Archive of SID

مجله علوم کشاورزی و منابع طبیعی
جلد سیزدهم، شماره چهارم، مهر- آبان ۱۳۸۵
www.magiran.com/jasnr

تأثیر تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی بر کال زایی و رشد کالوس در قطعات جدا کشت ساقه کاج تهران (*Pinus eldarica* M.)

*حمید صادقی[۱]، رمضانعلی خاوری‌نژاد[۲]، حمید فهیمی[۳] و فتح‌اله فلاحیان[۱]
[۱]گروه تخصصی زیست گیاهی دانشگاه آزاد واحد علوم و تحقیقات تهران، [۲]گروه زیست‌شناسی دانشگاه تربیت معلم تهران،
[۳]گروه زیست‌شناسی دانشکده علوم، دانشگاه تهران

تاریخ دریافت: ۸۳/۹/۲۵ ؛ تاریخ پذیرش: ۸٤/۱۱/۳

چکیده

توانایی کال‌زایی و میزان رشد کالوس در قطعات جدا کشت درختان ۵ تا ٦ ساله کاج تهران (*Pinus eldarica* M.)، در سه محیط کشت متفاوت MMS، WPM_1 و WPM_2 مورد بررسی قرار گرفت. نتایج حاصل از این بررسی که با تجزیه واریانس در قالب طرح کاملاً تصادفی انجام شد، نشان داد که در سطح اطمینان کمتر از یک درصد تفاوت معنی‌داری از نظر کال‌زایی در بین سه محیط مذکور وجود دارد. همچنین با مقایسه میانگین‌ها به وسیله آزمون چند دامنه ای جدید دانکن در سطح یک درصد مشخص شد که از بین سه محیط مذکور، محیط کشت پایه MMS با محیط پایه WPM_2 تفاوت معنی‌داری ندارد اما هر دو محیط ذکر شده با محیط پایه WPM_1 تفاوت معنی‌دار دارند، ضمن اینکه از نظر کیفی کالوس حاصل از محیط کشت پایه MMS شفاف تر از کالوس حاصل از محیط پایه WPM_2 به نظر می‌رسید. علاوه‌بر این شرایط هورمونی لازم برای کال زایی و رشد کالوس در تیمارهای متفاوت محیط پایه MMS مورد بررسی دقیق‌تر قرار گرفت. نتایج حاصل از بررسی‌های اخیر نیز که با آنالیزهای آماری ذکر شده همراه بود نشان داد که برای کال‌زایی، حضور هورمون اکسینی 2,4-D در محیط کشت ضروری است و در مقایسه با NAA برای رشد کالوس بهتر است. افزایش غلظت هورمون مذکور تا ۷/۵ میلی‌گرم در لیتر، باعث افزایش میزان کال زایی می‌گردد اما در واکشت‌های پس از کال زایی میزان رشد کالوس در غلظت‌های پایین‌تر، بیشتر است. در ضمن کال زایی مناسب و رشد بهینه کالوس کاج تهران در غلظت‌های ۰/۵ تا ۷/۵ میلی‌گرم در لیتر کینتین به‌عنوان محرک رشد همراه با 2,4-D مشاهده گردید.

واژه‌های کلیدی: کاج تهران، کشت بافت، کینتین و 2,4-D

مقدمه

کشت بافت‌ها و اندام‌های گونه‌های گیاهی طی سه تا چهار دهه اخیر مورد بررسی های وسیعی قرار گرفته و بیشتر این مطالعات توانایی کال زایی گیاهان مختلف، امکان ریز ازدیادی آنها، تهیه بذر مصنوعی، بیوسنتز داروهای گیاهی و کشف مسیرهای بیو سنتزی ترکیبات طبیعی را در محیط‌های کشت آزمایشگاهی مشخص نموده است (بندورپ و همکاران، ۱۹۷٦؛ بندورپ و اکاندایو، ۱۹۷٦؛ بندورپ و نیار، ۱۹۸٤؛ عطری و فوکه، ۱۹۹۳).

ریز ازدیادی درختان بالغ از اهمیت خاصی برخوردار

* -مسئول مکاتبه: hamsad33402@yahoo.com

www.SID.ir

Archive of SID

است، چرا که امکان تکثیر ژنوتیپ‌های برتر موجود در باغ‌ها و مزارع را فراهم می‌آورد. به نظر می‌رسد که گونه‌های مختلف جنس کاج نظیر سایر مخروطیان به سختی به ازدیاد رویشی پاسخ می‌دهند و این مشکل به‌طور کلی بر سر راه کاربرد تکنولوژی کشت بافت در گونه‌های چوبی وجود دارد (اندرسون؛ ایوینش، ۲۰۰۲).

پژوهشگرانی که در تلاش برای کشت سلول‌ها و بافت‌های این گونه از گیاهان هستند مشاهده نموده‌اند که حفظ کشت‌های کالوس کاج در یک زمان طولانی و برروی محیط‌های کشت مصنوعی کاری بسیار دشوار است. اولین محققین لاونبرگ و اسکوگ (۱۹۵۲) بودند که کشت موفقیت آمیز کاج بنکسیانا[1] برروی محیطی که حاوی عصاره اتوکلاو نشده مالت بود را گزارش کردند (براون و لارنس، ۱۹٦۸). بارنز و نایلور (۱۹۵۸) توانستند کالوس ریشه چند گونه از کاج‌های جنوبی را روی محیط پایه هلر[2] که در آنIAA ، تیروزین و تعدادی از ویتامین‌های ب بکار رفته بود رشد دهند (براون و لارنس، ۱۹٦۸). کونار (۱۹٦۳) با کشت کالوس کاج ژرار دیانا[3] گام بعدی را برداشت (براون و لارنس، ۱۹٦۸). در فاصله سال‌های ۱۹٦۵ تا ۱۹٦۸ تلاش‌های زیادی توسط براون و لارنس برای رشد کالوس حاصل از قطعات جدا کشت بافت کامبیوم و آوند آبکشی کاج پالوستریس[4] روی محیط‌های مصنوعی مختلف صورت گرفت. این محققین در تلاش‌های بعدی موفق شدند، کالوس گونه‌های دیگری از کاج نظیر کاج تدا[5] و کاج الیوتی را روی محیط MS اصلاح شده رشد دهند (براون و لارنس، ۱۹٦۸). این تحقیقات در دهه ۱۹۸۰ به سمت جنین زایی رویشی[6] از طریق کال‌های جنین‌زا در گونه‌های بازدانه و از جمله کاج‌ها سوق یافت و تا کنون نیز ادامه دارد (گوپتا و دورزان، ۱۹۸۵؛ گوپتا و دورزان، ۱۹۸۷؛ موهان ـ جین و همکاران، ۱۹۸۹؛ پالمن و همکاران، ۲۰۰۳) . در طی یک دوره نسبتاً طولانی یعنی از سال ۱۹٦۳ به بعد تصور بر این بودکه ریشه زایی و اندام زایی در کالوس کاج غیر ممکن و یا حداقل بسیار مشکل است، زیرا گونه‌هایی که به کال زایی به سختی پاسخ می‌دهند، معمولاً در ریشه زایی و اندام‌زایی نیز پاسخ مناسبی از خود نشان نمی‌دهند. از اوایل دهه ۱۹۹۰ تکنولوژی ازدیاد کلون‌های بازدانگان از طریق اندام‌زایی در کالوس‌ها به شدت مورد توجه قرار گرفت و خیلی سریع توسعه یافت. گرچه اندام‌زایی در کالوس کاج در همه گونه‌ها یکسان پیش نرفت ولی در برخی از گونه‌ها نظیر کاج ویرجینیا[7] به نتایج خوبی منجر شد (چانگ و همکاران، ۱۹۹۱). در سال‌های اخیر نیز در برخی از گزارش‌ها از کشت هم زمان[8] کالوس بعضی از گونه‌های کاج نظیر کاج تدا، کاج رادیاتا[9] همراه با اگروباکتریوم[10] سخن به میان آمده است. در این گزارش‌ها اشاره شده است که حضور اگروباکتریوم در محیط کشت کالوس کاج به القای ریشه‌زایی و اندام‌زایی در کالوس کاج کمک می‌کند (مینگ شان و لیونگ، ۲۰۰۳).

