا	٤٤	۰/٦٦۸٦۹۵۹	

** معنی‌دار در سطح ۱ درصد، * معنی‌دار در سطح ۵ درصد.



شکل ٦- اثر غلظت‌های مختلف BA و IBA بر تولید شاخساره در ریزنمونه گره گیاه جاتروفا.

www.SID.ir

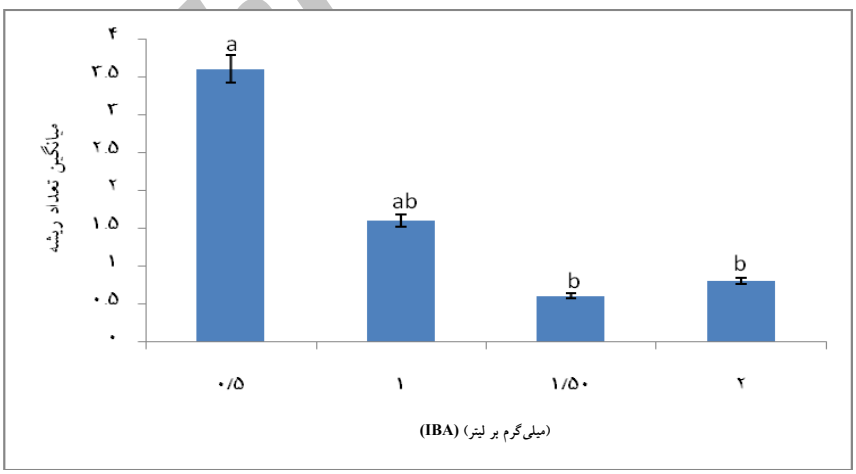


شکل ۷- تولید شاخساره و تولید پینه در ریزنمونه گره گیاه جاتروفا در غلظت ۰/۵ و ۰/۲۵ میلی‌گرم در لیتر BA و IBA. الف: پس از ۳۰ روز و ب: پس از ۵۰ روز.

جدول ۳- تجزیه واریانس مربوط به متوسط ریشه‌های تولید شده جاتروفا در محیط کشت MS حاوی غلظت‌های مختلف IBA.

منبع تغییر	درجه آزادی	میانگین مربعات
هورمون IBA	۳	۹/۳۸۳۳۳۳۳*
خطا	۱۲	۲/۳۸۳۳۳۳۳

* معنی‌دار در سطح ۵ درصد.



شکل ۸- میانگین تعداد ریشه‌های تولید شده در غلظت‌های مختلف IBA. (حروف مختلف نشان‌گر وجود اختلاف معنی‌دار بین تیمارها است.

Archive of SID

www.SID.ir

شکل ۹- الف) ریشه‌زایی در شاخساره‌های تولید شده جاتروفا در غلظت ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر IBA، ب) گیاهچه تولید شده در مرحله انتقال به خاک.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله نویسندگان مقاله از حوزه معاونت پژوهشی دانشگاه گلستان به سبب حمایت مالی جهت انجام این طرح نهایت تشکر و قدردانی را دارند.

منابع

1.Attaya, A.S., Geelen, D., and Belal, A.E.H. 2012. Progress in *Jatropha curcas* Tissue culture. Sustain. Agri. 6: 6-13.
2.Datta, M.M., Mukherjee, P., Ghosh, B., and Jha, T.B. 2007. *In vitro* clonal propagation of biodiesel plant (*Jatropha curcas* L.) Cur. Sci. 93: 1438-1442.
3.Deore, A.C., and Johnson, T.S. 2008. High-frequency plant regeneration from leaf-disc cultures of *Jatrpha curcas* L.: an important biodiesel plant. Plant Botechnol. Rep. 2: 7-11.
4.Divakara, B.N., Upadhyaya, H.D., Wani, S.P., and Laxmipathi Gowda, C.L. 2010. Biology and genetic improvement of *Jatropha curcas*. App. Energy. 87: 732-742.
5.Jha, T.B., Mukherjee, P., and Datta, M.M. 2007. Somatic embryogenesis in *Jatropha curcas*, an important biofuel. Plant Biotech. Rep. 1: 35-140.
6.Kaewpoo, M., and Te-chato, S. 2009. Influence of explants types and plant growth regulators on multiple shoot formation from *Jatropha curcas*. Sci. Asia. 35: 353-357.

