



بررسی امکان ریزازدیادی گیاه زینتی دراسنا با استفاده از روش کشت درون شیشه‌ای

رضا شیرزادیان خرم آباد^{۱*}، صدیقه نصررمزی^۲، اشرف السادات میرعباسی^۳

^۱ استادیار گروه بیوتکنولوژی گیاهی دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه گیلان

^۲ دانشجوی دکتری بیوتکنولوژی گیاهی، دانشگاه گیلان

^۳ کارشناس پژوهشی پژوهشکده محیط زیست، جهاد دانشگاهی گیلان

تاریخ دریافت: ۱۳۹۱/۰۹/۰۷، تاریخ پذیرش: ۱۳۹۲/۰۸/۰۵

چکیده

دراسنا (*Dracaena*) از جمله گیاهان ارزشمند و زینتی در ایران و جهان محسوب شده که تکثیر انبوه و ایجاد تنوع ژنتیکی در آن در تحقیقات ریز ازدیادی و به‌نژادی از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. در این تحقیق به منظور کالوس‌زایی و باززایی رقم Tricolor از گونه *Dracaena marginata*، از قطعات کوچک جوان ساقه با طول ۰/۵ cm استفاده شد. به منظور بررسی کنترل آلودگی‌های سطحی بافت‌های فوق از هیپوکلریت سدیم (غلظت‌های ۰/۱٪، ۱/۲۵٪، ۱/۵٪) در زمان‌های ۱۵ و ۱۰ دقیقه استفاده گردید. غلظت‌های متفاوت از تنظیم‌کننده‌های رشد 2,4-D، NAA و Kinetin در محیط پایه MS جهت ارائه مناسب‌ترین محیط غذایی به منظور القاء کالوس، باززایی شاخساره از کالوس و ریشه‌زایی شاخساره مورد بررسی قرار گرفت. جهت انجام بخش‌های مختلف این پژوهش از طرح‌های آزمایشی مناسب استفاده گردید. نتایج بدست آمده نشان می‌دهد که مناسب‌ترین تیمار برای ضدعفونی قطعات فوق همراه با بالاترین درصد سلامت بافت‌ها مربوط به غلظت ۱/۲۵٪ هیپوکلریت سدیم به مدت ۱۵ دقیقه بود. مناسب‌ترین غلظت‌های تنظیم‌کننده‌های رشدی در محیط MS جهت القاء کالوس در قطعات کوچک ساقه دراسنا شامل $0/5 \text{ mgL}^{-1}$ 2,4-D و یا 1 mgL^{-1} NAA و میزان 1 mgL^{-1} Kinetin به منظور باززایی شاخساره از کالوس و غلظت 1 mgL^{-1} از NAA به منظور القاء ریشه‌زایی در شاخساره در محیط پایه MS تعیین شد. با توجه به تعیین محیط غذایی مناسب جهت القاء کالوس در بافت ساقه دراسنا و امکان باززایی شاخساره در این تحقیق، امکان به‌نژادی و انتقال ژن‌های مطلوب به این گیاه زینتی ارزشمند تسهیل شده است.

واژه‌های کلیدی: *Dracaena marginata*، باززایی، تنظیم‌کنندگان رشد، کالوس، کشت بافت

مقدمه

جوانه انتهایی در سال ۱۹۷۶ انجام شد (Miller & Murashige, 1976). مطالعات بعدی با استفاده از تکثیر جوانه جانبی در *D. deremensis* (Badawy et al., 2005; Blanco et al., 2004) و در *D. fragrans* و باززایی قطعات ساقه در *D. marginata* (Dragan et al., 1989; Chua et al., 1981, Vinterhalter,) و *D. fragrans* (al., 1989) صورت گرفت. تأثیر ۴ ماده تنظیم کننده رشد از جمله BA, 2,4-D, NAA و IBA بر کالزایی، باززایی و ریشه‌زایی قطعات کوچک ساقه *D. fragrans* بررسی شد (Vinterhalter, 1989). در پژوهشی از هورمون IAA طبیعی عصاره نارگیل برای تولید و رشد ریشه در *D. purplecompacta* L. استفاده شد (Agampodi and Jayawardena, 2009). همچنین به ترتیب غلظت‌های $2/3 \text{ mgL}^{-1}$ ، $1/1$ و $0/2$ از IAA جهت کالوس‌زایی، جوانه‌زنی و ریشه‌زایی *Dracaena surculosa* استفاده شده است (Liu et al., 2010). استفاده از غلظت 1 mgL^{-1} از NAA و Kinetin نیز برای کالزایی قطعات کوچک دراسنا مناسب دانسته شده است (Blanco et al., 2004). همچنین بیشترین تعداد جوانه ساقه با افزودن 1 mgL^{-1} از IAA و Kinetin و نیز بیشترین تعداد ریشه را با افزودن 5 mgL^{-1} از IBA به محیط کشت MS در *Dracaena fragrans* بدست آمد (Badawy et al., 2005). 'Tricolor' از جمله زیباترین ارقام گلدانی دراسنا از گونه *Dracaena marginata* محسوب شده که دارای برگ‌های سبز تیره با

گیاه دراسنا با نام علمی *Dracaena spp.* متعلق به خانواده *Asparagaceae* بوده و با نام انگلیسی *Dracaena* یا درخت ازدهای ماداگاسکار^۱ شناخته می‌شود. جنس *Deracaena* دارای ۶۰ گونه بوده و در زیستگاه‌های طبیعی (مناطق گرمسیری آسیا و آفریقا) به شکل درخت یافت می‌شود (Subhashini et al., 2011). چندین گونه آن مانند *D. marginata*، *D. fragrans* و *D. Sanderiana* از جمله گیاهان زینتی محسوب می‌شوند (Henny and Chen, 2003). دراسناها در روشنایی کم و محدود بخوبی رشد کرده و بهترین دامنه pH برای رشد آنها در حدود ۶-۶/۵ است (McConnell et al., 1980). دراسناها همچنین از موادی استروئیدی چون Saponins و Sapogenins که دارای فعالیت سیتوتوکسینی بر علیه سلول‌های سرطانی هستند غنی می‌باشند (Yokoduk et al., 2000). تکثیر این گیاهان علاوه بر بذر با استفاده از روش قلمه زنی امکان پذیر است. از آنجائیکه تعداد جوانه جانبی و نیز جوانه انتهایی در دراسنا محدود است، لذا تکثیر انبوه این گیاه از نقطه نظر دارویی و تجارتي از اهمیت قابل توجهی برخوردار بوده و از جمله اهداف تحقیقات ریزازدیادی و به‌نژادی محسوب می‌شود. مطالعات زیادی در زمینه ریزازدیادی انواع گونه‌های دراسنا با استفاده از روش کشت بافت انجام شده‌است. اولین بار تکثیر درون شیشه‌ای دراسنا با استفاده از