در این مقاله شرایط هورمونی لازم برای کال زایی قطعات جدا کشت ساقه کاج تهران مورد بررسی قرار گرفت. شاید که گام مفیدی در جهت ریز ازدیادی این گونه با ارزش که بخش اعظم پوشش‌های جنگل مصنوعی و فضای سبز کشورمان را تشکیل می‌دهد باشد.

مواد و روش‌ها

مرحله اول: آماده‌سازی و بررسی پتانسیل کال زایی در قطعات جدا کشت: قطعات جدا کشت از ۱۰-۱ سانتی‌متری انتهای شاخه‌های فرعی درختان ۵ تا ٦ ساله کاج تهران که با همکاری سازمان پارک‌ها و فضای سبز شهرداری تهران در اختیار پژوهشگران مقاله حاضر قرار گرفت تهیه شد.

1-*Pinus banksiana* Lamb.
2-Heller Basal Medium
3-*Pinus gerardiana* Wall.
4-*Pinus palustris* Mill.
5-*Pinus taeda* L
6-Somatic Embryogenesis
7-*Pinus virginiana* Mill.
8-Co-Cultivation
9-*Pinus radiata* D. Don.
10-Agrobacterium

www.SID.ir

Archive of SID

نمونه‌ها از ۵۰ پایه متفاوت که در گلدان‌های بزرگ حاوی ۱۵-۱۰ کیلوگرم خاک معمولی و در شرایط نور و دمای طبیعی در محوطه باز گلخانه دانشگاه تهران نگهداری می‌شدند به‌دست آمد. این قطعات در شرایط مناسبی به آزمایشگاه منتقل گردیده و در آب معمولی و دمای ٤ درجه سانتی‌گراد تا قبل از تهیه محیط کشت نگهداری شدند. پس از تهیه محیط کشت، قطعات مذکور به ابعاد ۳×۱۵ میلی متر و به‌طور تصادفی (بدون توجه به پایه مادری) برای کشت به کار رفتند. این قطعات پس از ایجاد یک برش طولی به دو نیم گردید و مطابق مراحل زیر ضدعفونی شد:

۱- قرار دان قطعات در اتانول ۷۰ درصد به مدت ۳۰ ثانیه تا یک دقیقه به منظور حذف پوشش رزینی سطحی و سپس شستشو با آب مقطر استریل ۳ تا ٤ مرتبه. ۲- انتقال قطعات به محلول ۵ درصد سدیم هیپوکلریت (وایتکس معمولی) به مدت ۱۵ تا ۲۰ دقیقه و سپس ٤ تا ٦ مرتبه شستشو با آب مقطر استریل. مواد گیاهی که به این ترتیب آماده شد برروی سه محیط کشت مصنوعی که به این منظور تهیه گردیده بودند کاشته شدند. دراین تحقیق ازسه محیط کشت MMS[1] (براون و لارنس، ۱۹٦۸)، محیط کشت پایه WPM[2] با گلیسین به‌عنوان منبع نیتروژن آمین (WPM_1) و با آسپارتیک اسید به‌عنوان منبع نیتروژن آمین (WPM_2) استفاده شد (گوپتا و دورزان، ۱۹۸۵). pH محیط کشت MMS قبل از اتوکلاو کردن و در لحظه افزودن آگار به وسیله سود نرمال و اسید کلریدریک بین ۵/۸-۵/۷ و pH هر دو محیط پایه WPM_1 و WPM_2 در ۵/۲ تنظیم شد.

پس از آماده‌سازی، قطعات در پتری‌های ۲۰×۱۰۰ حاوی ۳۰ میلی‌لیتر محیط کشت و برای هر پتری سه تا چهار قطعه کشت شدند و به اتاق کشت با دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و روشنایی ۱۵۰ تا ٤۵۰ لوکس با نور فلورسنت منتقل گردیده و نگهداری شدند (براون و لارنس، ۱۹٦۸). طرح آزمایش‌ها در تمام مراحل به صورت طرح کاملاً تصادفی بود. در هر تیمار ۸-۵ تکرار مد نظر قرار گرفت.

مرحله دوم: بررسی توانایی کال‌زایی و میزان رشد کالوس کاج تهران در تیمارهای مختلف محیط پایه MMS با توجه به مجموع بررسی‌های کمی و کیفی صورت گرفته در این آزمایش‌ها، محیط کشت پایه MMS به دلیل نتایج بهتری که از نظر کال زایی قطعات ساقه نشان داد به‌عنوان محیط پایه انتخاب و تیمارهای متفاوت آن از نظر توانایی کال‌زایی، میزان رشد کالوس و اندام‌زایی مورد بررسی بیشتر قرار گرفت. ۳۰ تیمار متفاوت محیط کشت به‌صورت مربع تیمار تنظیم گردید (جدول ۱). غلظت تنظیم کننده‌های رشد به گونه‌ای انتخاب شد که هم از شیب متعادلی برخوردار باشد و هم غلظت‌های پیشنهاد شده در منابع قبلی را در بر گیرد. تیمار شماره ۱ در مربع تیمارها به‌عنوان شاهد بدون تنظیم کننده رشد، و در سایر تیمارها ابتدا از دو تنظیم کننده رشد، 2,4-D و کینتین و سپس از NAA و کینتین استفاده گردید. در این مرحله نیز برای هر تیمار ۵ تا ۸ تکرار و در هر تکرار سه تا چهار قطعه جداکشت مورد استفاده قرار گرفت. پس از ٦ هفته، اولین واکشت صورت گرفت و در نهایت پس از ۱۰ هفته درصد کال‌زایی قطعات و میزان رشد کالوس‌ها اندازه‌گیری شد. در آنالیزهای آماری این مرحله برای محاسبه میزان رشد کالوس، سه تکرار شامل ۱۲-۹ قطعه کال‌دار استفاده گردید.

1-Modified MS Basal Medium
2-Wood Plant Medium

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۱- مربع تیمارهای محیط کشت (در هر تیمار پنج تا هشت تکرار و در هر تکرار سه تا چهار قطعه جداکشت منظور گردید).

