مجله علوم کشاورزی و منابع طبیعی
جلد چهاردهم، شماره سوم، مرداد ـ شهریور ۱۳۸۶
www.sid.ir
www.magiran.com/jasnr

بررسی تأثیرتنظیم کننده‌های رشد گیاهی و شیرنارگیل بر تولید و رشد کالوس نارون چینی (*Ulmus parvifolia* Jacq.)

***مریم ممقانی قاضیجهانی[۱]، کامبیز مشایخی[۲] و کامران رهنما[۳]**

[۱]دانشجوی کارشناسی‌ارشد گروه گیاهپزشکی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان؛ [۲]استادیار گروه باغبانی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، [۳]دانشیار گروه گیاهپزشکی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

تاریخ دریافت: ۸۵/۹/۷ ؛ تاریخ پذیرش: ۸٦/٤/۲۷

چکیده

یکی از روش‌های مهم جهت تولید انبوه کالوس، استفاده از تکنیک کشت بافت گیاهی می‌باشد. هدف از اجرای این تحقیق تولید کالوس از گونه مقاوم نارون چینی (*Ulmus parvifolia* Jacq.) با کاربرد شیر نارگیل بود. در این بررسی، سر شاخه‌ها و شاخه‌های دارای جوانه‌ی درختان سالم، پس از ضدعفونی سطحی ریز نمونه‌ها، برروی محیط کشت جامد موراشیگ و اسکوگ (MS) و گامبورگ (B5) کشت داده شدند. اثر ترکیبات مختلف و شیر نارگیل در این دو محیط برروی رشد کال‌ها مورد مقایسه قرار گرفت. آزمایش به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با ١٤ تیمار در ۳ تکرار در شرایط آزمایشگاه انجام شد. فاکتورها شامل ۲ محیط پایه MS و B5 که حاوی ترکیبات مختلف شیر نارگیل، شیر نارگیل با ۲ و ٤- دی کلروفنوکسی استیک اسید (۲،٤-D)، بنزیل آمینوپورین (BAP)، کینتین (Kin)، (۲،٤-D)، نفتالین استیک اسید (NAA) و از محیط MS و B5 بدون هورون به‌عنوان شاهد استفاده شده است. نتایج نشان داد که کاربرد شیرنارگیل در محیط کشت جامد موراشیگ و اسکوگ به‌طور معنی‌داری باعث افزایش وزن کالوس (۲/۳۷ گرم) پس از ۳۵ روز نگهداری گردید در حالی که بین تیمارهای مختلف در محیط کشت گامبورگ تفاوت معنی‌داری در سطح ۵ درصد دیده نشد. افزایش وزن کالوس در محیط کشت موراشیگ و اسکوگ واجد شیرنارگیل در مقایسه با سایر تیمارهای بدون شیرنارگیل بیش از ۳۱/۷ درصد بود. خصوصیات ظاهری کالوس در محیط واجد شیرنارگیل شامل، بافت سلولی زردرنگ، سخت و به هم پیوسته بود. در تیمارهایی که هورمون ۲،٤-D به تنهایی اضافه گردید، کاهش وزن چشمگیری در کال‌ها مشاهده شد. این بررسی، اولین پژوهشی است که برروی این گونه در ایران و آسیا انجام شده است.