¹ Madagascar dragon tree

بررسی آلودگی‌های سطحی قطعات کوچک ساقه در اسنا

ابتدا گیاهان مادری به مدت یک ماه در گلخانه نگهداری و مراقبت‌های لازم به‌منظور رشد مناسب و سالم گیاهان اعمال گردید. از سه غلظت متفاوت هیپوکلریت سدیم شامل غلظت‌های ۱٪، ۱/۲۵٪ و ۱/۵٪ در ترکیب با دو دوره زمانی ۱۰ و ۱۵ دقیقه به‌منظور کنترل آلودگی‌های سطحی قطعات کوچک ساقه استفاده شد و مناسب‌ترین تیمار در این خصوص جهت کنترل آلودگی سطحی قطعات کوچک ساقه با بالاترین درصد سلامت و زنده‌مانی بافت‌ها شناسایی گردید.

کالوس‌زایی در قطعات کوچک ساقه در اسنا

این آزمایش به‌منظور شناسایی مناسب‌ترین محیط غذایی القاء کالوس در قطعات کوچک ساقه انجام شد. لذا قطعات کوچک سالم و جوان ساقه با طول ۰/۵ cm از گیاهان مادری جدا و پس از اعمال مناسب‌ترین روش ضدعفونی، در سطح محیط کشت MS حاوی مقادیر متفاوتی (1 mgL^{-1} ، ۰/۵، ۱ و ۲) از تنظیم‌کنندگان رشدی NAA و 2,4-D کشت شدند. شرایط محیطی مورد نیاز نگهداری بافت‌های کشت شده، فتوپریود (۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی) و دمای ۲۶ درجه سانتی‌گراد اعمال شد. بعد از گذشت حدود ۴ هفته کالوس‌ها به تدریج و شمارش تعداد کالوس‌ها انجام و داده‌های بدست آمده بر اساس طرح کاملاً تصادفی در ۳ تکرار آنالیز شدند.

حاشیه قرمز و در قسمت پایین و مرکز برگ دارای نوار طلائی رنگ است. پژوهش حاضر شناسایی مناسب‌ترین تیمار ضدعفونی قطعات کوچک و جوان ساقه‌ها با بالاترین درصد سلامت در بافت‌های فوق، و نیز بررسی مناسب‌ترین محیط غذایی القاء کالوس در قطعات کوچک ساقه (*D. marginata* (Tricolor)، باززایی کالوس‌ها و ریشه‌زایی گیاهچه‌ها را مورد توجه قرار داد.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی، محیط کشت، تنظیم‌کنندگان رشد و خاک مورد استفاده

در این تحقیق از گیاه زیتتی رقم 'Tricolor' متعلق به گونه *Dracaena marginata* استفاده شد. تنظیم‌کنندگان رشدی مورد استفاده در این پژوهش شامل NAA، 2,4-D و Kinetin (غلظت‌های مختلف صفر تا 3 mgL^{-1}) بودند. محیط کشت اصلی و پایه مورد استفاده محیط غذایی MS با $\text{pH} = 5.7$ (Murashige & Skoog, 1962) بود. نمونه‌های کشت شده به‌منظور کالزایی، جوانه‌زنی و ریشه‌زایی، در اتاقک رشد در دما و فتوپریود مناسب و مورد نیاز در هر بخش نگهداری شدند. در مراحل نهایی جهت رشد و ریشه‌زایی، گیاهچه‌ها به خاک مناسب (ترکیبی از پیت‌ماس و شن) انتقال یافتند.

باززایی شاخساره از کالوس

به منظور باززایی شاخساره، کالوس‌های ایجاد شده با سن مشابه به محیط کشت MS حاوی مقادیر 0 ، 1 ، 2 و 3 mgL⁻¹ Kinetin انتقال یافتند. نگهداری بافت‌ها در این مرحله تحت فتوپریود (۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی) و دمای ۲۶ درجه سانتی‌گراد اعمال شد. در نهایت تعداد شاخساره‌های باززایی شده از کالوس‌ها شمارش شد. سپس تعداد شاخساره باززایی شده از کالوس‌ها شمارش و داده‌های بدست آمده با استفاده از طرح کاملاً تصادفی در ۳ تکرار آنالیز شد.

ریشه‌زایی در شاخساره‌ها و انتقال به خاک

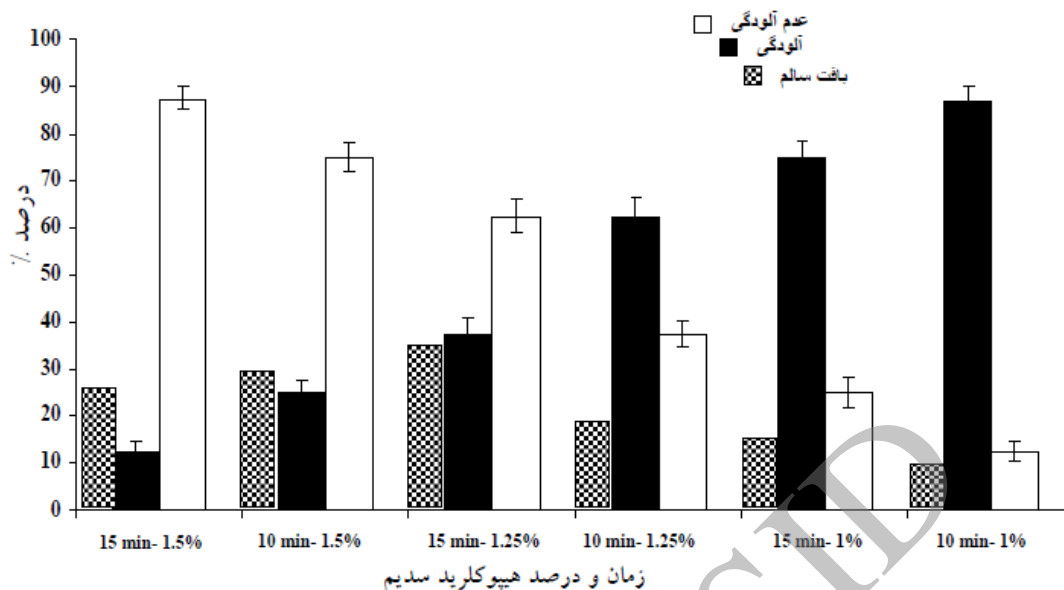
شاخساره‌های باززایی شده از مرحله قبل به منظور القاء ریشه به محیط تغذیه‌ای MS حاوی مقادیر متفاوتی از NAA (0 ، $0/5$ و 1 mgL⁻¹) انتقال یافتند. محیط نگهداری شاخساره برای ریشه‌زایی شامل فتوپریود (۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی) و دمای ۲۶ درجه سانتی‌گراد اعمال شد. در این آزمایش تعداد شاخساره‌های ریشه‌دار شده شمارش و با شرایط خاک مقایسه شدند. شاخساره‌ها بعد از ریشه‌زایی و رشد کافی برای سازگاری با شرایط *in vivo* انتقال و به مدت ۱-۲ هفته در ماسه استریل و رطوبت محیطی حدود ۹۵٪ نگهداری و آنگاه به خاک مناسب رشد و نمو گیاه دراسنا منتقل شدند. لازم