تیمار	(شاهد) ۱	۲	۳	٤	٥	٦
کینتین ($mg.l^{-1}$)	۰	۰/٥	۲/٥	٥	۷/٥	۱۰
2,4-D ($mg.l^{-1}$)	۰	۰	۰	۰	۰	۰
تیمار	۷	۸	۹	۱۰	۱۱	۱۲
کینتین ($mg.l^{-1}$)	۰	۰/٥	۲/٥	٥	۷/٥	۱۰
2,4-D ($mg.l^{-1}$)	۲/٥	۲/٥	۲/٥	۲/٥	۲/٥	۲/٥
تیمار	۱۳	۱٤	۱٥	۱٦	۱۷	۱۸
کینتین ($mg.l^{-1}$)	۰	۰/٥	۲/٥	٥	۷/٥	۱۰
2,4-D ($mg.l^{-1}$)	٥	٥	٥	٥	٥	٥
تیمار	۱۹	۲۰	۲۱	۲۲	۲۳	۲٤
کینتین ($mg.l^{-1}$)	۰	۰/٥	۲/٥	٥	۷/٥	۱۰
2,4-D ($mg.l^{-1}$)	۷/٥	۷/٥	۷/٥	۷/٥	۷/٥	۷/٥
تیمار	۲٥	۲٦	۲۷	۲۸	۲۹	۳۰
کینتین ($mg.l^{-1}$)	۰	۰/٥	۲/٥	٥	۷/٥	۱۰
2,4-D ($mg.l^{-1}$)	۱۰	۱۰	۱۰	۱۰	۱۰	۱۰

قبل از کشت قطعات جداکشت، وزن ۱۰ قطعه جدا کشت اندازه‌گیری و میانگین آن به‌عنوان وزن قطعه جدا کشت اولیه در نظر گرفته شد. پس از گذشت ۱۰ هفته از کشت قطعات، کال‌های مربوط به هر تیمار همراه با قطعه جدا کشت به‌طور کامل استخراج، و وزن‌تر آنها تعیین گردید. با استفاده از رابطه زیر میزان رشد کالوس محاسبه شد: $G = \frac{m_t - m_0}{m_t \times t}$ (بندورپ و نیار، ۱۹۸٤).

که در آن:

G = میزان رشد کالوس، m_0 = وزن قطعه جدا کشت اولیه، m_t = وزن قطعه جدا کشت در پایان دوره کشت و t = زمان برحسب روز است.

آنالیزهای آماری با استفاده از نرم افزار SAS، با تجزیه واریانس داده‌ها در قالب طرح کاملاً تصادفی به وسیله آزمون فیشر و نیز آزمون چند دامنه‌ای جدید دانکن[1] صورت گرفت.

مرحله سوم: تلاش در جهت اندام‌زایی در کالوس‌های کاج تهران در تلاش به منظور رسیدن به اندام‌زایی در کال‌های حاصل از قطعات جدا کشت ساقه کاج تهران همزمان آزمایش‌های دیگری پس از پایان دوره واکشت اول برروی محیط MMS دارای 2,4-D و کینتین انجام شد. به این ترتیب که به علت فقدان اندام‌زایی، در واکشت‌های دوم و سوم از یک اکسین قوی‌تر یعنی NAA استفاده شد. مربع تیمارها به همان شکلی بود که در جدول یک آمده است و تنها جای 2,4-D با NAA عوض شد. در این مرحله نیز در هر تیمار ۸-٥ تکرار و برای هر تکرار ٤-۳ قطعه جداکشت منظور گردید.

اندازه‌گیری مقدار ماده خشک حاصل از کالوس: برای اندازه‌گیری ماده خشک حاصل از هر سه محیط و مقایسه میزان آب کال‌ها، ۱ گرم کالوس تر از هر سه محیط مذکور به مدت ۷۲ ساعت در کوره و در دمای ٦۸ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت و در پایان مدت مذکور میزان ماده خشک حاصل توزین شد. برای هر یک از محیط‌های سه‌گانه ۳ تکرار منظور گردید.

نتایج و بحث

نتایج حاصل از تجزیه واریانس داده‌های حاصل از بررسی کالزایی در محیط‌های کشت سه‌گانه در قالب

3-Duncan New Multiple Range Test

www.SID.ir

Archive of SID

طرح کاملاً تصادفی در (جدول ۲) آمده است. نتیجه آزمون فیشر (F) در جدول مذکور نشان می‌دهد که در سطح اطمینان کمتر از یک درصد در بین محیط‌های مذکور تفاوت معنی‌دار وجود دارد. از آنجا که نتایج آزمون F یک معیار کلی است و نمی‌تواند نشان دهد که این تفاوت معنی‌دار در بین هر سه محیط وجود دارد یا فقط بعضی از آن‌ها با یکدیگر تفاوت دارند، مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای جدید دانکن در سطح یک درصد نیز انجام شد، که نتیجه این آزمون در جدول ۲ آمده است. همانگونه که جدول مذکور نشان می‌دهد، میانگین کالزایی در محیط پایه MMS با محیط پایه WPM_2 تفاوت معنی‌داری ندارد، اما میانگین کالزایی هر دو محیط با محیط پایه WPM_1 تفاوت معنی‌دار دارد و از آن بالاتر است. مقدار ضریب تغییرات (C.V) نیز نشان می‌دهد که پراکنش داده‌ها در سطح احتمالی مورد نظر منطقی است. در این حالت با توجه به اینکه تنها تفاوت موجود بین دو محیط پایه WPM_1 و WPM_2 جایگزینی آسپارتیک اسید به جای گلیسین در محیط پایه WPM_2 است، نظر براون و لارنس را در این مورد که آسپارتیک اسید منبع نیتروژن مناسب‌تری از گلیسین برای گونه‌های کاج است تأیید می‌کند (براون و لارنس، ۱۹٦۸). علاوه‌بر این مقایسه کیفی کالزایی از طریق مشاهده توده کالوس حاصل از قطعات جدا کشت در محیط‌های سه‌گانه مذکور نشان داد که قطعات جداکشت در محیط پایه MMS کالزایی مناسب‌تری در مقایسه با دو محیط دیگر دارند.

کالوس حاصل از محیط پایه MMS شفاف و بدون سبزینه بود (شکل‌های ۱ و ۲)، در حالی که کالوس حاصل از محیط پایه WPM_2 تا حدودی رنگیزه دار بود (شکل ۳). وجود رنگیزه‌ها به ویژه در مراحل بعدی این پژوهش باعث ایجاد مزاحمت در استخراج ترکیبات رزینی از کالوس بود. همچنین قهوه‌ای شدن کالوس که احتمالاً ناشی از تجمع کینون‌های تولید شده به وسیله فعالیت در سیستم آنزیمی پلی فنل اکسیداز است در محیط پایه WPM_1 بیشتر از محیط پایه MMS بود (شکل ٤). در مطالعات اخیر که توسط لوکانن (۲۰۰۰) انجام شده است قهوه‌ای شدن کالوس کاج به آلودگی توسط مایکوباکتریوم‌ها[1] نسبت داده شده است. این مایکوباکتریوم‌ها که بسیار سریع نیز رشد می‌کنند و مسئول تولید رنگیزه‌های قهوه‌ای موجود در محیط کشت شناخته شده‌اند، اخیراً از محیط کشت کال‌های حاصل از قطعات جدا کشت کاج سیلوستریس نیز جدا شده‌اند (لوکانن و همکاران، ۲۰۰۰a,b).

در محیط کشت پایه MMS کالوس از سفتی بیشتری برخوردار بود و میزان آب آن کمتر از محیط‌های WPM_1 و WPM2 بود.

جدول ۲- تجزیه واریانس داده‌های حاصل از کالزایی قطعات جداکشت در محیط‌های کشت MMS ، WPM_1 و WPM_2.

