Iranian Journal of Horticultural Science
Vol 49, No 2, Summer 2018 (375-382)
DOI: 10.22059/ijhs.2017.217879.1104

علوم باغبانی ایران
دورهٔ ۴۹، شمارهٔ ۲، تابستان ۱۳۹۷ (ص ۳۸۲-۳۷۵)

اندام‌زایی مستقیم گیاه گل ساعتی (*Passiflora caerulea* L.) با استفاده از ریزنمونه‌های برگ و دمبرگ

مرضیه جعفری[۱]، محمدحسین دانشور[۲*] و امین لطفی جلال‌آبادی[۳]
۱، ۲ و ۳. دانشجوی سابق کارشناسی ارشد، استاد و استادیار، دانشگاه کشاورزی و منابع طبیعی رامین خوزستان
(تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۷/۲۴ - تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۳/۹)

چکیده

گل ساعتی (*Passiflora caerulea* L.) درختچه‌ای بالارونده، علفی و متعلق به تیرهٔ گل ساعتی (*Passifloraceae*) است. یکی از بخش‌های مهم بیوتکنولوژی، کشت بافت است که امکان تولید گیاهانی بدون پاتوژن و در حد انبوه را فراهم می‌سازد. این پژوهش به‌منظور بررسی پتانسیل دو نوع ریزنمونهٔ مختلف (قطعات برگ و دمبرگ) در راستای باززایی مستقیم گیاه گل ساعتی با استفاده از غلظت‌های مختلف هورمون‌های ٦-بنزیل آمینوپورین (BAP)، ٦ فورفوریل آمینو پورین (KIN) و تیدیازورون (TDZ) در ترکیب با ایندول بوتریک اسید (IBA) به‌صورت طرح کامل تصادفی و در سه تکرار انجام گرفت. نتایج نشان داد، در ریزنمونهٔ دمبرگ بیشترین درصد باززایی (۱۰۰ درصد) و بیشترین شمار شاخساره با میانگین ۸/۹ عدد در محیط کشت MS حاوی ۱ میلی‌گرم در لیتر BAP همراه با ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر IBA به دست آمد. همچنین در ریزنمونهٔ برگ بیشترین درصد باززایی (۸٦/٦٦ درصد) و بیشترین شمار شاخساره با میانگین ۸/٦ عدد در محیط کشت یادشده به دست آمد. در آزمایش ریشه‌زایی، بیشترین درصد ریشه‌زایی (۹۳/۳۳ درصد) در محیط کشت MS حاوی ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر IBA به دست آمد. گیاهچه‌های به‌دست‌آمده از شرایط درون شیشه‌ای در گلدان قرار داده شدند و برای مدت ۲۵ تا ۳۰ روز پیش از انتقال به خاک در شرایط اتاق کشت نگهداری شدند که بیشتر از ۹۰درصد زنده‌مانی نشان دادند. این دستورالعمل به نظر می‌رسد که استعداد کافی برای ریزازدیادی این ژرم پلاسم با ارزش را داشته باشد.

واژه‌های کلیدی: باززایی، ریشه‌زایی، سازگاری، کشت بافت.

Direct organogenesis of passion flower (*Passiflora caerulea* L.) via leaf and petiole explants

Marziyeh Jafari[1], Mohammad Hossein Daneshvar[2*] and Amin Lotfi-Jalalabadi[3]
1, 2, 3. Former M. Sc. Student, Professor and Assistant Professor, Ramin University of Agriculture and Natural Resources, Khoozestan, 63417-73637, Iran
(Received: Oct. 15, 2016 - Accepted: May 30, 2017)

ABSTRACT

Passion flower (*Passiflora caerulea* L.) is a climbing and herbaceous shrub belonging to the family of Passifloraceae. Tissue culture is an important part of biotechnology, which can produce plants free of pathogens and provides mass production. This study aimed to evaluate the potential of two different types of explants (leaf and petiole) in order to obtain shoot multiplication of *Passiflora caerulea*. Various concentrations of 6-benzyl amino purine (BAP), 6-furfuryl amino purine (KN) and Thidiazuron (TDZ) in combination with indole butyric acid (IBA) were used as a completely randomized design, in three replications. Results of this experiment showed that the highest regeneration frequency of the petiole explant (100%) and the maximum number of multiple shoots (8.9) was obtained in MS medium supplemented with 1.0 mg/l BAP along with 0.1 mg/l IBA. Also in leaf explants, the highest regeneration frequency (86.66%) as well as the maximum number of multiple shoots (8.6) were obtained in the above-mentioned medium. The highest rooting frequency (93.33%) was observed on MS medium supplemented with 0.5 mg/l IBA. In vitro-raised plantlets were potted and acclimatized under culture room conditions for 25–30 days before transfer to soil conditions, where the established plants showed more than 90 % survival. The described protocol had a high potential for the micropropagation of this valuable germplasm.

Keywords: Acclimatization, regeneration, rooting, tissue culture.