واژه‌های کلیدی: کشت بافت، شیر نارگیل، کالوس، نارون چینی

*- مسئول مکاتبه: ghazi_m2004@yahoo.com

Archive of SID
www.SID.ir

مقدمه

نارون گیاهی از خانواده الماسه[1] که در ایران شامل سه جنس مهم می‌باشد. دو جنس آن زلکوا[2] و الموس[3] بوده که در ایران، به‌ترتیب درخت آزاد و نارون نام داشته که از گونه‌های درختی مهم در شمال کشور است. درختان ملچ، اوجا و آزاد در مناطق جنگلی استان‌های مازندران، گلستان، گیلان، آذربایجان غربی و شرقی پراکنده می‌باشد (خاتم ساز، ۱۹۹۰). در دنیا بیش از ۳۰ گونه نارون وجود دارد که تقریباً همه آن‌ها در نیمکره‌ی شمالی انتشار دارند (برزیر، ۲۰۰۱). در کشور چین حدود ۲۵ گونه تاکنون شناسایی شده است. از بیماری‌های مهم و مخرب درختان جنگل، بیماری قارچی مرگ هلندی نارون[4] بوده که از عوامل محدودکننده درختان نارون در نواحی فضای سبز و جنگل‌های شمال ایران است (قائمی، ۱۹۹۵؛ رهنما و همکاران، ۲۰۰۰ و رهنما و همکاران، ۲۰۰۰). معمولاً نارون‌های اروپایی و آمریکایی به بیماری مرگ هلندی نارون بسیار حساس هستند (اسمالی و اورینز، ۱۹۹۳). این بیماری روی درختان آزاد موجود در استان گلستان نیز، شناسایی شده است (رهنما، ۲۰۰۰). مقاوم‌ترین نارون به بیماری مرگ هلندی، نارون چینی[5] می‌باشد (یارایی، ۱۹۹۵). وجود برگ‌های کوچک و ارتفاع کوتاه این درختان در مقایسه با نارون‌های بومی جنگل، اختلاف بارز آن‌ها را از سایر گونه‌ها متمایز می‌نماید (خاتم ساز، ۱۹۹۰).

کشت بافت گیاهی، ابزاری مهم در مطالعات پایه و کاربردی تولید نهال و گیاهان زراعی است و در سطح تجاری اهمیت زیادی دارد (باقری و آزادی، ۲۰۰۲). با کاربرد ریزازدیادی[6] می‌توان عوامل بیماری‌زا را، از پایه‌های حاصل از کشت بافت سلولی نارون و سایر گیاهان حذف نمود (آروین، ۲۰۰۲؛ دورین و همکاران، ۱۹۹٤). کالوس توده سلولی پارانشیمی بی شکل و تمایز نیافته‌ای است، با دیواره سلولی نازک که منشاء آن سلول‌های تقسیم شونده‌ی بافت گیاهی مادر می‌باشد. مهم‌ترین ویژگی کالوس این است که این توده‌ی سلولی واجد استعداد لازم برای اندام‌زایی، جنین‌زایی و تولید گیاه کامل است. بافت برخی از کال‌های رشد کرده به شدت چوبی شده و سخت می‌شوند، در حالی که بافت برخی دیگر از کال‌ها نرم بوده و به سهولت از هم پاشیده می‌شوند. کال‌های شکننده که بافت آن‌ها به سهولت قابل قطعه قطعه شدن است را کشت‌های نرم می‌نامند. رنگ کالوس ممکن است مایل به زرد، سفید یا سبز باشد (نوری قنبلانی، ۱۹۹۲). میزان رشد کال‌های گیاهان چوبی چند ساله در ریزکشتی معمولاً کندتر از گیاهان علفی می‌باشد. سطح تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی نظیراکسین، جیبرلین و سیتوکینین فاکتور مهمی است که تشکیل کالوس در محیط کشت را تحت تأثیر قرار می‌دهد (باقری و آزادی، ۲۰۰۲).

دهه ۱۹٦۰ دوره تحول و بهبود روش‌های قبلی و ابداع تکنیک‌های جدید کشت بافت بود که تأثیر استفاده از شیرنارگیل و سایر فراورده‌های آندوسپرمی در محیط کشت غالباً ضروری و قابل توجه به نظر می‌رسید. همچنین محصولات طبیعی نظیر کازیین هیدرولیز شده و عصاره مخمر نیز متداول بود (آروین، ۲۰۰۲). در تحقیقات اولیه‌ای که توسط رینرت و استوارد در سال ۱۹۵۸ برروی کشت بافت انجام گردیده است، شیر نارگیل به‌علت تأثیر بسیار خوبی که برروی رشد نمونه‌ها دارد به‌عنوان یکی از ترکیبات اصلی و مهم محیط کشت به شمار می‌رفت (مشایخی، ۲۰۰۷). فراورده‌های آندوسپرمی بخصوص شیرنارگیل دارای فعالیت‌های سیتوکینینی هستند. این محصولات طبیعی دارای منبع نیتروژنی احیا شده و طیفی از ترکیبات پیچیده شیمیایی هستند که قادر به تحریک رشد و اندام‌زایی می‌باشند (آروین، ۲۰۰۲). اخیرا تجزیه شیر نارگیل نشان داده است که الیگوساکاریدهای متفاوتی در آن وجود دارد که بعضی از