به ذکر است که آنالیز کلیه داده‌های این پژوهش با نرم افزار MSTAT-C تحت برنامه windows انجام و تمام نمودارها با استفاده از برنامه Excel نسخه ۲۰۰۳ رسم شدند.

نتایج و بحث

کنترل آلودگی در قطعات کوچک ساقه دراسنا

حفظ سلامتی حداکثری بافت‌های کوچک ساقه مورد استفاده و کنترل مناسب آلودگی در ریزازدیادی گیاهان زیتنی از اهمیت زیادی برخوردار است. نتایج این آزمایش نشان می‌دهد که افزایش غلظت و زمان تیمار بافت‌ها با محلول هیپوکلریت سدیم موجب افزایش امکان کنترل آلودگی‌های سطحی در قطعات کوچک ساقه و افزایش روند خسارت به سلامت و نکروزه شدن بافت‌های مورد استفاده می‌شود (شکل ۱). افزایش درصد هیپوکلریت سدیم به میزان ۱/۵٪ در دو فاصله زمانی ۱۰ و ۱۵ دقیقه تأثیر مطلوبی بر کنترل آلودگی بافت دارد، اما از میزان سلامت نمونه‌ها کاسته شد. اما با کاهش میزان هیپوکلریت سدیم به ۱٪ نیز به دلیل افزایش شدت آلودگی، بافت‌های بیشتری از بین رفت. در این خصوص استفاده از میزان ۱/۲۵٪ محلول هیپوکلریت سدیم به مدت ۱۵ دقیقه میانگین مطلوبی را در زمینه کنترل آلودگی (۶۳٪) و سلامت بافت‌ها (۳۶٪) ارائه نمود (شکل ۱).



شکل ۱- تأثیر مقادیر مختلف هیپوکلریت سدیم و دوره‌های زمانی متفاوت بر کنترل آلودگی و سلامت بافت‌ها.

Figure 1- The effect of various concentrations of sodium hypochlorite in combination with two different time periods on decontamination and tissue healthiness.

مرکوری کلراید^۲ به منظور استریل نمودن قطعات کوچک در اسنا موثر بود. قرار دادن قطعات کوچک در هیپوکلریت سدیم ۰/۰۷۵٪ به همراه 0.3 gL^{-1} مرکوری کلراید برای مدت ۲۰ دقیقه مناسب بود، اما با افزایش میزان مصرف هیپوکلریت سدیم، تعداد بافت سالم کاهش می‌یابد (Badawy *et al.*, 2005). لذا نتایج این تحقیق ضمن تأیید مطالعات انجام شده مبنی بر استفاده از هیپوکلریت سدیم به عنوان منبع ضدعفونی کننده مناسب، در کلیه مراحل آزمایش از میزان ۱/۲۵٪ محلول هیپوکلریت سدیم به مدت ۱۵ دقیقه جهت ضدعفونی قطعات کوچک ساقه استفاده نموده است.

در پژوهشی استفاده از هیپوکلریت سدیم جهت استریل نمودن بافت‌ها مناسب شناخته شده و قرار دادن قطعات کوچک در اسنا در هیپوکلریت سدیم ۰/۵٪ به مدت ۱۰ دقیقه جهت ضدعفونی پیشنهاد شده است (Chua *et al.*, 1981). در یک بررسی متفاوت تأثیر سه ماده هیپوکلریت سدیم، سرکه و کیتوزان^۱ بر سلامت بافت‌های *Dracaena sanderiana* بررسی و گزارش گردید. در این خصوص بیشترین درصد سلامت بافت‌ها مربوط به استفاده از کیتوزان بود، اما هیپوکلریت سدیم نیز در این مورد دارای کارایی قابل قبولی بود (Gunathilake and Abeywickrama, 2011). در پژوهشی دیگری استفاده توأم از هیپوکلریت سدیم و

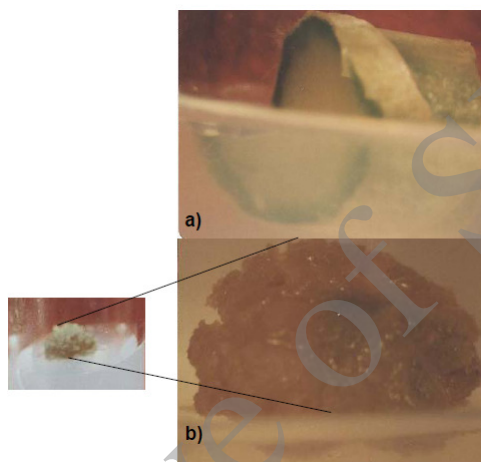
²Mercuric Chloride

¹Chitosan

القاء کالوس در قطعات کوچک ساقه دراسنا

به منظور شناسایی مناسب‌ترین محیط غذایی القاء کالوس در قطعات کوچک ساقه دراسنا، در ۲ آزمایش متفاوت سطوح مختلف دو تنظیم کننده رشد NAA و 2,4-D شامل 0 mgL^{-1} ، $0/5$ ، 1 و 2 در محیط پایه MS مورد بررسی قرار گرفت. بعد از گذشت حدود ۴-۳ هفته از

کشت نمونه‌های کوچک ساقه، کالوس‌ها به تدریج ظاهر شدند. کالوس‌ها عمدتاً در نقاط برش خورده در بافت‌های کوچک جوان ساقه دراسنا القا گردید. بسیاری از کالوس‌های القاء شده در این مرحله فشرده و زرد رنگ بوده و در مراحل بعدی مورد استفاده قرار گرفتند (شکل ۲).