* Corresponding author E-mail: mhdaneshvar2004@yahoo.com

www.SID.ir

مقدمه

کشت بافت گیاهی مقدمه‌ای در زیست‌فناوری بوده و ریز ازدیادی (افزایش و تولید انبوه گیاهان) از طریق فنون مختلف کشت بافت گیاهی، یکی از مهم‌ترین و موفقیت‌آمیزترین کاربرد این روش است و عامل‌های مختلفی از جمله غلظت هورمون‌ها در ریزازدیادی گیاهان در شرایط درون شیشه‌ای مؤثر است. در کاربرد فنون کشت بافت برای گیاهان زینتی، بیشتر پژوهش‌ها برای دو هدف اولیه شامل تولید گیاهان بدون بیماری و تولید انبوه گیاهان متمرکز شده است (Verdeil et al., 2007). بنابراین، تولید گیاهان کاملاً یکسان با والد مادری از راه کشت بافت برای ریزافزایی گیاهان اهمیت دارد (Yantcheva et al., 1998). از بین روش‌های کشت بافت، ازآنجایی‌که روش باززایی غیرمستقیم معایبی از جمله زمان‌بر بودن و ایجاد تنوع وسیع سوماکلونی با ویژگی‌های مورفولوژیکی غیرطبیعی دارد (Neves et al., 2001)، باززایی مستقیم، به دلیل پتانسیل بالا در تولید شمار زیادی گیاه شبیه به والد مادری در مدت‌زمان کوتاه که بدون هرگونه ناپایداری ژنتیکی هستند یک روش کارآمد برای ریزافزایی به‌شمار می‌آید(George et al., 2008).

گل ساعتی با نام علمی *Passiflora caerulea* L. متعلق به تیرهٔ گل ساعتی (*Passifloraceae*) است. گونه‌های جنس گل ساعتی در مناطق معتدله گرم و نواحی گرمسیری جهان پراکنده شده است. این گل از نظر گیاه‌شناسی، درختچه‌ای بالارونده، همیشه‌سبز و به‌صورت پیچک است (Dhawan et al., 2004). در ایران این‌گونه در بخش‌های شمالی کشور کشت می‌شود، اما متأسفانه از تاریخچهٔ کاشت این گیاه در ایران اطلاع چندانی در دسترس نیست (Mozaffarian, 1996). ازدیاد طبیعی و معمول گل ساعتی با استفاده از بذر انجام می‌شود که این موضوع ممکن است با ایجاد مشکلات خاصی همچون پایین بودن درصد جوانه‌زنی بذر و حساسیت گیاه به عوامل پاتوژن مانند ویروس Passion fruit woodiness (virus) PWV و CABMV Cowpea aphid-borne (mosaic virus) تولید را در مقیاس بزرگ محدود کند (Lima *et al*., 2003). یک راهبرد جایگزین برای کنترل بیماری ویروس گیاهی و تولید گیاهان با یکنواختی بالا استفاده از کشت بافت است (Gioria *et al*., 2000). ریز ازدیادی این‌گونهٔ گل ساعتی (*Passiflora caerulea*) از طریق کشت مستقیم اندام توسط برخی محققان انجام گرفته است. نخستین بررسی در این زمینه در سال ۲۰۰۸ با استفاده از ریزنمونهٔ برگ توسط Busilacchi et al. (2008) انجام شده است. آن‌ها با استفاده از ریزنمونهٔ برگ در محیط کشت پایهٔ موراشیگ و اسکوگ (MS) حاوی ۱ میلی‌گرم در لیتر BAP موفق به تولید شاخساره پس از ۴۸ روز شدند. Ozarowski et al. (2012) به اندام‌زایی مستقیم و غیرمستقیم از ریزنمونهٔ میانگرهٔ گیاه گل ساعتی (Passiflora caerulea) پرداختند. آنان در نتایج بررسی‌های خود گزارش دادند، بیشترین درصد باززایی شاخساره (۶۴/۰۱٪) در محیط کشت MS حاوی ۴/۴۳ میکرومولار BAP همراه با ۲/۸ میکرومولار GA3بود. همچنین در آزمایشی دیگر Ozarowski et al. (2013)، به باززایی مستقیم این‌گونه پرداختند. آخرین گزارش از باززایی مستقیم گل ساعتی (*Passiflora caerulea*) توسط Prithrivaj *et al*. (2015) منتشر شده است. آنان با استفاده از غلظت‌های مختلف BAPو ریزنمونهٔ برگ، اندام‌زایی مستقیم این گیاه را بررسی و گزارش دادند، از محیط کشت MS حاوی ۳میلی‌گرم در لیتر BAP، ۹۴درصد باززایی به دست آمد. باززایی مستقیم برخی گونه‌های دیگر گل ساعتی در شرایط درون شیشه‌ای توسط چند محقق گزارش شده است که از جمله آن می‌توان به Vieira (2014) *et al*.، DaSilva *et al*. (2011) و Nhut et al. (2007) اشاره کرد.

با توجه به نقش مهم روش‌های ریزازدیادی در تجاری‌سازی گیاهان، تهیهٔ روش مناسب و کارآمد برای باززایی کامل، سریع و تولید انبوه گیاه در شرایط درون شیشه‌ای از هدف‌های مهم بررسی‌های کشت بافت است که می‌تواند بستر مناسب برای انجام دیگر پژوهش‌ها، مانند مهندسی ژنتیک فراهم شود. بر پایهٔ منابع علمی قابل‌دسترس تاکنون گزارشی در مورد باززایی مستقیم گل ساعتی در ایران وجود ندارد. لذا در این پژوهش پتانسیل اندام‌زایی و باززایی مستقیم

Archive of SID

www.SID.ir

گل ساعتی از ریزنمونه‌های حاصل از گیاهچه‌های درون شیشه‌ای تحت تأثیر غلظت‌های مختلف تنظیم‌کننده‌های رشد سایتوکینین BAP، KIN و TDZ در ترکیب با هورمون اکسین (IBA) بررسی شد.