منابع	درجه آزادی	SS	MS	F value	سطح اطمینانP
محیط کشت	۲	۰/۵۵	۰/۲۷	۱۶/۸۸*	۰/۰۰۰۱
خطای آزمایش	۶۸	۱/۱۱	۰/۰۱		

* بیانگر آن است که بین محیط‌ها در سطح احتمال ۰/۰۰۰۱ تفاوت معنی‌دار وجود دارد. C.V= ٪۱۷/۳۴

جدول ۳ - نتایج حاصل از آزمون چند دامنه‌ای دانکن در مورد مقایسه میانگین کالزایی در محیط‌های کشت.

محیط های کشت	میانگین	گروه بندی دانکن
WPM2	۰/۷۹	A
MMS	۰/۷۸	A
WPM1	۰/۵۸	B

محیط‌هایی که در گروه‌بندی حروف مشترک دارند، تفاوت معنی‌داری در سطح احتمال ۰/۰۱ ندارند.

1- *Mycobacterium*

www.SID.ir

Archive of SID

نتایج حاصل از اندازه‌گیری وزن خشک کالوس در هر سه محیط نشان داد که میزان ماده خشک حاصل از کالوس محیط پایه MMS در حدود ۱/۵ برابر ماده خشک کالوس حاصل از دو محیط WPM_1 و WPM_2 است. در این حالت تفاوت بین محیط MMS با دو محیط دیگر در سطح احتمال یک درصد، معنی‌دار بود اما بین محیط WPM1 و WPM2 تفاوت معنی‌داری وجود نداشت (جدول ٤). این موضوع احتمالاً ناشی از میزان آب بیشتر دو محیط اخیر نسبت به محیط پایه MMS است. در محیط پایه MMS آگار با غلظت ۰/۸ درصد و در دو محیط پایه WPM_1 و WPM_2 غلظت آگار ۰/٤۸ درصد بوده است (براون و لارنس، ۱۹٦۸؛ گوپتا و دورزان، ۱۹۸۷).

در اینجا لازم است اشاره شود که در کشت قطعات ساقه کاج تهران، قطعات به دو صورت افقی و عمودی از محل بریدگی در تماس با محیط کشت قرار گرفتند.

با وجودی که کشت عمودی قطعات نیز در مواردی کال زایی نشان داد اما کشت افقی به مراتب بهتر و موفقیت‌آمیز تر بود. به نظر می‌رسد که در حالت افقی افزایش سطح تماس با محیط کشت باعث افزایش کالزایی شده و در این مورد تفاوت به حدی فاحش و آشکار بود که نیازی به اندازه‌گیری‌های کمی نداشت.

کال‌زایی و رشد کالوس در تیمارهای متفاوت محیط پایه MMS نتایج حاصل از آنالیز واریانس داده‌های حاصل از کالزایی در ۳۰ تیمار متفاوت محیط پایه MMS در قالب طرح کاملاً تصادفی، در جدول ٥ ارائه شده است.

نتیجه آزمون فیشر در جدول مذکور با توجه به مقدار F نشان داد که در بین تیمارها در سطح اطمینان کمتر از یک درصد تفاوت معنی‌دار وجود دارد. مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای جدید دانکن و نیز گروه‌بندی تیمارها در آزمون مذکور در جدول ٦ آمده است. یافته‌های این پژوهش با توجه به نتایج جدول ٦ و مربع تیمارهای محیط کشت (جدول ۱)، نشان داد که وجود هورمون اکسینی 2,4-D برای القای کالزایی ضروری است، و بدون وجود آن علی‌رغم افزایش غلظت کینتین کالزایی صورت نمی‌گیرد (تیمارهای ۱ تا ٦ در جدول ٦).

افزایش غلظت هورمون‌ها تا حد معینی باعث القای بیشتر کالزایی شد به گونه‌ای که می‌توان آن را غلظت بحرانی کالزایی دانست و چنانچه از این حد بالاتر رود باعث کاهش کالزایی می‌شود.

جدول ٤- آزمون چند دامنه‌ای دانکن در مورد داده‌های حاصل از بررسی مقدار وزن خشک کالوس محیط‌های کشت.

محیط های کشت	میانگین	گروه بندی دانکن
MMS	۰/۳۰	A
WPM1	۰/۱۹	B
WPM2	۰/۲۱	B

محیط‌هایی که در گروه بندی حروف مشترک دارند، تفاوت معنی‌داری در سطح احتمال ۰/۰۱ ندارند. ٪۱۲/۲٥ =CV

جدول ٥- تجزیه واریانس داده‌های حاصل ازکالزایی قطعات جداکشت در ۳۰ تیمار متفاوت محیط پایه MMS.

منابع	درجه آزادی	SS	MS	F value	سطح اطمینانP
تیمار	۲۹	۲٥۱۱۲۰/۰۹	۸٦٥۹/۳۱	۳۹/٥۷ *	۰/۰۰۰۱
خطای آزمایش	۱٥۰	۳۲۸۲۸/۱۹	۲۱۸/۸٥		

*بیانگر آن است که بین تیمارها در سطح احتمال ۰/۰۰۰۱ تفاوت معنی‌دار وجود دارد. ٪۲٤/٥۹ =C.V

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ٦- نتایج حاصل از آزمون چند دامنه‌ای دانکن، در مورد میزان القای کال‌زایی در ۳۰ تیمار محیط کشت پایه MMS.

تیمار	(شاهد) ۱	۲	۳	٤	٥	٦
گروه‌بندی دانکن	E	E	E	E	E	E
میانگین کال زایی (٪)	۰	۰	۰	۰	۰	۰
تیمار	۷	۸	۹	۱۰	۱۱	۱۲
گروه‌بندی دانکن	D	DC	DE	DE	DC	DE
میانگین کال‌زایی (٪)	۲۱	۲۲	۱۹	۱۹	۳۷	۱۹
تیمار	۱۳	۱٤	۱۵	۱٦	۱۷	۱۸
گروه‌بندی دانکن	DE	C	C	C	B	B
میانگین کال‌زایی (٪)	۱۹	٤۰	٤۰	٤۰	۸۰	۸۰
تیمار	۱۹	۲۰	۲۱	۲۲	۲۳	۲٤
گروه‌بندی دانکن	A	A	B	A	A	B
میانگین کال‌زایی (٪)	۱۰۰	۱۰۰	۸۰	۱۰۰	۱۰۰	۸۰
تیمار	۲۵	۲٦	۲۷	۲۸	۲۹	۳۰
گروه‌بندی دانکن	B	A	B	A	B	B
میانگین کال‌زایی (٪)	۸۰	۱۰۰	۸۰	۱۰۰	۸۰	٦۰

تیمارهایی که حروف مشترک دارند، در سطح اطمینان کمتر از ۰/۰۱، تفاوت معنی‌داری با یکدیگر ندارند.

افزایش غلظت 2,4-D از ۲/۵ تا ۷/۵ میلی‌گرم در لیتر محیط کشت باعث افزایش میانگین کال‌زایی شده و بیشتر از این حد در القای کال‌زایی تأثیر منفی داشته است (تیمارهای ۲۵، ۲۷، ۲۹، و ۳۰ در جدول ٦). بنابراین غلظت ۷/۵ میلی‌گرم در لیتر هورمون 2,4-D در حضور غلظت‌های ۰/۵ تا ۷/۵ میلی‌گرم در لیتر هورمون کینتین بیش‌ترین تأثیر را در القای کال‌زایی داشته است (تیمارهای ۱۹ تا ۲۳ در جدول ٦).