شکل ۲- (a) کشت قطعه کوچک ساقه دراسنا (5cm) در سطح محیط کشت القا کالوس‌زایی، (b) کالوس حاصله از قطعه کوچک ساقه دراسنا بعد از مدت ۴ هفته.

Figure 2- a) *Dracaena* small stem segments cultured on callus induction media, b) Callus derived from small stem segments after 4 weeks.

غلظت 1 mgL^{-1} و در نهایت غلظت 2 mgL^{-1} کمترین درصد القاء کالوس را القاء نمودند (شکل ۳). لذا با افزایش غلظت 2,4-D از $0/5 \text{ mgL}^{-1}$ تا میزان 2 mgL^{-1} از درصد کال‌زایی کاهش می‌یابد. در این خصوص می‌توان محیط غذایی حاوی $0/5 \text{ mgL}^{-1}$ از 2,4-D را به‌عنوان مناسب‌ترین غلظت تنظیم کننده رشد جهت القاء کالوس توصیه نمود. هیچگونه کالوسی در بافت‌های کوچک ساقه کشت شده بر روی محیط‌های غذایی فاقد

براساس جدول تجزیه واریانس (جدول ۱) بین سطوح مختلف 2,4-D و NAA در زمینه القاء کالوس در قطعات کوچک ساقه دراسنا اختلاف معنی‌داری در سطح ۱٪ ملاحظه می‌شود. مقایسه میانگین تأثیر سطوح مختلف تنظیم کنندگان رشد فوق بر میزان کالوس‌زایی بافت‌های ساقه با استفاده از آزمون LSD و $\alpha = 0/5$ انجام شد (شکل ۳ و ۴). همانطور که مشاهده می‌شود در غلظت $0/5 \text{ mgL}^{-1}$ از 2,4-D بیشترین درصد و بعد از آن

باززایی کمتری برخوردارند (Wen-Liang, 2003; Wen-Liang, 2002). لذا وی غلظت 0.5 mg L^{-1} از 2,4-D را بهترین غلظت در زمینه کالوس زایی معرفی کرد. در پژوهشی دیگر نیز میزان $0.25-0.5 \text{ mg L}^{-1}$ 2,4-D برای کالزایی معرفی شد (Vinterhalter, 1989). نتایج فوق بر اهمیت تأثیر تنظیم کننده‌های فوق بر القاء کالوس از قطعات کوچک ساقه دراسنا و نیز نقش موثر آنها در زمینه جنین‌زایی کالوس‌ها صحنه می‌گذارد. لازم به ذکر است که اکسین‌ها خصوصاً 2,4-D و NAA در زمینه القاء کالوس نقش مهمی دارند (Singh et al., 2008).

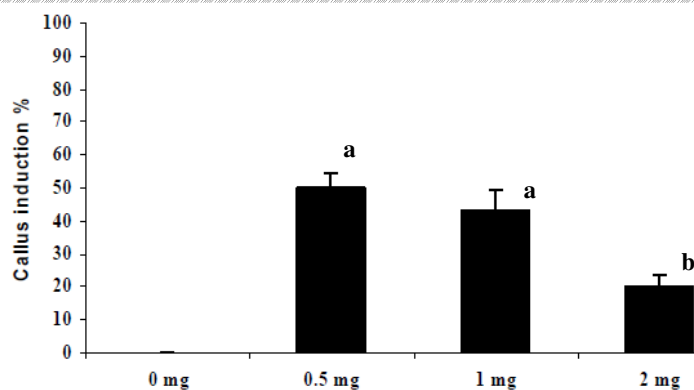
مواد تنظیم‌کننده رشد القاء نگردید. همچنین هیچگونه شاخساره‌ای از کالوس‌ها در محیط‌های حاوی 2,4-D القا نگردید. لذا در قسمت بعدی باززایی شاخساره‌ها از کالوس‌ها با استفاده از تنظیم کننده رشد Kinetin مورد توجه قرار گرفت. در پژوهشی جهت کالوس زایی قطعات کوچک ساقه دراسنا دو سطح 0.5 mg L^{-1} و 0.8 mg L^{-1} از 2,4-D را بر کالزایی قطعات *Dracaena fragrans cv.* را بررسی و پیشنهاد شد علی‌رغم اینکه بیشترین درصد کالزایی مربوط به غلظت 0.8 mg L^{-1} مربوط می‌شود، اما کالوس شکل گرفته در این غلظت در مقایسه با کالوس‌های بدست آمده از غلظت 0.5 mg L^{-1} از توانایی

جدول ۱- تجزیه واریانس تأثیرات جداگانه هر یک از تنظیم کننده‌های NAA و 2,4-D در ۲ آزمایش کالزایی قطعات کوچک ساقه دراسنا و آزمایش تأثیر Kinetin بر باززایی کالوس‌ها.

Table 1- Variance Analysis of individual effects of various levels of 2,4-D and NAA on callus induction in small stem segments of *Dracaena* and effect of Kinetin on plantlet regeneration from callus.