مواد و روش‌ها

این پژوهش در آزمایشگاه کشت بافت گروه علوم باغبانی دانشگاه کشاورزی و منابع طبیعی رامین خوزستان انجام شد. در آغاز برای از بین بردن آلودگی‌های سطحی، بذرها به مدت ۳۰ دقیقه زیر آب جاری به‌صورت قطره‌قطره قرار داده شدند. سپس در اتاق انتقال و زیر دستگاه لامینار ایر فلو بذرها به مدت ۴۰ ثانیه در الکل اتیلیک ۷۰درصد و سپس به مدت ۱۰ دقیقه در محلول تجاری هیپوکلریت سدیم ۱۰درصد (دارای ۵ درصد مادهٔ فعال) قرار داده شدند. سپس بذرها سه مرتبه و هر بار به مدت ۵-۳ دقیقه در آب مقطر استریل شست‌وشو داده شدند و آماده کشت شدند. برای جوانه‌زنی و تولید گیاهچه‌های بدون آلودگی برای تهیهٔ ریزنمونه، پس از ضدعفونی بذرها، آن‌ها در محیط MS (Murashige & Skoog, 1962) ۰/۱ غلظت در دو شرایط تاریکی و روشنایی کشت داده شدند. پس‌ازآن‌که گیاهچه‌ها به حد کافی رشد کردند (شکل۱-a)، ریزنمونه‌های مختلف شامل قطعات دمبرگ و برگ از گیاهچه‌های درون شیشه‌ای تهیه شد. ریزنمونه‌ها به محیط MS به همراه ترکیبی از ۰/۵، ۱ و ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر از BAP، ۱ و ۲ میلی‌گرم در لیتر KIN و ۰/۲۵، ۰/۵و ۱ میلی‌گرم در لیتر TDZ در ترکیب با IBA کشت شدند. نسبت بین سایتوکنین به IBA در محیط کشت ۱۰:۱ بود. در محیط کشت یادشده ۳۰ گرم در لیتر ساکارز به‌عنوان منبع کربوهیدرات و ۷ گرم در لیتر آگار برای جامد کردن محیط کشت به‌کاربرده شد. پیش از افزودن آگار pH محیط کشت برابر با ۵/۸ با استفاده از pH متر تنظیم شد. شیشه‌های حاوی محیط کشت با استفاده از اتوکلاو تمام اتوماتیک برقی در دمای ۱۲۱/۵ درجهٔ سلسیوس و فشار ۱/۵ اتمسفر (۱۵ psi) به مدت ۲۰ دقیقه، گندزدایی شدند. پس از استقرار ریزنمونه‌ها در محیط کشت، ظرف‌های کشت در اتاق رشد با دورهٔ نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی و شدت نور ۱۲۰۰-۱۰۰۰ لوکس (LUX) قرار داده شدند. آزمایش اندام‌زایی مستقیم به‌صورت طرح کامل تصادفی با سه تکرار (هر تکرار شامل ۱۰ ریزنمونه) انجام شد. درصد باززایی شاخساره و شمار شاخساره پس از گذشت سه هفته ارزیابی شد.

پس از مرحلهٔ اندام‌زایی، شاخساره‌های تشکیل‌شده از ریزنمونه‌های برگ به طول ۲ تا ۳ سانتی‌متر برای مرحلهٔ ریشه‌زایی به کار رفتند. ریشه‌زایی گیاهچه‌های تولیدشده، با استفاده از محیط MSبدون هورمون و محیط MS تکمیل‌شده با غلظت‌های مختلف IBA (۰/۵، ۱ و ۲ میلی‌گرم در لیتر) و NAA (۰/۵، ۱ و ۲ میلی‌گرم در لیتر) به‌صورت طرح کامل تصادفی در سه تکرار ارزیابی شد و فراسنجه (پارامتر)های لازم مانند میزان ریشه‌زایی، شمار ریشه‌ها و طول ریشه‌ها ثبت شد. گیاهچه‌های دارای شاخساره و برگ‌های مطلوب و ریشه‌های قوی، به‌منظور سازگاری در بستر کشت پرلایت توأم با کوکوپیت (به نسبت ۱:۱) در ظروف آلومینیومی (۲۰ سانتی‌متر ارتفاع و ۱۰ سانتی‌متر قطر) استریل منتقل شدند. برای حفظ رطوبت، گلدان‌ها در کیسه‌های پلاستیکی استریل قرار داده شدند و برای ۲۵ الی ۳۰ روز در اتاق رشد نگهداری شدند. پس از ۵ روز در کیسه‌ها کمی باز شد به صورتی که پس از ۱۵ روز در کیسه‌ها به‌طور کامل باز شد. گلدان‌ها در این مدت با محلول هوگلند آبیاری شدند و سرانجام به گلخانه منتقل شده و درصد زنده ماندن گیاهچه‌ها پس از انتقال به گلخانه ثبت شد. تجزیه‌وتحلیل آماری این آزمایش با استفاده از نرم‌افزار SAS (9.3) و مقایسهٔ میانگین داده‌ها با آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ۵درصد انجام شد و همچنین از نرم‌افزار Excel (2013) برای رسم نمودارها استفاده شد.

نتایج و بحث

تأثیر تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی بر باززایی شاخساره

تاکنون بررسی‌های اندکی درزمینهٔ باززایی مستقیم و اثر هورمون‌های مختلف بر ریزازدیادی گیاه گل ساعتی (*Passiflora caerulea*) گزارش شده است