یک موضوع قابل توجه، با دقت در نتایج جدول ٦ کاهش ٤۰ درصدی میانگین کال‌زایی در تیمار شماره ۳۰ است که در آن بیشینه غلظت‌های هورمونی به کار رفته است. این مسئله با توجه به نقش بر هم کنش‌های هورمونی در سطوح متفاوت، می‌تواند در مطالعات آینده مورد توجه بیشتر قرار گیرد. ضمن اینکه یک تحلیل رگرسیونی همراه با استخراج ضرایب همبستگی بین افزایش یا کاهش غلظت‌های هورمونی، و افزایش یا کاهش میزان کال‌زایی ممکن است به تفسیر مناسب‌تری منجر گردد. علی‌رغم تغییر نسبت بین تنظیم کننده‌های رشد، در هیچ یک از تیمارها اندام‌زایی مشاهده نشد.

اولین واکشت در پایان هفته ششم صورت گرفت. در این حال در مورد تیمارهای ۱ تا ٦ خط مشی متفاوتی اتخاذ گردید. به این ترتیب که بعضی از تکرارهای متعلق به تیمارهای ۱ تا ٦ واکشت گردیدند و بعضی از تکرارها دست نخورده باقی گذاشته شدند تا چنانچه و قوع رویداد خاصی به زمان بیشتری احتیاج داشته باشد فرصت ظهور پیدا کند. تیمارهای اخیر مدت ۱۲ هفته به همین حال باقی ماندند اما هیچ اتفاق خاصی از نظر کال‌زایی به وقوع نپیوست.

جدول ۷ و ۸ به‌ترتیب آنالیز واریانس و مقایسه میانگین داده‌های به‌دست آمده از اندازه‌گیری میزان رشد کالوس را در مورد سایر تیمارها (تیمارهای ۳۰-۷) نشان می‌دهد. همان گونه که نتیجه آزمون فیشر (F) در جدول ۷ نشان می‌دهد، در سطح اطمینان کمتر از یک درصد تفاوت معنی‌داری در بین تیمارها وجود دارد.

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۷- تجزیه واریانس داده‌های حاصل از میزان رشد کالوس در ۲٤ تیمار متفاوت محیط پایه MMS با 2,4-D و کینتین.

منابع	درجه آزادی	SS	MS	F value	سطح اطمینانP
تیمار	۲۳	۰/۰۰۵۳	۰/۰۰۰۲۳	٤/۳۰ *	۰/۰۰۰۱
خطای آزمایش	۲٦٤	۰/۰۱٤۱	۰/۰۰۰۰۵۵		

* بیانگر آن است که بین تیمارها در سطح احتمال ۰/۰۰۰۱ تفاوت معنی‌دار وجود دارد. C.V= ٪٦/۲۸

جدول ۸- نتایج حاصل از آزمون چند دامنه‌ای دانکن، در مورد میزان رشد کالوس در ۲٤ تیمار محیط کشت پایه MMS .

تیمار	۷	۸	۹	۱۰	۱۱	۱۲
گروه‌بندی دانکن	ABC	ABCD	ABCD	EF	A	F
میانگین رشد کالوس	۰/۱۱۸	۰/۱۱٦	۰/۱۱٦	۰/۱۰۹	۰/۱۲۲	۰/۱۰٤
تیمار	۱۳	۱٤	۱۵	۱٦	۱۷	۱۸
گروه‌بندی دانکن	ABC	AB	ABCD	DEF	ABCDE	A
میانگین رشد کالوس	۰/۱۱۷	۰/۱۲۱	۰/۱۱٦	۰/۱۱۰	۰/۱۱۵	۰/۱۲۲
تیمار	۱۹	۲۰	۲۱	۲۲	۲۳	۲٤
گروه‌بندی دانکن	ABC	AB	A	BCDE	ABCD	AB
میانگین رشد کالوس	۰/۱۱۸	۰/۱۲۱	۰/۱۲۲	۰/۱۱٤	۰/۱۱٦	۰/۱۲۰
تیمار	۲۵	۲٦	۲۷	۲۸	۲۹	۳۰
گروه‌بندی دانکن	ABC	ABC	ABCD	DCE	ABC	ABC
میانگین رشد کالوس	۰/۱۱۸	۰/۱۱۸	۰/۱۱٦	۰/۱۱۲	۰/۱۱۸	۰/۱۱۸

تیمارهایی که حروف مشترک دارند، در سطح اطمینان کمتر از ۰/۰۱ ، تفاوت معنی‌داری با یکدیگر ندارند.

با مقایسه جدول ٦ با جدول ۸ و توجه به گروه‌بندی آزمون دانکن، چنین به نظر می‌رسد که بر خلاف القای کال‌زایی، برای رشد بهتر کالوس در مرحله واکشت، غلظت های هورمونی کمتر، مطلوب تر هستند و تیمارهای ۷ تا ۱۲ که در شش هفته اول کال‌زایی ناچیزی داشتند، پس از اولین واکشت، میزان رشد کالوس در آنها تقریباً مشابه با تیمارهای ۲۵ تا ۳۰ است که در شش هفته اول بیش از ۸۰ درصد کال‌زایی نشان داده‌اند (شکل ۵). این موضوع احتمالاً ناشی از آن است که توده کال ایجاد شده در محیط کشت، با ترشح هورمون‌های درون‌زا، نیازهای رشدی سلول‌ها به حضور مقادیر اضافی هورمون‌های برون‌زا را برطرف می‌نماید. طبیعی است که در چنین شرایطی غلظت‌های اضافی هورمون‌های برون‌زا ممکن است در رشد سلول‌های کال مزاحمت ایجاد نماید.

یک نکته قابل توجه دیگر، در تیمار شماره ۱۱ محیط پایه MMS به چشم خورد، و آن اینکه علی‌رغم شرایط یکسان حاکم بر آزمایش، در بعضی از تکرارها قهوه‌ای شدن کالوس مشاهده گردید (شکل ٦). این موضوع نشان داد که، احتمالاً ادعای لوکانن (۲۰۰۰) در مورد قهوه‌ای شدن ناشی از آلودگی مایکوباکتریوم، صحت بیش‌تری از قهوه‌ای شدن حاشیه کالوس به دلیل تجمع کینون‌های حاصل از فعالیت سیستم آنزیمی پلی فنل اکسیداز، که توسط محققین دیگری نظیر بندورپ مطرح شده است، دارد (بندورپ و نیار، ۱۹۸٤؛ لوکانن و همکاران، a,b ۲۰۰۰). ضمن اینکه چنین می‌توان تصور کرد که آلودگی به مایکوباکتریوم باعث القای فعالیت بیشتر در سیستم آنزیمی پلی فنل اکسیداز و تجمع کینون‌های حاصل از فعالیت این سیستم شده است.

www.SID.ir

Archive of SID

سیستم آنزیمی مذکور جزء مجموعه مکانیسم‌های دفاعی سلول‌های گیاهی است که به هنگام بروز تنش‌هایی نظیر حمله آفات یا آلودگی‌های میکربی فعال می‌شود (لوینسان و همکاران، ۱۹۹۱).

واکشت قطعات کالزا برروی محیط پایه MMS با NAA و کینتین جدول ۹ نتایج حاصل از تجزیه واریانس داده‌های مربوط به میزان رشد کالوس را در تیمارهای متفاوت محیط پایه MMS با NAA و کینتین به‌عنوان محرک رشد، نشان می‌دهد. در این حالت نیز مقدار F نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار در سطح اطمینان کمتر از ۰/۰۱ در بین تیمارها است.