	درجه آزادی df	مجموع مربعات SS	میانگین مربعات MS	ارزش F F _{value}
2,4-D	3	47	15.667	14.446**
NAA	3	50.917	16	67.889**
Kinetin	3	104.258	37.750	69.500**

** در سطح احتمال ۱٪ و ۵٪ معنی‌دار است.

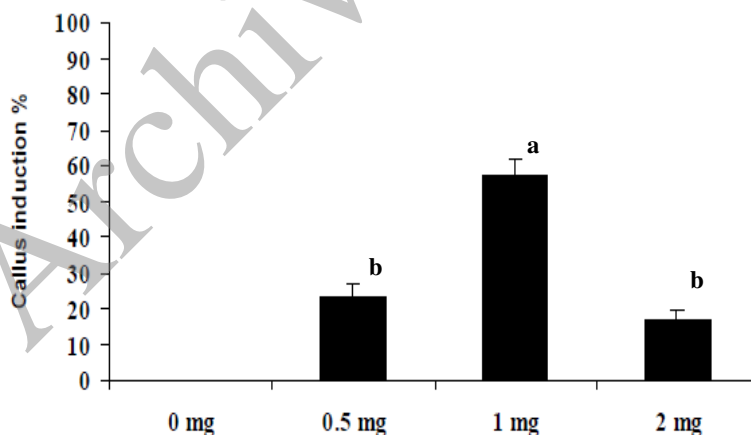


شکل ۳- مقایسه میانگین تأثیر غلظت‌های متفاوت 2,4-D بر القاء کالوس در قطعات کوچک ساقه در اسنا.

Figure 3- Mean comparison of different concentrations of 2, 4-D on *Dracaena* callus induction.

۰/۵^۱ و ۲ mgL^{-۱} درصد القاء کالوس در قطعات کوچک ساقه در اسنا کاهش یافت (شکل ۳). لذا در این خصوص می‌توان محیط غذایی حاوی ۱ mgL^{-۱} از NAA را به‌عنوان مناسب‌ترین غلظت جهت القاء کالوس توصیه نمود.

بر اساس نتایج بدست آمده در خصوص بررسی تأثیر سطوح مختلف NAA (شکل ۴)، هیچ‌گونه کالوسی در بافت‌های کشت شده روی محیط‌های غذایی فاقد NAA تشکیل نشد. همچنین غلظت ۱ mgL^{-۱} دارای بیشترین درصد القاء کالوس و به ترتیب در غلظت‌های mgL^{-۱}



شکل ۴ - مقایسه میانگین تأثیر غلظت‌های متفاوت NAA بر القاء کالوس در قطعات کوچک ساقه در اسنا.

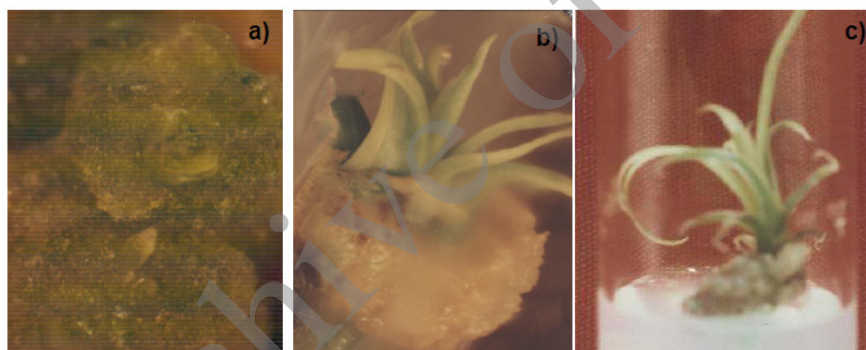
Figure 4- Mean comparison of different concentrations of NAA on callus induction in stem segments of *Dracaena*.

از کالوس‌ها در قطعات کوچک ساقه در اسنا شود (شکل ۳ و ۴).

باززایی شاخساره از کالوس

در این قسمت به منظور باززایی شاخساره در اسنا از کالوس‌های بدست آمده، از غلظت‌های متفاوت Kinetin (0 ، 1 و 2 و 3 mgL^{-1}) در محیط کشت MS استفاده شد. بعد از گذشت ۴ هفته، القاء تمایز در کالوس‌ها به صورت تولید کلروفیل و ظاهر شدن تدریجی تمایز برگچه‌ها مشاهده شد (شکل ۵).

بررسی سطوح مختلف 2,4-D و NAA در زمینه القاء کالوس در قطعات کوچک ساقه در اسنا نشان‌دهنده اهمیت این دو ماده تنظیم کننده بر القاء کالوس در قطعات کوچک ساقه در اسنا می‌باشد (Wen-Liang, 2002). بنابراین نتایج دیگر محققان نیز دستاوردهای این تحقیق را تأیید می‌کند. لذا با بر اساس نتایج حاصله، اضافه نمودن میزان 0.5 mgL^{-1} از 2,4-D و یا 1 mgL^{-1} از NAA به تشکیل در محیط غذایی MS توصیه شده و می‌تواند موجب القاء درصد قابل توجهی



شکل ۵- تمایز کالوس‌های حاصله از قطعات کوچک ساقه در اسنا و باززایی آنها (a-c).

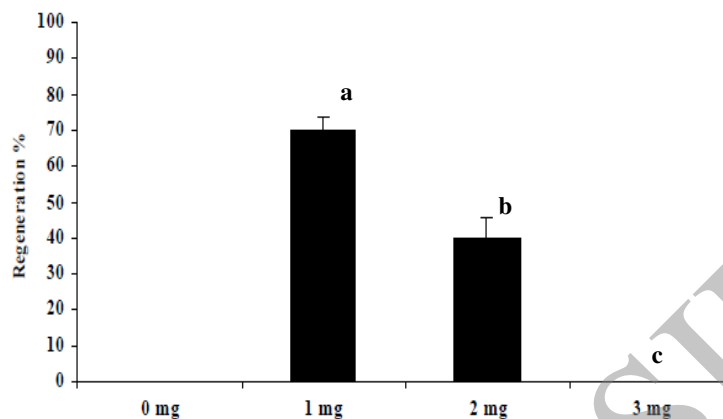
Figure 5- a, b and c) callus Differentiation and regeneration from small stem segments *Dracaena*.

مقایسه میانگین تأثیر سطوح مختلف Kinetin بر میزان تمایز نشان می‌دهد که بیشترین درصد باززایی به ترتیب در غلظت‌های 1 mgL^{-1} و 2 mgL^{-1} از Kinetin به ترتیب به میزان ۶۹٪ و ۴۰٪ مشاهده شد. در غلظت 3 mgL^{-1} از Kinetin هیچ‌گونه باززایی در کالوس‌ها مشاهده نشد (Rout et al., 1990) (شکل ۶). لذا در

بر اساس نتایج تجزیه واریانس (جدول ۱) در زمینه باززایی شاخساره از کالوس‌های مورد استفاده، بین سطوح مختلف Kinetin در سطوح احتمال ۱٪ و ۵٪ اختلاف معنی‌داری وجود دارد. مقایسه میانگین تأثیر سطوح مختلف Kinetin بر میزان تمایز شاخساره از کالوس‌ها با استفاده از آزمون LSD و $\alpha = 5\%$ انجام شد (شکل ۶). نتایج

شاخساره از کالوس، تقسیم سلولی و تمایز بافت-ها نقش داشته و نیز مانع از نکروزه و زرد شدن قطعات کوچک ساقه می شود (Singh et al., 2008).