Archive of SID

www.SID.ir

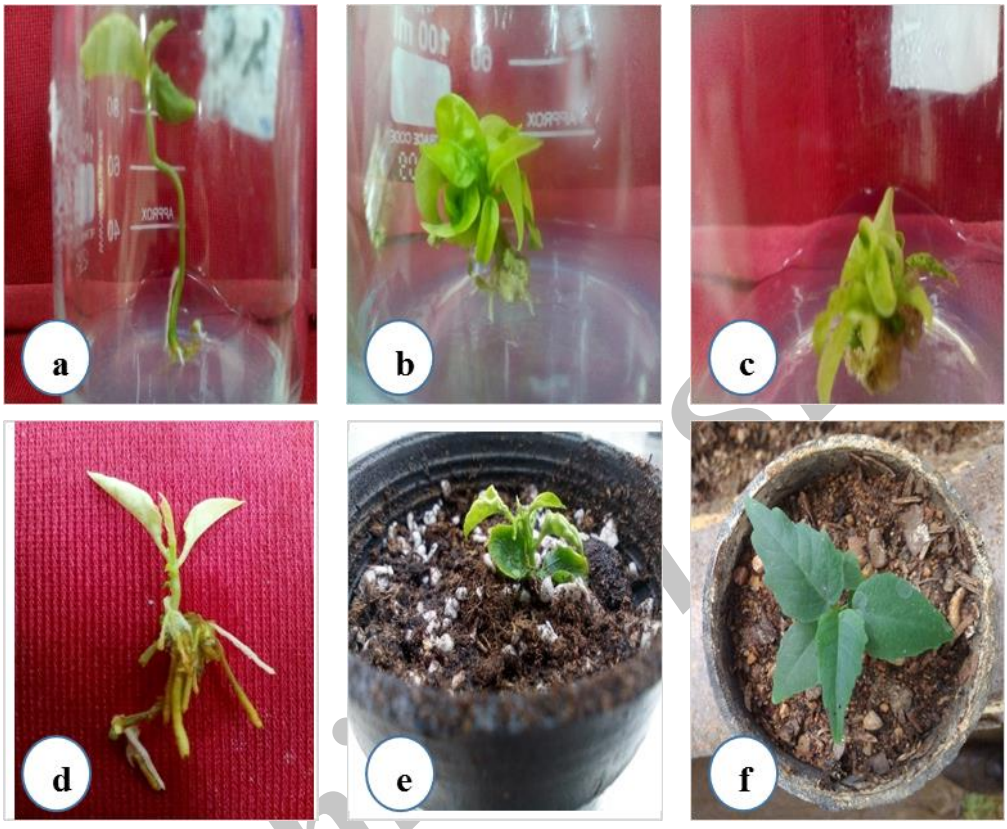
Busilacchi et al., 2008; Ozarowski et al., 2012; Prithrivaj et al., 2015, 2013)، اما از گیاهان هم تیرهٔ آن گزارش‌های چندی وجود دارد (*Passiflora foetida* (Anand *et al.*, 2012)، *Passiflora setacea* (Vieira *et al.*, 2014) Nhut *et al.*) *Passiflora edulis* و (Da Silva *et al.*, 2007) *Passiflora cincinnata* (Da Silva *et al.*, 2011)). پروتکل باززایی مستقیم ارائه شده در این آزمایش با استفاده از قطعات برگ و دمبرگ به‌عنوان ریزنمونه، دارای مزیت مهمی از جمله تولید در مقیاس بالا در مرحلهٔ افزایش شاخساره در بازهٔ زمانی کمتر (نزدیک به ۲۰ روز)، نسبت به پژوهش محققان دیگر داشت. در این پژوهش، اثر نوع و غلظت هورمون سایتوکینین (BAP، KIN و TDZ) در ترکیب با هورمون اکسین (IBA) در اندام‌زایی مستقیم ریزنمونه‌های برگ و دمبرگ، متفاوت بودند. نتایج مقایسهٔ میانگین نشان داد، بیشترین میزان باززایی و شمار شاخساره در ریزنمونه‌های دمبرگ مشاهده شد که اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال ۵ درصد با ریزنمونه‌های برگ دارد (جدول ۱).

بررسی تأثیر غلظت‌های مختلف تنظیم‌کننده‌های رشد بر باززایی ریزنمونه‌های برگ و دمبرگ گل ساعتی پس از ۲۰ روز نشان داد، بیشترین میزان باززایی در ریزنمونهٔ برگ (۸۶/۶۶٪) و ریزنمونهٔ دمبرگ (۱۰۰٪) و همچنین بیشترین شمار شاخساره در ریزنمونهٔ برگ (۸/۶۶) و ریزنمونهٔ دمبرگ (۸/۹۰) در تیمار ۱ میلی‌گرم در لیتر BAP همراه با ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر IBA تولید می‌شود (شکل ۱-b و c). همچنین هیچ‌گونه باززایی در محیط کشت شاهد مشاهده نشد (جدول ۱). نتایج این آزمایش نشان داد، با افزایش غلظت BAP از ۱ به ۲ میلی‌گرم در لیتر در ریزنمونه‌های برگ و دمبرگ میزان باززایی و شمار شاخساره کاهش یافت. اما این افزایش غلظت در هورمون TDZ از ۰/۲۵ به ۱ میلی‌گرم در لیتر افزایش معنی‌داری در میزان باززایی و شمار شاخسارهٔ حاصل رخ داد (جدول۱). Ning *et al.* (2007) در نتایج بررسی‌های خود گزارش کردند، TDZ برعکس BAP در محدودهٔ غلظت‌های پایین‌تر باعث القای شاخساره می‌شود و در غلظت‌های بالاتر تأثیر جلوگیری کنندگی دارد که با نتایج این بررسی متضاد است. از سویی Siwach & Gill (2011) در نتایج بررسی‌های خود گزارش دادند، غلظت‌های بالای TDZ باعث افزایش درصد باززایی و شمار شاخساره از ریزنمونه‌های گرهٔ گیاه *Ficus religiosa* می‌شود که منطبق با نتایج این آزمایش است. تفاوت در سطح هورمون‌های داخلی ریزنمونه‌های مختلف می‌تواند دلیلی برای نتایج متفاوت به یک هورمون خاص در کشت بافت باشد (Hesami & Daneshvar, 2016). در این بررسی، بهترین تیمار برای باززایی هر دو ریزنمونه (قطعات برگ و دمبرگ)، محیط پایه سیتوکینین BAP در ترکیب با هورمون IBA داشت. استفاده از سیتوکینین‌های دیگر، یعنی KIN و TDZ به‌اندازهٔ BAP در باززایی گیاه نقش نداشتند و تنها شمار کمی از ریزنمونه‌ها در محیط‌های کشت حاوی این تنظیم‌کننده‌های رشد باززایی شدند. Prithrivaj *et al.* (2015) در آزمایشی با استفاده از غلظت‌های مختلف BAP به‌تنهایی و در ترکیب با NAA، اندام‌زایی مستقیم گیاه گل ساعتی (*Passiflora caeruleas*) را با استفاده از ریزنمونه برگ بررسی کردند. آنان در نتایج بررسی‌های خود گزارش دادند، از محیط کشت MS حاوی ۳ میلی‌گرم در لیتر BAP، پس از ۴ هفته ۹۴درصد باززایی با شاخسارهایی با طول ۵/۸ سانتی‌متر به دست آمد. در همهٔ بررسی‌های انجام‌شده توسط دیگر پژوهشگران سیتوکینین BAP نقش بسزایی در باززایی داشت که با نتایج این آزمایش همخوانی دارد (Dornelas & Vieira, 1994; Fernando *et al.*, 2007; Monteiro *et al.*, 2000; Lombardi *et al.*, 2007; Soares *et al.*, 2012). تعادل بین اکسین و سیتوکینین یک عامل مورفوژنیک مهم به‌شمار می‌آید و رشد اولیهٔ نوساقه و همچنین فرآیند تمایزیابی توسط غلظت نسبی اکسین و سیتوکینین در محیط کشت تنظیم می‌شود (Murashige, 1980). Pasternak *et al.* (2000) در نتایج بررسی‌های خود گزارش دادند، اکسین در همانندسازی DNA و سایتوکینین در تنظیم وقایع مرتبط با چرخهٔ یاخته‌ای نقش دارند. به‌طورکلی، سایتوکینین‌ها نقش‌های پرشماری مانند، تنظیم چرخهٔ یاخته‌ای، آغازش و فعالیت