Archive of SID
www.SID.ir

7.Kaewpoo, M., and Te-chato, S. 2010. Study on ploidy level of micropropagated *Jatropha curcas* L. via flow cytometry. J. Agri. Tech. 6: 391-400.
8.Khurana-Kaul, V., Kachhwaha, S., and Kothari, S.L. 2010. Direct shoot regeneration from leaf explants of *Jatropha curcas* in response to thidiazuron and high copper contents in the medium. Biol. Planta. 54: 369-372.
9.Kondamudi, R., Murthy, K.S., and Pullaiah, T. 2009. Euphorbiaceae–A critical review on plant tissue culture. Trop. Subtrop. Agroecosys. 10: 313-335.
10.Kumar, A., and Sharma, S. 2008. An evaluation of multipurpose oil seed crop for industrial uses (*Jatropha curcas* L). Indian Crops Prod. 28: 1-10.
11.Kumar, N., and Reddy, M.P. 2009. Plant regeneration through the direct induction of shoot buds from petiole explants of *Jatropha curcas*: a biofuel plant. Ann. App. Biol. 156: 367-375.
12.Kumar, N., Vijay Anand, K.G., and Reddy, M.P. 2010. *In vitro* plant regeneration of non-toxic *Jatropha curcas* L.: Direct shoot organogenesis from cotyledonary petiole explants. J. Crop Sci. Biotech. 13: 189-194.
13.Kumar, N., Vijay Anand, K.G., and Reddy, M.P. 2010. Shoot regeneration from cotyledonary leaf explants of *Jatropha curcas*: a biodiesel plant. Acta Plant Physiol. 32: 917-924.
14.Mazumdar, P., Basu, A., Paul, A., Mahanta, C., and Sahoo, L. 2010. Age and orientation of the cotyledonary leaf explants determine the efficiency of *de novo* plant regeneration and *Agrobacterium tumefaciencs* mediated transformation in *Jatropha curcas* L. South Afr. J. Bot. 76: 337-344.
15.Misra, M., and Misra, A.N. 2010. *Jatropha*: The biodiesel plant biology, tissue culture and genetic transformation- a review. Inter. J. Pure App. Sci. Tech. 1: 11-24.
16.Nayak, B.S., and Patel, K.N. 2010. Physicochemical characterization of seed and seed oil of *Jatropha curcas* L. collected from Bardoli (South Gujarat). Sains Malaysi Ann. 39: 951-955.
17.Purkayastha, J., Sugla, T., Paul, A., Solleti, S.K., Mazumdar, P., Basu, A., Mohommad, A., Ahmed, Z., and Sahoo, L. 2010. Efficient *in vitro* plant regeneration from shoot apices and gene transfer by particle bombardment in *Jatropha curcas*. Biol. Plant. 54: 13-20.
18.Rajore, S., and Batra, A. 2005. Efficient plant regeneration via shoot tip explant in *Jatropha curcas L*. J. Plant Biochem. Biotech. 14: 73-75.
19.Rajore, S., and Batra, A. 2007. An alternative source for regenerable organogenic callus induction in *Jatropha curcas L.* Indian J. Biotech. 6: 545-548.
20.Shrivastava, S., and Banerjee, M. 2008. *In vitro* clonal propagation of physic nut (*Jatropha curcas* L.): influence of additives. Inter. J. Integr. Biol. 3: 73-79.