صورت استفاده از Kinetin در مقادیر بین 1 mgL^{-1} و 2 mgL^{-1} امکان القاء تمایز در کالوسها افزایش می یابد (Chua et al., 1981). لازم به ذکر است که Kinetin در القاء تشکیل جوانه و باززایی



شکل ۶- مقایسه میانگین تأثیر غلظت‌های متفاوت Kinetin به منظور باززایی و تمایز کالوس.

Figure 6- Mean comparison of different concentrations of Kinetin on callus Differentiation and regeneration.

بیشترین تعداد برگ را تولید کرد. طی پژوهشی با بهره گیری از محیط پایه MS حاوی Kinetin 1 mgL^{-1} و میزان 0.8 mgL^{-1} IAA بیشترین درصد باززایی شاخساره را بدست آمد (Kobza et al., 1991). در باززایی گیاهچه‌های کتان از Kinetin استفاده و توصیه شده که بیشترین درصد باززایی در محیط کشت MS حاوی Kinetin 0.25 mgL^{-1} حاصل می شود و با افزایش از مقدار فوق درصد باززایی کاهش می یابد (Rauf et al., 2004). در پژوهشی دیگر نیز بیشترین درصد باززایی شاخساره *Dracaena marginata* cv. Tricolor از محیط MS حاوی 4 mgL^{-1} BA و 0.05 mgL^{-1} NAA بدست آمد، در حالی که با استفاده از محیط کشت MS حاوی IBA و NAA (2 mgL^{-1} و 0.1) تعداد ریشه

در پژوهشی میزان 1 mgL^{-1} از Kinetin را به عنوان مناسب ترین غلظت جهت باززایی شاخساره‌های *Dracaena deremensis* توصیه شد (Blanco et al., 2004). در پژوهشی دیگر نیز غلظت $1/1 \text{ mgL}^{-1}$ IAA جهت باززایی شاخساره گیاه *Dracaena surculosa* از کالوس توصیه شده است (Liu et al., 2010). غلظت‌های متفاوتی از Kinetin جهت باززایی شاخساره *Dracaena fragrans* در سه محیط کشت MS، $3/4 \text{ MS}$ و $1/2 \text{ MS}$ بررسی و پیشنهاد شده است که استفاده از 1 mgL^{-1} Kinetin همراه با 0.05 mgL^{-1} IAA برای باززایی شاخساره‌ها در محیط کشت $1/2 \text{ MS}$ موثر بوده و با افزایش غلظت Kinetin از باززایی کاسته می شود (Badawy et al., 2005). همچنین این محیط

شاخساره‌های بدست آمده از مرحله قبل به منظور القاء ریشه‌زایی، به محیط کشت MS حاوی مقادیر متفاوت از NAA (0.5 mgL^{-1} و 0.1 mgL^{-1}) و ۱ و ۷ (شکل ۷ و ۸). در این آزمایش محیط خاک استریل به عنوان شاهد در نظر گرفته شد.

افزایش چشمگیری داشت (Atta-Alla *et al.*, 1996). لذا براساس نتایج بدست آمده در این پژوهش استفاده از غلظت 1 mgL^{-1} از Kinetin در محیط پایه MS جهت باززایی شاخساره‌ها از کالوس‌های دراستنا توصیه می‌شود.

ریشه‌زایی در شاخساره



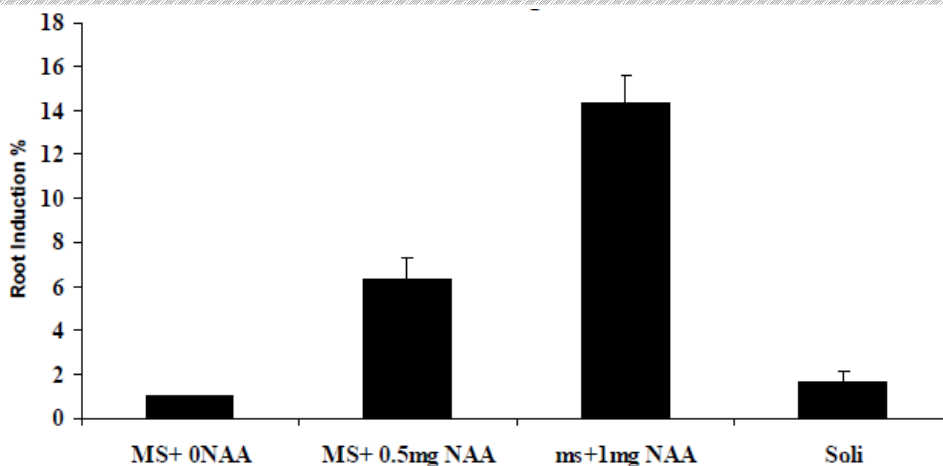
شکل ۷- ریشه‌زایی شاخساره های دراستنا در محیط کشت القاء ریشه (a-d).

Figure 7- Root induction in regenerated *Dracaena* plantlets in root induction medium (a-d).

NAA کمترین درصد ریشه‌زایی یعنی ۱٪ را داشت که این مقدار میزان از درصد ریشه‌زایی گیاهچه‌ها در خاک کمتر بود (شکل ۸). لذا در صورت استفاده از NAA به میزان 1 mgL^{-1} ، درصد ریشه‌زایی افزایش می‌یابد اما با افزایش این مقدار، درصد ریشه‌زایی کاهش یافت (شکل ۸).