Archive of SID

www.SID.ir

مریستم‌های جانبی، تحریک ساخت (سنتز) پروتئین‌ها و RNA و فعال‌سازی آنزیم‌های درگیر در نمو را در گیاهان ایفا می‌کنند (Dobranszki & Da Silva, 2010). اضافه کردن BAP می‌تواند غالبیت انتهایی را به سمت جوانهٔ جانبی هدایت کند، که این پدیده منجر به تقسیم یاخته‌ای در یاخته‌های مریستمی در جوانه و افزایش شمار شاخه شده و سرعت تقسیم یاخته‌ای در جوانهٔ جانبی را افزایش دهد (Gomez-Leyva *et al*., 2008).



شکل ۱. اندام‌زایی مستقیم از ریزنمونه‌های برگ و دمبرگ گیاه . a) دانهال تولیدشده از جوانه‌زنی در شرایط درون شیشه‌ای، b) باززایی شاخساره از ریزنمونهٔ دمبرگ و c) برگ، d) ریشه‌زایی شاخساره‌های تولید شده در شرایط درون‌شیشه‌ای، e) سازگاری گیاهک‌ها پس از ۱ هفته و f) ۴ هفته.

Figure 1. Direct organogenesis of *P. caerulea* from leaf and petiole explants. (a) Seedling from *in vitro* seed germination, (b) Shoot multiplication from petiole and (c) leaf, (d) Rooting of *in vitro* regenerated shoots, (e) Acclimatized regenerated plants after 1 and (f) four weeks.

جدول ۱. تأثیر تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی مختلف در محیط کشت MS بر باززایی شاخساره از ریزنمونه‌های برگ و دمبرگ *P. caerulea*

Table 1. Effect of different plant growth regulators in MS medium on shoot regeneration of *P. caerulea* from leaf and petiole segments

Plant Growth Regulators				Leaf		Petiole	
BAP	TDZ	KIN	IBA	Organogenesis frequency (%)	Shoot number per explant	Organogenesis frequency (%)	Shoot number per explant
0	0	0	0	0 ^{j}	0 ^{q}	0 ^{j}	0 ^{q}
0.5	0	0	0.05	60.00 ^{d}	6.23 ^{f}	70.00 ^{c}	6.80 ^{e}
1.0	0	0	0.1	86.66 ^{b}	8.66 ^{b}	100 ^{a}	8.90 ^{a}
1.5	0	0	0.15	60.00 ^{d}	7.13 ^{d}	70.00 ^{c}	7.46 ^{c}
0	0.25	0	0.025	10.00 ^{i}	1.26 ^{p}	20.00 ^{h}	1.60 ^{o}
0	0.5	0	0.05	20.00 ^{h}	2.60 ^{n}	26.66 ^{g}	2.86 ^{m}
0	1.0	0	0.1	20.00 ^{h}	3.26 ^{l}	30.00 ^{g}	3.50 ^{k}
0	0	1.0	0.1	40.00 ^{f}	4.30 ^{h}	50.00 ^{e}	4.66 ^{g}
0	0	2.0	0.2	30.00 ^{g}	4.00 ^{j}	40.00 ^{f}	4.16 ^{i}

مقایسه میانگین‌ها با توجه به آزمون چنددامنه‌ای دانکن در سطح ۵٪ انجام شد. Mean comparison to the 5% level according to Duncan's multiple range test.

ستون‌های با حروف مشابه اختلاف معنی‌داری ندارند. Columns with similar letters, no significant difference.