در جدول ۱۰ نیز آزمون مقایسه میانگین رشد کالوس با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای جدید دانکن، همراه با گروه‌بندی مربوط به آن ارائه شده است. با توجه به نتایج جدول اخیر به نظر می‌رسد که بالاترین میزان رشد کالوس در غلظت ۲/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA همراه با غلظت‌های ۵ تا ۱۰ میلی‌گرم در لیتر کینتین حاصل شده است (تیمارهای ۱۰، ۱۱ و ۱۲ در جدول ۱۰).

علاوه‌بر این افزایش غلظت NAA به سطوح بالاتر از ۵ میلی‌گرم در لیتر، بر رشد کالوس کاج تهران تأثیر منفی داشته است (تیمارهای ۲۴-۱۹ و ۳۰-۲۵ در جدول ۱۰) در حالی که در همین مقادیر 2,4-D بر رشد کالوس اثر مثبت داشته است.

جدول ۹- تجزیه واریانس داده‌های حاصل از میزان رشد کالوس در ۲۴ تیمار متفاوت محیط پایه MMS با NAA و کینتین پس از چهارده هفته.

منابع	درجه آزادی	SS	MS	F value	سطح اطمینانP
تیمار	۲۳	۰/۰۸۲	۰/۰۰۳۶	۲۹/۷۵ *	۰/۰۰۰۱
خطای آزمایش	۱۹۲	۰/۰۲۳	۰/۰۰۰۱۲		

* بیانگر آن است که بین تیمارها در سطح احتمال ۰/۰۰۰۱ تفاوت معنی‌دار وجود دارد. C.V= ٪۱۲/۵

جدول ۱۰- نتایج حاصل از آزمون چند دامنه‌ای دانکن، در مورد میزان رشد کالوس در ۲۴ تیمار محیط کشت پایه MMS با NAA و کینتین به‌عنوان محرک رشد پس از چهارده هفته.

تیمار	۷	۸	۹	۱۰	۱۱	۱۲
گروه بندی دانکن	HI	BCD	EFG	ABC	ABC	A
میانگین رشد کالوس	۰/۰۷۳	۰/۱۰۴	۰/۰۹۰	۰/۱۱۰	۰/۱۰۸	۰/۱۱۹
تیمار	۱۳	۱۴	۱۵	۱۶	۱۷	۱۸
گروه بندی دانکن	EFG	I	FG	BC	AB	FG
میانگین رشد کالوس	۰/۰۸۹	۰/۰۶۷	۰/۰۸۸	۰/۱۰۶	۰/۱۱۴	۰/۰۸۶
تیمار	۱۹	۲۰	۲۱	۲۲	۲۳	۲۴
گروه بندی دانکن	HI	DEF	I	ABC	I	CDE
میانگین رشد کالوس	۰/۰۷۰	۰/۰۹۳	۰/۰۶۴	۰/۱۱۰	۰/۰۶۵	۰/۱۰۰
تیمار	۲۵	۲۶	۲۷	۲۸	۲۹	۳۰
گروه بندی دانکن	GH	I	GH	J	CD	HI
میانگین رشد کالوس	۰/۰۸۱	۰/۰۶۲	۰/۰۸۰	۰/۰۴۳	۰/۱۰۲	۰/۰۷۳

تیمارهایی که حروف مشترک دارند، در سطح اطمینان کمتر از ۰/۰۱ ، تفاوت معنی‌داری با یکدیگر ندارند.

www.SID.ir

Archive of SID

در هیچ یک از تیمارهای اخیر نیز علی‌رغم به کار بردن NAA اندام‌زایی مشاهده نگردید. در مجموع یافته‌های پژوهش حاضر با توجه به کیفیت کالوس در واکشت‌های بعدی، و عدم نیاز سلول‌های کالوس به منبع هورمون خارجی، نشان داد که گونه کاج تهران برای کشت سلول نمونه‌ای بسیار مناسب است. علی‌رغم همه تلاش‌ها به نظر می‌رسد که اندام‌زایی قطعات جداکشت کاج تهران با امکانات موجود در زمینه کشت بافت به نتیجه مناسبی منجر نخواهد شد و باید به دنبال راه کارهای تازه‌ای بود. محققین در طی دو تا سه سال اخیر در زمینه کشت بافت در گونه‌های کاج، با ابداع روش‌های نوین از جمله کشت همراه با هم کالوس کاج و اگروباکتریوم گام‌های تازه‌ای در جهت رسیدن به ریشه‌زایی و اندام‌زایی برداشته‌اند (مینگ شان و لیونگ، ۲۰۰۳). امید است با فراهم شدن امکانات لازم در کشورمان، از قبیل سوش‌های خالص اگروباکتریوم، انجام چنین آزمایش‌هایی میسر گردد.

تشکر و قدر دانی

در اینجا لازم است از جناب آقای دکتر زمانی‌زاده، مدیریت محترم مجتمع آزمایشگاهی واحد دانشگاهی علوم و تحقیقات تهران، به خاطر حمایت بی شائبه ایشان از پژوهش، سرکار خانم صانقی کارشناس محترم آزمایشگاه زیست‌شناسی گیاهی در مجتمع مذکور و جناب آقای فلاح عکاس دلسوز مرکز بین المللی تحقیقات بیوشیمی ـ بیو فیزیک IBB تشکر و قدردانی نمائیم.

منابع

1.Andersone, U., and Ievinsh, G. 2002. Changes of morphogenic competence in mature *Pinus sylvestris* L. buds *in vitro* . Annals of Botany, 90:293-298
2.Attree, S.M., and Fowke, L.C. 1993. Embryogeny of gymnosperms: advances in synthetic seed technology of conifers. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 35: 1-35
3.Banthorpe, D.V., Bucknall, G.A., Doonan, H.J., Doonan, S., and Rowan, M.G. 1976 . Biosynthesis of geraniol and nerol in cell- free extracts of *Tanacetum vulgare* . Phytochemistry, 15:109-112
4.Banthorpe, D.V., and Ekundayo, O. 1976. Biosynthesis of (+)-CAR-3-ENE in *Pinus* species. Phytochemistry, 15:109-112
5.Banthorpe, D.V., and Njar, V.C.O. 1984. Light dependent monoterpene synthesis in *Pinus radiata* cultures. Phytochemistry, 23(2):295-299
6.Brown, C.L., and Lawrence, R.H. 1968. Culture of pine callus on a defined medium. Forest Science, 14(1):62-64
7.Chang, S., Sen, S., McKinley, C.R., Aimers-Holliday, J., and Newton, R.J. 1991. Clonal propagation of Virginia Pine (*Pinus virginiana* Mill.) by organogenesis. Plant Cell Reports, 10:131-134
8.Gupta, P.K., and Durzan, D.J. 1985. Shoot multiplication from mature trees of Douglas fir (*Pseudotsuga menziesii*) and sugar pine (*Pinus lambertiana*) . Plant Cell Reports, 4:177-179
9.Gupta, P.K., and Durzan, D.J. 1987. Biotechnology of somatic polyembryogenesis and plantlet regeneration in loblolly pine. Biotechnology, 5: 147-151
10.Laukkanen, H., Soini, H., Kontunen-Soppela, S., Hohtola, A., and Viljanen, M. 2000a. A mycobacterium isolated from tissue cultures of mature *Pinus sylvestris* interferes with growth of Scots pine seedlings. Tree Physiology, 20:915-920
11.Laukkanen, H., Rautiainen, L., Taulavuori, E., and Hohtola, A. 2000b. Changes in cellular structures and enzymatic activities during browning of Scots pine callus derived from mature buds. Tree Physiology, 20:467-475
12.Lewinsohn, E., Gijzen, M., Savage, T.J., and Croteau, R. 1991. Defense mechanisms of conifers. Plant Physiol. 96: 38-43
13.Mingshan, L., and Leung, D.W.M. 2003. Root induction in radiata pine using Agrobacterium rhizogenes. Electronic J. Biotechnology, 6(3):254-270
14.Mohan-Jain, S., Dong, N., and Newton, R.J. 1989. Somatic embryogenesis in Slash pine (*Pinus elliottii*) from immature embryos cultured in vitro. Plant Science, 65:233-241
15.Pullman, G.S., Montello, P., Cairney, J., Xu, N., and Feng, X. 2003. Loblolly pine (*Pinus taeda* L.) somatic embryogenesis: maturation improvemenets by metal analysis of zygotic and somatic embryos. Plant Science 164: 955-969.