بر اساس نتایج بدست آمده در این آزمایش استفاده از NAA در غلظت 1 mgL^{-1} می‌تواند بیشترین درصد ریشه‌زایی (۱۴٪) را در شاخساره‌ها القاء نماید. سپس به ترتیب غلظت 0.5 mgL^{-1} به میزان ۶/۲٪ و نمونه شاهد یعنی گیاهچه‌های انتقال یافته به خاک با میزان ۱/۹۵٪ توانستند ریشه‌زایی را القا نمایند. همچنین عدم استفاده از

شیرزادیان خرم آباد و همکاران، ۱۳۹۳



شکل ۸- تأثیر غلظت‌های متفاوت NAA بر القاء ریشه در دراسنا در مقایسه با خاک.

Figure 8- Effect of various concentrations of NAA on root induction in *Dracaena* in comparison with soil.

افزایش غلظت NAA قطر ریشه افزایش ولی از طول آن کاسته می‌شود. براساس نتایج بدست آمده در تحقیق حاضر می‌توان غلظت 1 mgL^{-1} از NAA را برای القاء ریشه در شاخساره‌های باززایی شده از کالوس‌های حاصله از قطعات کوچک ساقه دراسنا توصیه نمود.

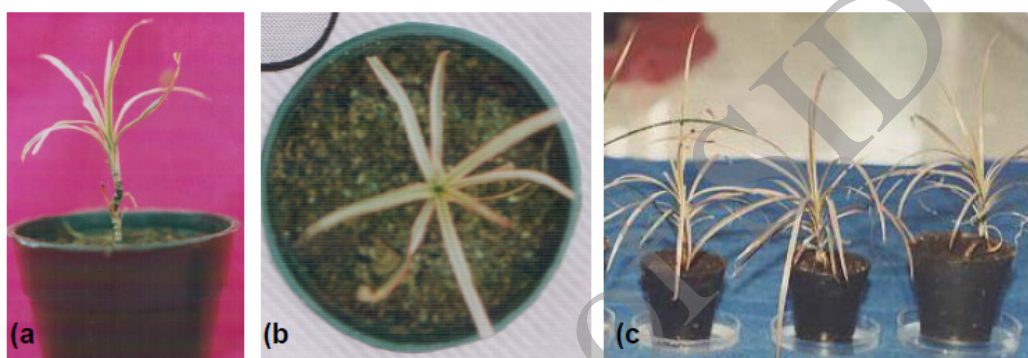
انتقال به خاک و سازگاری با شرایط *in vivo*

یکی از مهمترین مراحل تکنیک کشت بافت انتقال موفقیت‌آمیز گیاهان بعد از تکثیر از محیط *in vitro* به *in vivo* است که به دلیل تغییر شرایط محیطی ضروری است با دقت و توجه ویژه انجام گیرد. شرایط *in vitro* عموماً شامل نور کم، رطوبت زیاد و ریشه‌زایی ضعیف است، در حالی که شرایط *in vivo* از نظر نور و حرارت بسیار متفاوت است (Wardle et al., 1983). براین اساس ابتدا روی گلدان‌ها یک مانع

براساس مطالعات انجام شده تعیین گردید که ۹۰-۱۰۰٪ ریشه‌زایی در محیط حاوی NAA رخ داده و موجب کوتاه و ضخیم شدن ریشه‌ها می‌شود (Stankovic, 1991). همچنین استفاده توأم از IBA و NAA را بر ریشه‌زایی بررسی و بیان شد که غلظت 1 mgL^{-1} از NAA بیشترین تعداد ریشه را تولید نمود و موجب کاهش طول ریشه می‌شود (Badawy et al., 2005). همچنین با افزایش غلظت NAA تا 5 mgL^{-1} رشد ریشه متوقف شد. سطوح مختلف NAA (۰، ۱۰۰، ۲۰۰، ۳۰۰ و ۴۰۰) در زمان‌های ۴۸ و ۷۲ ساعت روی گیاه *Dracaena sanderiana* (lucky bamboo) بررسی و مشخص شد که استفاده از میزان NAA ۱۰۰، ۲۰۰ و ۳۰۰ ppm در زمان‌های ۴۸ و ۷۲ ساعت بیشترین درصد ریشه‌زایی را القا می‌کند (Shakouri et al., 2012). در این تحقیق همچنین توصیه شد که با

دراسنا دارای اهمیت ویژه‌ای است. بدین منظور گیاهچه‌ها به مدت ۱-۲ هفته در ماسه استریل و رطوبت محیطی حدود ۹۵٪ نگهداری و آنگاه به خاک مناسب (ترکیبی از پیت ماس و شن با نسبت ۱:۱) شده و به گلخانه انتقال یافتند (شکل ۹).

پلاستیکی همراه با چند منفذ به منظور هوادهی مناسب قرار می‌گیرد. بعد از مدت یک هفته و اطمینان از رشد مناسب گیاهچه‌ها، سزپوش فوق برداشته می‌شود. قابل ذکر است که یکی از نهاده‌های اصلی تولید برای پرورش گیاهان زینتی به ویژه گیاهان گلدانی، بسترهای کشت مناسب است. لذا تأمین و آماده‌سازی خاک مناسب برای



شکل ۹- انتقال گیاهچه‌های دراسنا به خاک (a-c).

Figure 9- Transfer of *Dracaena* plantlets to the proper soil (a-c).

شاخساره در محیط غذایی MS است. همچنین می‌توان گفت که با توجه به ارائه مناسب محیط غذایی جهت القاء کالوس در بافت ساقه دراسنا و امکان باززائی شاخساره‌ها، امکان به‌نژادی این گیاه زینتی و استفاده از این روش جهت انتقال ژن‌های مطلوب فراهم شده است.

در مجموع می‌توان گفت مناسب‌ترین غلظت تنظیم کننده رشد جهت القاء کالوس در قطعات کوچک ساقه دراسنا $2,4-D$ $0/5mgL^{-1}$ و NAA $1mgL^{-1}$ و میزان $Kinetin$ $1mgL^{-1}$ به‌منظور باززایی شاخساره از کالوس و غلظت NAA $1mgL^{-1}$ به‌منظور القاء ریشه‌زایی در

منابع

- Atta-Alla H, Zaghloul M, Waly AK, Khattab SH (1996). Micropropagation of some Ornamental plants. *In vitro* culture and establishment of *Dracaena marginata* var. Tricolor. *Annals of Agricultural Science* 34: 1153-1162.
- Agampodi VA, Jayawardena B (2009). Effect of coconut (*Cocos nucifera* L.) water extracts on adventitious root development in vegetative propagation of *Dracaena purplecompacta* L. *Acta Physiologiae Plantarum* 31: 279-284.