Archive of SID

www.SID.ir

21. Sujatha, M., and Mukta, N. 1996. morphogenesis and plant regeneration from tissue cultures of *Jatropha curcas*. Plant Cell Tissue Organ Culture. 44: 135-141.
22. Tee, C.S., Siow, T.S., and Adeline, T.S.Y. 2012. Plant regeneration studies of *Jatrpha curcas* using induced embryogenic callus from cotyledon explants. Afr. J. Biotech. 11: 8022-8031.
23. Thepsamran, N., Thepsithar, C., and Thongpukdee, A. 2006. *In vitro* multiple shoot induction of physic nut (*Jatropha curcas*) Nakhon Pathom: Department of Biology, Faculty of Science, Silpakorn University, Thailand.
24. Thepsamran, N., Thepsithar, C., and Thongpukdee, A. 2008. *In vitro* induction of shoots and roots from *Jatropha curcas* L. explants. J. Hort. Sci. Biotech. 1: 106-112.
25. Verma, K.C., and Gaur, A.K. 2011. Comparative callus induction efficiency from different explants of *Jatropha curcas* L. with respect to different phytohormonal combination. Pantnagar J. Res. 9: 91-95.

Archive of SID

www.SID.ir

Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources
J. Plant Prod. Res. Vol. 21 (4), 2014
http://jopp.gau.ac.ir

Optimization of direct and callus mediated regeneration of *Jatropha curcus* through *in vitro* organogenesis

F. Fakhrodinnejad[1], *M. Aghdasi[2], K. Mashayekhi[3] and M. Khalafi[4]
[1]M.Sc. Student, Dept. of Plant Physiology, Golestan University, Gorgan, Iran,
[2]Assistant Prof., Dept. of Biology, Golestan University, Gorgan, Iran, [3]Associate Prof.,
Dept. Horticulture, Gorgan Agriculture and Natural Resources University, Gorgan, Iran,
[4]Assistant Prof., Dept. of Statistic, Golestan University, Gorgan, Iran
Received: 03/03/2012 ; Accepted: 05/07/2014

Abstract

The *Jatropha curcas* L., a plant belongs to Euphorbiaceae family, has great economic and medicinally value. There is high amount of oil in seeds of this plant. The seed oil content varies from 4 to 40%, which is used in biodiesel, candle, varnish and lubrication production. Because of low germination ability of seed, propagation of *Jatropha curcas* via seed is not usual. At this time, plant tissue culture provide an alternative approach to the plants which are difficult to propagate, or has a long propagation period. The purpose of this study was to optimize *Jatropha curcas* tissue culture for callus formation and propagation. All experiments were performed in complete randomized design with nine replications. In the present study, the effects of different concentrations of 6-benzyladenine (BA) and indol-3-butyric acid (IBA) hormones (0, 0.25, 0.5, 1, 1.5, 2, 3 mg/L) were investigated on callus formation of leaf, petiole and stem explants in MS medium. Also combination of different concentrations of 6-benzyladenine (BA) (0, 0/5, 1, 2, 3 mg/L) and indol-3- butyric acid (IBA) (0, 0.25, 0.5, 1, 1.5, 2, 3 mg/L) was investigated on shoot induction in node explants. In the next step, obtained shoot were grown on MS medium containing 0, 0.5, 1, 1.5 and 2 mg/L of IBA to induce root formation. The results showed that the combination of BA and IBA is more effective for callus formation. The highest percentage of callus formation was observed at 2 mg/L BA and 1 mg/L IBA in stem explants. The results showed that the highest percentage of shoot induction was observed at 0.5 mg/L BA and 0.25 mg/L IBA in node explants. Also, maximum regenerated root was observed in MS medium supplemented with 0.5 or 1 mg/L of IBA treatment. Finally, the obtained plants were transferred into soil medium. The shoot bud induction along with callus formation was observed in petiole explants (64%) at 1.5 mg/L BA and 1 mg/L IBA and Leaf explants (56%) at 3 mg/L BA and 0.5 mg/L IBA hormones.

Keywords: Callus, *Jatropha curcas*, Organogenesis, Plant growth regulator, Tissue culture

*Corresponding author: m.aghdasi@gu.ac.ir

Archive of SID
www.SID.ir