www.SID.ir

Archive of SID

J. Agric. Sci. Natur. Resour., Vol. 13(4), Oct -Nov 2006
www.magiran.com/jasnr

The effect of plant growth regulators on callus production patential and growth in the stem explants of Tehran pine (*Pinus eldarica* M.)

H. Sadeghi[1], R.A. Khavari-Nejad[2], H. Fahimi[3] and F. Fallahian[1]
[1]Dept. of Plant Biology, Azad Univ. of Science and Research Branch, [2]Dept. of Biology Univ. of Tarbeyat-e-Moalem, [3]Dept. of Biology, Faculty of Science, University of Tehran, Tehran

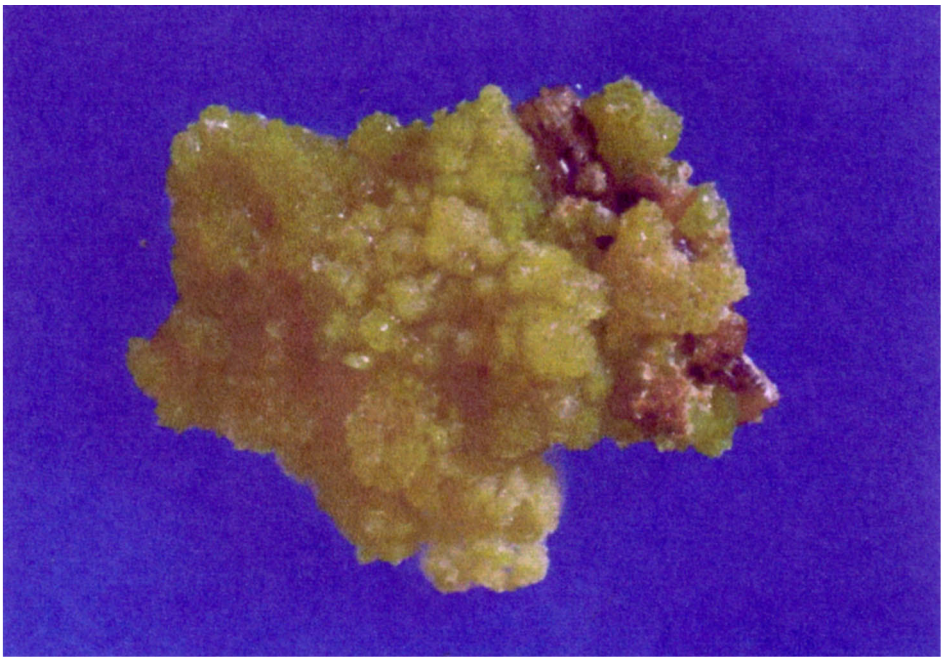
Abstract

Callus production potential and callus growth rate in the stem explants of five to 6-year-old Tehran pine (*Pinus eldarica* M.) was investigated in three different culture media MMS, WPM_1 and WPM_2. The results, accompanied with analysis of variance in completely randomized design, showed a significant difference between three above mentioned culture media, regarding the production potential of the callus in the confidence level of %0.01 Moreover, the comparison of the means of the data by the use of the new Duncan multiple range test in the 0.01 level indicated no significant difference between MMS and WPM_2 culture media but a significant difference between both media and WPM_1. From the quality point of view, it appeared more appropriate callus in MMS culture medium in comparison to WPM_2. In addition to, the essential hormone conditions for callus production and growth in different treatments of MMS basal medium was studied precisely and the results, analyzed with the above mentioned statistical analysis, indicated that 2,4-D is an essential component for stimulation of callus production and is more effective than NAA for callus production. The increase in this hormone concentration up to 7.5 mg lit^{-1} caused increase in callus production but the growth rate of the callus in subsequent subcultures was higher in lower concentrations of this hormone. Furthermore, appropriate callus production and optimum growth rate was observed in concentrations of 0.5-7.5 $mg.lit^{-1}$ kinetin as a stimulator of growth with 2,4-D.

Keywords: *Pinus eldarica* M.; Tissue culture; Kinetin; 2,4-D

www.SID.ir

Archive of SID

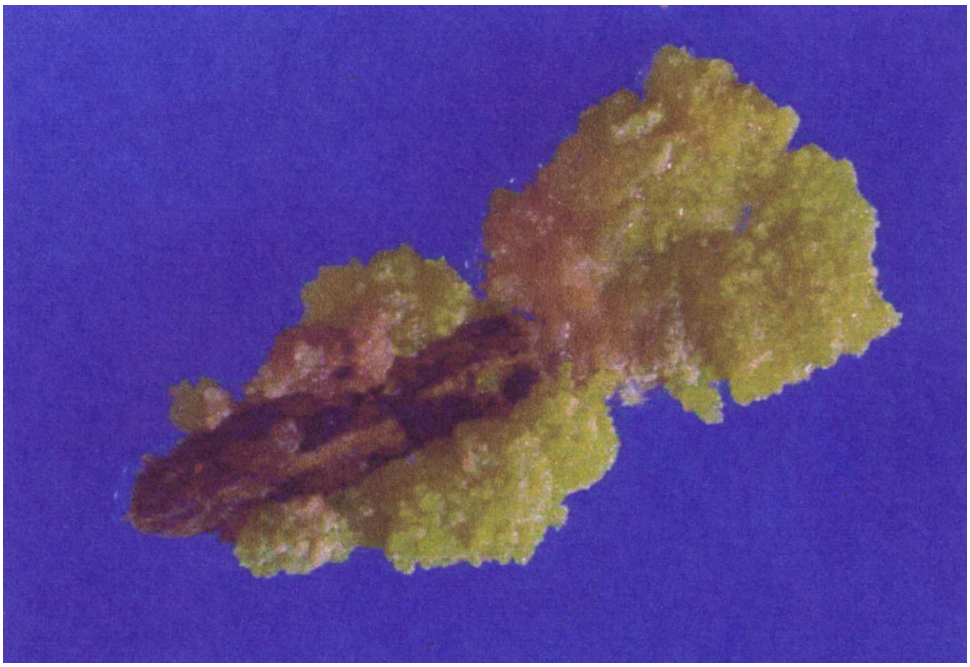


شکل ۱- کال‌زایی برروی محیط پایه **MMS** همراه با قطعه جدا کشت.