- Badawy EM, Afaf MA, El-Bana A, Gehan M (2005). Propagation of *Dracaena fragrans* plants by tissue culture technique. *Arabian Journal of Biotechnology* 8: 329-342.
- Blanco M, Valverde R, Gomez L (2004). Micropropagation of *Dracaena deremensis*. *Agronomia Costarricense* 28: 7-15.
- Chua BU, Kunisaki JT, Sagawa Y (1981). *In vitro* propagation of *Dracaena marginata* Tricolor. *Horticulture Science* 16: 494.
- Dragan VV (1989). *In vitro* propagation of green foliage *Dracaena fragrans* Ker. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 17: 13-19.
- Gunathilake C, Abeywickrama KP (2011). Growth promotion and preservation of bare rooted plants of *Dracaena sanderiana* for commercialization. *Tropical Agricultural Research & Extension* 14: 1-4.
- Kobza F, Vachunova J (1991). Propagation of *Dracaena in vitro*. Propagation of *Dracaena Concina*. *Acta University of Agriculture Faculty of Horticulture* 6: 51-55.
- Henny RJ and J Chen (2003). Cultivar development of ornamental foliage plants, p. 245–290. In: Janick, J. (ed.). *Plant breeding reviews*. Volume 23. John Wiley and Sons, Inc., Hoboken, NJ.
- Liu J, Deng M, Henry RJ, Chen J (2010). Regeneration of *Dracaena surculosa* Through Indirect Shoot Organogenesis. *Horticulture science* 45:1250-1254.
- McConnell DB, Henley RW, Biamonte RL (1980). Commercial foliage plants. pp. 544-593. In: Joiner, J. N. (ed.) *Foliage Plant Production*. Prentice-Hall, Inc. Englewood Cliffs, UK.
- Miller LR, Murashige T (1976). Tissue culture propagation of tropical foliage plants. *In vitro* 12:797-813.
- Murashige T, Skoog F (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Plant Physiology* 15: 473-497.
- Rauf S, Rahman H, Manzoor Khan T (2004). Effect of kinetin on multiple shoot induction in cotton (*Gossypium hirsutum* L.) cv. NIAB-999. *Iranian Journal of Biotechnology* 2: 279-282.
- Rout GR, Debata BK, Das P (1990). *In vitro* clonal multiplication of roses. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 60: 311- 318.
- Shakouri MJ, mohammadi J, Shahmohammadi S, Kapourchal SA (2012). Assessing the effect of different levels of NAA and time on *Dracaena sanderiana* (lucky bamboo). *Indian Journal of Science and Technology* 5: 0974- 6846.
- Singh A, Kumar J, Kumar P (2008). Effect of plant growth regulators and sucrose on postharvest physiology, membrane stability and vase life of cut spikes of gladiolus. *Plant growth Regulation* 55: 221-229.
- Stankovic S (1991). *In vitro* propagation of *Dracaena fragrans* ker, cordyline terminalis cv (Kiwi) and *Sansevieria trifasciata* Var. Laurentii. *Original Scientific Paper* 23: 35-41.
- Subhashini RMB, Amarathunga NLK, Krishnarajah SA, Eeswara JP (2011). Effect of Benzylaminopurine, Gibberellic Acid, Silver Nitrate and Silver Thiosulphate, on postharvest longevity of cut leaves of *Dracaena*. *Ceylon Journal of Science* 40: 157-162.
- Vinterhalter DV (1989). *In vitro* propagation of green-foliaged *Dracaena fragrans* Ker. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 17: 13-19.
- Yokoduk A, Y Mimaki and Y Sashida (2000). Steroidal saponins from *Dracaena surculosa*. *J. Nat. Prod.* 63:1239–1243.
- Wardle K, Dobbs KB, Short KC (1983). *In vitro* acclimatization of aseptically cultured plantlets to humidity. *Journal of American Society of Horticultural Science* 108: 386-389.

- Wen-Liang LU (2002). Direct regeneration of inflorescence from callus in *Dracaena fragrans* cv. Massangeana hort. Journal of Integrative Plant Biology 44: 113-116
- Wen-Liang LU (2003). Control of *in vitro* regeneration of individual reproductive and vegetative organs in *Dracaena fragrans* cv. Massangeana hort. Journal of Integrative Plant Biology 45: 1453-1464.

Archive of SID

Assessment of micropropagation of ornamental plant "*Dracaena marginata*" using *in vitro* culture

Shirzadian-Khorramabad R. ^{*1}, Nasr Ramzi S. ², MirAbasi A. ³

¹ Assistant professor, Department of plant Biotechnology, University of Guilan, Rasht, Iran.

² PhD student in plant biotechnology, University of Guilan, Rasht, Iran.

³ Expert of Environmental Research Institute of Guilan Jihad-e-Daneshgahi, Rasht, Iran.

Abstract

Dracaena (Dracaena marginata) is one of the important economic ornamental plants in Iran as well as around the world. Micropropagation and enhancement in genetic variation of various ecotypes of this ornamental plant have been considered in several research studies for several years. The main objective of this study was maintenance of the best media culture for callus induction and shoots regeneration in *Dracaena* "Tricolor". Therefore, small stem segments of 0.5 cm in length were cut from the maternal plants. In order to set up a proper decontamination control system for *Dracaena* small stem segment, various levels of sodium hypochlorite including 1%, 1.25% and 1.5% were applied in combination with different time periods of 15 and 10 minutes. Moreover, the most suitable medium cultures for callus induction, shoots regeneration and root induction were identified. A proper statistic approach has been used for data analysis in various stages of callus induction and shoots regeneration. The obtained results showed that the most appropriate decontamination treatment to obtain the highest percentage of tissue healthiness could be applied by using 1.25% sodium hypochlorite for 15 minutes. The most suitable MS medium for callus induction was contained either 0.5 mg/l 2,4-D or 1 mg/l NAA. Moreover, applying the following growth regulators including 1 mg/l Kinetin in MS based medium, and 1 mg/l NAA provided the best results for shoots regeneration and root induction.

Keywords: *Dracaena marginata* "Tricolor", regeneration, Growth regulators, Callus, Tissue culture.

* Corresponding Author: Shirzadian R.K.

Tel: 01316690282

Email: R.shirzadian@gmail.com