Archive of SID

www.SID.ir

تأثیر IBA و NAA بر ریشه‌زایی

ریشه‌زایی یکی از مراحل بسیار مهم در ریزافزایی است که توسط شماری از عامل‌های فیزیولوژیکی، بیوشیمیایی و ژنتیکی تنظیم شده است. توانایی بافت گیاه برای تشکیل ریشه‌های نابجا به اثر متقابل بسیاری از عامل‌های خارجی و داخلی مانند هورمون‌ها، عنصرهای محیط کشت و نوع محیط کشت بستگی دارد (George, 1996). گیاهان به‌دست‌آمده از ریزنمونه‌های برگ در مرحلهٔ باززایی، به‌منظور ریشه‌زایی به محیط کشت MS با سه سطح متفاوت IBA (۰/۵، ۱و ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر) و NAA (۰/۵، ۱و ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر) منتقل شدند. نمونه‌های شاهد در محیط کشت MS بدون تنظیم‌کننده‌های رشد قرار گرفتند. بنا بر نتایج به‌دست‌آمده، در محیط کشت MS حاوی ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر IBA بیشترین میزان درصد ریشه‌زایی (۹۳/۳۳٪) مشاهده شد (شکل۱-d). کمترین ریشه‌زایی مربوط به گیاهچه‌هایی بود که در محیط کشت MS بدون تنظیم‌کننده‌های رشد قرار گرفتند. بیشترین شمار ریشه (۹/۹۳ ریشه در گیاهچه) و طول ریشه با میانگین ۵/۸۳ سانتی‌متر در محیط کشت MS حاوی با ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر IBA تشکیل شد (جدول ۲). در این بررسی، اگرچه تأثیر مثبتی از NAA در القای ریشه در مرحلهٔ پس از باززایی مشاهده شد. لیکن در مقایسه با IBA تأثیر کمتری داشت. دیگر تحقیق انجام شده توسط Prithrivaj *et al* (2015) نیز نتایج یکسانی به دست آمد که مؤید نتایج این بررسی است. آنان در نتایج بررسی‌های خود گزارش دادند، بیشترین درصد ریشه‌زایی پس از ۴ هفته در محیط کشت MS حاوی ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر IBA مشاهده شد. در آزمایش‌های مختلف از اکسین‌های مختلف و غلظت‌های مختلف برای ریشه‌زایی گونه‌های مختلف گل ساعتی استفاده شد. Ragavendran *et al.* (2012) غلظت ۱میلی‌گرم در لیتر IBA (*Passiflora foetida*) و Anand et al. (2012) غلظت ۰/۵میلی‌گرم در لیتر IBA (*Passiflora foetida*) را برای ریشه‌زایی گزارش کرده‌اند. بیشتر گیاهان برای باززایی مؤثر ریشه، به اکسین نیازمندند. اکسین‌ها مانند IBA، NAA و IAA توانایی القا و تشکیل ریشه‌ها را دارند و تنها در مراحل اولیهٔ ظهور ریشه‌های جدید تشکیل‌شده مورد نیاز هستند (Dobránszki & Da Silva, 2010). همچنین بر رشد ریشه‌های تازه شکل‌گرفته تأثیر دارند. در تشابه با نتایج این بررسی، Bellamine *et al.* (1998) نیز گزارش کردند، هورمون IBA در مرحلهٔ ریشه‌زایی مناسب‌تر از دیگر اکسین‌ها است. همچنین این هورمون پایدار بوده و حساسیت کمتری به آنزیم‌های تجزیه‌کنندهٔ اکسین دارد و با سرعت کمتری توسط آنزیم‌های پروکسیداز متابولیزه می‌شود که می‌تواند یکی از دلایل قابل بیان برای تأثیر بهتر IBA در مقایسه با دیگر اکسین‌ها باشد (Dobránszki & Da Silva, 2010). غلظت‌های بالای IBA در این بررسی، با تولید کالوس زیاد در مرحلهٔ ریشه‌زایی همراه بود که باعث ضعیف شدن ریشه‌ها و از بین رفتن درصد بالایی از گیاهان در مرحلهٔ سازگاری می‌شود که یکسان یافته‌های محققان پیشین است که بیان کردند تشکیل کالوس در انتهای گیاهک تولید شده، سبب مختل شدن ارتباط آوندی ریشه و شاخساره شده و از جذب آب و مواد غذایی جلوگیری می‌کند (George, 1996). برای اینکه حیات ریشه و کارایی آن در شرایط آزاد تداوم داشته باشد، باید محیط اطراف ریشهٔ گیاهچه به‌طور تدریجی تغییر داده شود تا تنش وارد به گیاه را بتواند تحمل کند. بنابراین گیاهچه‌ها به مدت ۲ هفته در محیط کشت بدون هورمون با غلظت کامل عنصرهای کانی قرار داده شدند. تا ریشه‌ها ضمن تأمین نیاز غذایی، یک دورهٔ رشد بدون هورمون را طی کنند. پس از گذشت این مرحله ریشه‌های رشد یافته به‌خوبی مشاهده شدند.

سازگاری گیاهک‌های ریشه‌دار شده

در پایان گیاهک‌های ریشه‌دار شده به‌منظور جدا شدن آگار و محیط کشت، شسته شدند و در گلدان حاوی بستر کشت پرلایت توأم با کوکوپیت (به نسبت ۱:۱) قرار داده شدند و به مدت ۲۵ الی ۳۰ روز در اتاق رشد نگهداری شدند. پس از انتقال به گلخانه بیش از ۹۰درصد از گیاهک‌ها زنده ماندند (شکل۱-e و f)، که با نتایج تحقیقات گذشته همخوانی داشت (Busilacchi *et al.*, 2008; Ozarowski *et al.*, 2012; Prithrivaj *et al.*, 2015, 2013).