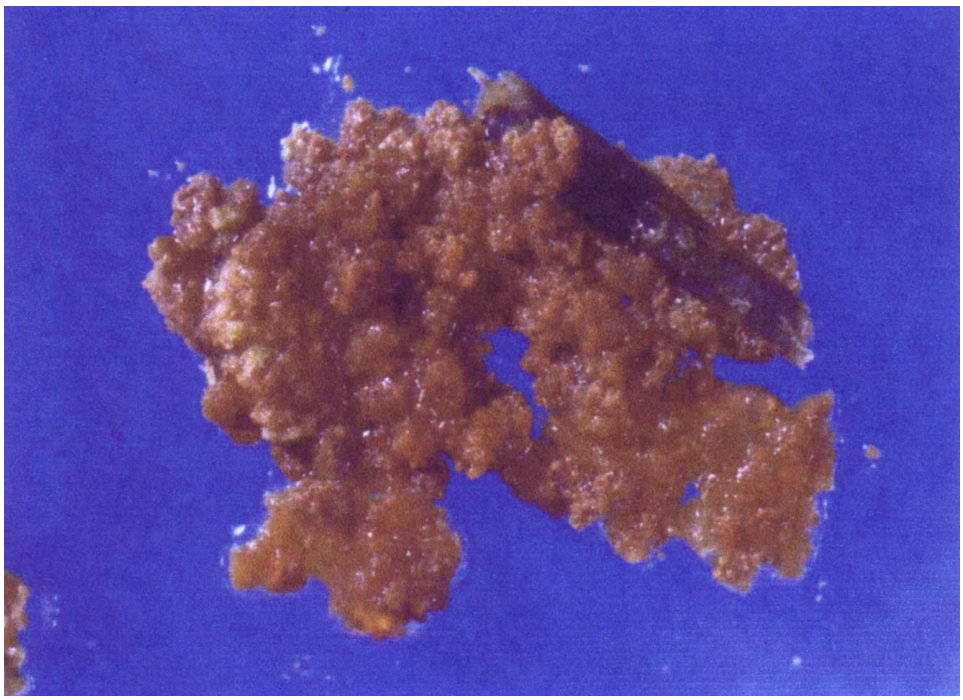
شکل ۲- تکثیر کالوس با حذف قطعه جداکشت اولیه به هنگام واکشت روی محیط **MMS**.

www.SID.ir

Archive of SID



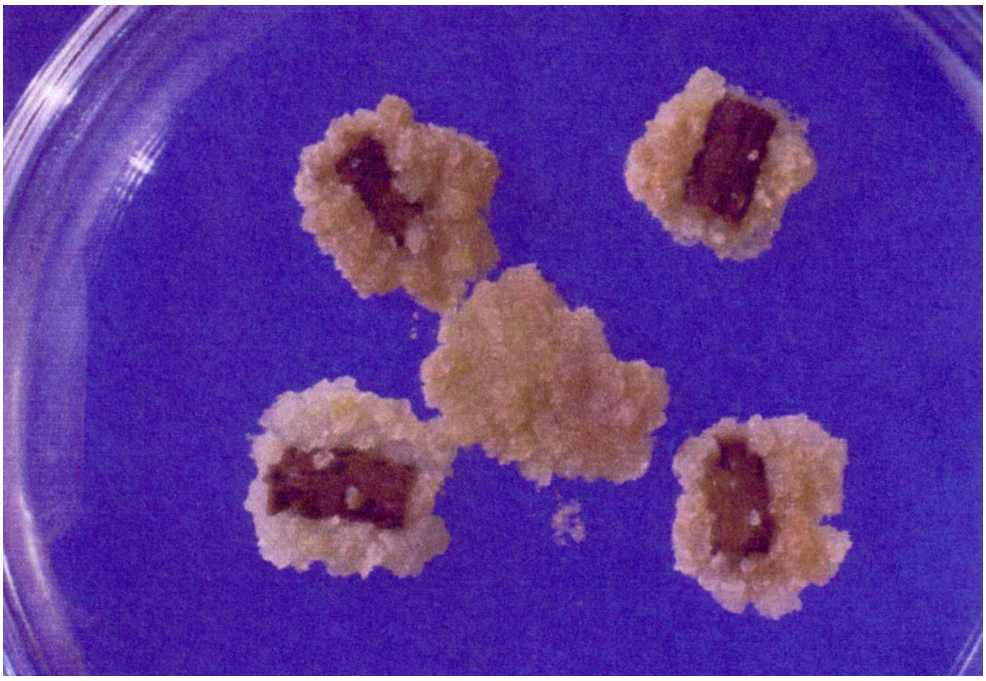
شکل ۳- کال‌زایی برروی محیط پایه WPM_2 با آسپارتیک اسید به‌عنوان منبع نیتروژن آمینی، تراکم رنگیزه‌ها در کالوس رشد یافته در محیط مذکور، مشهود است.



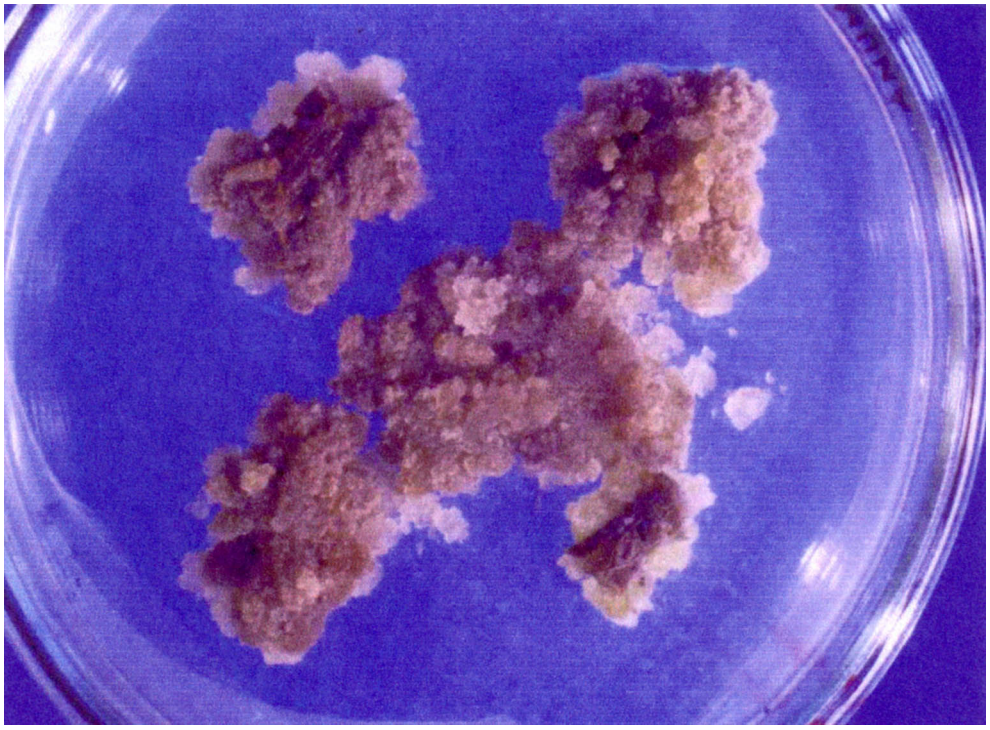
شکل٤- قهوه‌ای شدن کالوس رشد یافته برروی محیط پایه WPM_1.

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۵- کالزایی در تیمار شماره ۷ محیط پایه **MMS** با **2,4,-D** و کینتین.



شکل ٦- کالوس قهوه‌ای رنگ در تیمار شماره ۱۱ محیط پایه **MMS** با **2,4-D** و کینتین.

www.SID.ir