Archive of SID

www.SID.ir

جدول ۲. تأثیر IBA و NAA بر ریشه‌زایی شاخساره‌های باززایی شده از *P. caerulea* در محیط کشت MS

Table 2. Effects IBA and NAA on root induction in regenerated shoots of *P. caerulea* in MS medium

Growth regulator	% of shoots producing roots	No. of roots/shoot	L. of roots/shoot (cm)
Control (Free of PGRs)	0 [d]	0 [g]	0 [d]
0.5 mg/l IBA	93.33 [a]	9.93 [a]	5.83 [a]
1.0 mg/l IBA	53.33 [b]	7.16 b	4.00 [b]
1.5 mg/l IBA	53.33 [b]	6.26 [c]	3.16 [c]
0.5 mg/l NAA	30.00 [c]	4.00 [d]	3.06 [c]
1.0 mg/l NAA	36.66 [c]	3.20 [e]	2.56 [c]
1.5 mg/l NAA	36.66 [c]	2.13 [f]	2.83 [c]

مقایسه میانگین‌ها با توجه به آزمون چنددامنه‌ای دانکن در سطح ۵٪ انجام شد. Mean comparison to the 5% level according to Duncan's multiple range test.

ستون‌های با حروف مشابه اختلاف معنی‌داری ندارند. Columns with similar letters, no significant difference.

نتیجه‌گیری کلی

بنابر نتایج این پژوهش، ریزنمونه‌های برگ و دمبرگ در محیط کشت MS تغییریافته دارای ۱ میلی‌گرم در لیتر BAP همراه با ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر IBA به‌صورت مستقیم بیشترین میزان باززایی را به دنبال داشتند. از سوی دیگر، میزان باززایی و شمار شاخساره تولید شده در ریزنمونه‌های دمبرگ به‌طور معنی‌داری بیشتر از ریزنمونه‌های برگ بود. همچنین نتایج آزمایش نشان داد، به‌منظور موفقیت در ریشه‌زایی گیاه گل ساعتی استفاده از هورمون IBA نسبت به هورمون NAA مناسب‌تر است. پروتکل باززایی مستقیم مزایای مهمی از جمله تولید در مقیاس بالا در یک دورهٔ کوتاه‌مدت دارد، که این خود نه‌تنها از جنبهٔ ریزازدیادی و کشت درون شیشه‌ای گل ساعتی، بلکه به‌عنوان پیش‌زمینهٔ بسیار مناسب برای هدف‌های اصلاحی و انتقال ژن به این گیاه، مورد توجه است.

REFERENCES

1. Anand, S. P., Jayakumar, E., Jeyachandran, R., Nandagobalan, V. & Doss, A. (2012). Direct organogenesis of *Passiflora foetida* L. through Nodal Explants. *Plant Tissue Culture and Biotechnology*, 22(1), 87-91.
2. Bellamine, J., Penel, C., Greppin, H. & Gaspar, T. (1998). Confirmation of the role of auxin and calcium in the late phases of adventitious root formation. *Plant growth regulation*, 26(3), 191-194.
3. Busilacchi, H., Severin, C., Gattuso, M., Aguirre, A., Di Sapio, O. & Gattuso, S. (2008). Field culture of micropropagated *Passiflora caerulea* L. histological and chemical studies. *Boletin Latinoam Caribe*, 7, 257-263.
4. Da Silva, C. V., De Oliveira, L. S., Loriato, V. A. P., Da Silva, L. C., De Campos, J. M. S., Viccini, L. F. & Otoni, W. C. (2011). Organogenesis from root explants of commercial populations of *Passiflora edulis* Sims. and a wild passion fruit species, *Passiflora cincinnata* Masters. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 107(3), 407-416.
5. Dhawan, K., Dhawan, S. & Sharma, A. (2004). Passiflora: a review update. *Journal of Ethnopharmacology*, 94(1), 1-23.
6. Dobránszki, J. & Teixeira Da Silva, J. A. (2010). Micropropagation of apple a review. *Biotechnology Advances*, 28, 462-488.
7. Dornelas, M.C. & Vieira, M. L.C. (1994). Tissue culture studies on species of Passiflora. *Plant Cell Tissue Organ Culture*, 36, 211-217.
8. Fernando, J. A., Vieira, M. L. C., Machado, S. R. & Appezzato-da-Glória, B. (2007). New insights into the *in vitro* organogenesis process: the case of Passiflora. *Plant Cell Tissue Organ Culture*, 91, 37-44.
9. George, E. F., Hall, M. A. & De Klerk, G. J. (2008). *Adventitious regeneration. In: Plant propagation by tissue culture*. (3rd edn.). E.F. George, M.A. Hall and G-J, De Klerk. (Eds), Dordrecht, Netherlands. (pp. 355-401). Springer.
10. George, E. F. (1996). *Plant propagation by tissue culture*. Part 2: In practice. Second (Ed). Exegetics Limited. British Library. Edington Wilts. pp. 709.
11. Gomez-Leyva, J. F., Martinez-Acosta, L. A., Lopez Muraira, I. G., Silos-Espino, H., Ramirez-Cervantes, F. & Andrade-Gonzalez, I. (2008). Multiple shoot regeneration of roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) from a shoot apex culture system. *International Journal of Botany*, 4, 326-330.
12. Gioria, R., Bosquê, G. G., Rezende, J. A. M., Amorim, L. & Kitajima, E. W. (2000). Incidencia de viroses de maracujazeiro na Alta Paulista-SP e danos causados pelo "*Passion fruit woodiness virus*". *Fitopatologia Brasileira*, 25, 182-189.

Archive of SID

www.SID.ir

13. Hesami, M. & Daneshvar, M. H. (2016). Development of a Regeneration Protocol through Indirect Organogenesis in Chenopodium quinoa Willd. *Indol American Journal Agriculture Veterinary Sciences*, 4(1), 25-32.
14. Lima, R. M., Oliveira, S. M. A. & Menezes, M. (2003). Caracterizacao enzimaticae patogenicidade cruzada de *Colletotrichum* spp. associados a doencas depos-colheita. *Fitopatologia Brasileira*, 28, 620-625.
15. Lombardi, S. P., Passos, I. R. S., Nogueira, M. C. S. & Appezzato-da-Glória, B. (2007). *In vitro* shoot regeneration from roots and leaf discs of *Passiflora cincinnata* Mast. *Brazilian Archives Biology and Technology*, 50, 239-247.
16. Magyar-Tábori, K., Dobránszki, J., da Silva, J. A. T., Bulley, S. M. & Hudák, I. (2010). The role of cytokinins in shoot organogenesis in apple. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 101, 251-267.
17. Mozaffarian, V. A. (1996). *Dictionary of Iranian Plant Names*. Farhang Moaser, Tehran. 396 P. (in Farsi)
18. Monteiro, A. C. B. A., Nakasawa, G. T., Mendes, B. M. J. & Rodriguez, A. P. M. (2000). Regeneração *in vitro* de *Passiflora suberosa* a partir de discos foliares. *Scientia Agriculture*, 57, 571-573.
19. Murashige, T. & Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiological Plant*, 15, 473-497.
20. Murashige, T. (1980). *Plant growth substances in commercial uses of tissue culture. In: Skoog, F.* (Eds). *Plant Growth Substances. Berlin*. (pp. 426–434) Springer-Verlag.
21. Nascimento, K. S. & Ferreira, K. T. (2012). Estabelecimento *in vitro* tissue culture maracujá silvestre (*Passiflora foetida* L.). *Revista Brasileira de Plantas Medicinais*, 14, 138-142.
22. Neves, L. O., Tomaz, L. & Fevereiro, M. P. S. (2001). Micropropagation of *Medicago truncatula* Gaertn. cv. Jemalong and Medicago truncatula ssp.Narbonensis. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 67, 81-84.
23. Nhut, D. T., Khiet, B. L. T., Thi, N. N., Thuy, D. T. T., Duy, N., Hai, N. T. & Huyen, P. X. (2007). High frequency shoot formation of yellow passion fruit (*Passiflora edulis* f. flavicarpa) via thin cell layer (TCL) technology. In Jain SM and Häggman H, Protocols for Micropropagation of Woody Trees and Fruits. (pp. 417-426). Springer.
24. Ning, G., Bai, S., Bao, M. & Liu, L. (2007). Factors affecting plantlet regeneration from *in vitro* cultured immature embryos and cotyledons of Prunus mume "Xue mei". *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 43, 95-100.
25. Ozarowski, M., Błaszkiewicz, S., Gryszczynska, A., Thiem, B. & Budzianowski, J. (2012). Search for C-glycosyl flavones and phenolic acids in callus and shoot in vitro culture of *Passiflora caerulea* L. International conference: "*Business meets science to cooperate in current topics*". Bioconnect. Poznan, Poland.
26. Ozarowski, M., Thiem, B., Gryszczynska, A. & Budzianowski, J. (2013). Studies on *in vitro* seed germination and plant regeneration from mature leaf, internodal and petiol explants of *Passiflora caerulea* L. *56th Convention of the Polish Botanical Society, Interdisciplinary and Practical Significance of Botanical Sciences*. Olsztyn, Poland.
27. Pasternak, T., Miskolczi, P., Ayaydin, F., Mészáros, T., Dudits, D. & Fehér, A. (2000). Exogenous auxin and cytokinin dependent activation of CDKs and cell division in leaf protoplast-derived cells of alfalfa. *Plant Growth Regulation*, 32, 129-141.
28. Prithviraj, H. S., Hemanth Kumar, N. K., Prakasha & Shobha, J. (2015). An efficient *in vitro* regenaretion of multiple shoot from leaf explant of *Passiflora caerulea* L. an important medicinal plant. *International Journal of Recent Scientific Research*, 6(11), 7263-7265.
29. Ragavendran, C., Kamalanathan, D., Reena, G. & Natarajan, D. (2012). *In vitro* propagation of nodal and shoot tip explants of *Passiflora foetida* L. An exotic medicinal plant. *Asian Journal of Plant Science and Research*, 2, 707-711.
30. Siwach, P. & Gill, A. R. (2011). Enhanced shoot multiplication in *Ficus religiosa* L. in the presence of adenine sulphate, glutamine and phloroglucinol. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 17(3), 271-280.
31. Soares, W. S., Rêgo, M. M., Rêgo, E. R., Barroso, P. A., Nascimento, K. S. & Ferreira, K. T. (2012). Estabelecimento *in vitro* e micropropagação de maracujá silvestre (*Passiflora foetida* L.). *Revista Brasileria de Plants Medicinais*, 14, 138-142.
32. Verdeil, J. L., Alemanno, L., Niemenak, N. & Tranbarger, T. J. (2007). Pluripotent versus totipotent plant stem cells dependence versus autonomy Trends. *Plant Science*, 12,245-252.
33. Vieira, L. M., Rocha, D. I., Taquetti, M. F., Da Silva, L. C., De Campos, J. M. S., Viccini, L. F. & Otoni, W. C. (2014). *In vitro* plant regeneration of *Passiflora setacea* (Passifloraceae): the influence of explant type, growth regulators, and incubation conditions. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 50(6), 738-745.
34. Yantcheva, A., Vlahova, M. & Antanassov, A. (1998). Direct somatic embryogenesis and plant regeneration of arnation (*Dianthos caryophyllus* L.). *Plant Cell Reports*, 18, 148-153.

Archive of SID

www.SID.ir