1- Ulmaceae
2- *Zelkova*
3- *Ulmus*
4- Dutch elm disease
5- Ulmus parrifolia jacq.
6- Micropropagation

Archive of SID

www.SID.ir

آن‌ها دارای فعالیت‌های تنظیم‌کننده رشدی می‌باشند (وایت و همکاران، ۱۹۸۹). نکته‌ای که در رابطه با استفاده از شیر نارگیل قابل توجه است، این است که براساس منشاء تهیه شیر، مدت زمانی که از برداشت آن گذشته و طول مدت نگهداری، ویژگی‌های آن به تدریج تغییر می‌کند (آروین، ۲۰۰۲). کاربرد شیر نارگیل هنوز در اواخر دهه ۱۹۸۰ در محیط کشت بافت برخی گونه‌ها نظیر بامبو[1] (نادگودا و همکاران، ۱۹۹۰)، نخل[2] (والورد و همکاران، ۱۹۸۷)، نارنج[3] و بالنگ[4] (باقری و همکاران، ۲۰۰٤) مشاهده شده است، اما در مورد محیط‌های به‌کار رفته در کشت بافت نارون تنها در گونه نارون آمریکایی[5] استفاده شده (پیجوت و همکاران، ۱۹۹۰)، ولی در سایر گونه ها مطالعه نشده است (دیز و گیل، ۲۰۰٤). همچنین در رابطه با جداسازی پروتوپلاست از گونه نارون چینی[6]، جهت به دست آوردن گیاه از این گونه متحمل به بیماری، تحقیقات متعددی انجام شده، ضمن آنکه در این گونه نیز از شیرنارگیل استفاده نشده است (لینگ، ۱۹۸۱). در بررسی دیگری در رابطه با کشت پروتوپلاست گیاه مو یا انگور[7] افزودن عصاره نارگیل باعث بهبود در توانایی زنده ماندن پروتوپلاست‌ها گردید (تئودروپلوس و همکاران، ۱۹۹۰). استفاده از روش کشت بافت سلولی در مقایسه با روش‌های سنتی تولید نهال که زمان بر، محدود و مشکوک به انتقال عوامل بیماری‌زا است، می‌تواند راه نوینی جهت تکثیر این درختان با ارزش باشد. ضمن این که در کشت بافت سلولی می‌توان سلول‌ها و یا کالوس مقاوم به عامل بیماری را سریع‌تر در سطح آزمایشگاه شناسایی و تکثیر نمود (اسمالی و همکاران، ۱۹۹۳). همچنین تولید و تکثیر گونه نارون انگلیسی[8] به وسیله ریز ازدیادی توسط فینینگ و همکاران (۱۹۹۳)، انجام شده است. با توجه به این که از ورود نارون چینی به ایران و توسعه و تکثیر نهال آن در فضای سبز کشور حدود بیست سال می‌گذرد و در این مدت بررسی چندانی در زمینه کشت بافت صورت نگرفته است، در پژوهش حاضر پتانسیل تکثیر این گونه از طریق کشت بافت با تغییر سطوح تنظیم‌کننده‌های رشد، در جهت بهینه‌سازی رشد و تولید زیاد کالوس مورد توجه قرار گرفت.

1- *Bambusa arundinacea*
2- *Bactris gasipaes*
3- *Citrus aurrantium*
4- *Citrus medica*
5- *Ulmus americana*
6- *Ulmus parvifolia* Jacq.
7- *Vitis vinifera*
8- *Ulmus procera*

مواد و روش‌ها

این پژوهش در سال ۱۳۸٤ در دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، آزمایشگاه کشت بافت گروه باغبانی انجام گرفت. نمونه‌های گیاهی از نهال‌های فضای سبز دانشکده علوم زراعی جمع‌آوری شد. پایه‌هایی که از آن‌ها قطعات جداکشت استخراج شدند، سه ساله بوده و در خاک، تحت شرایط نور و دمای طبیعی، رشد کرده بودند و در قالب طرح کاملاً تصادفی جهت نمونه‌برداری مورد استفاده قرار گرفتند. جهت کشت اولیه از محیط موراشیگ و اسکوگ (MS) با ساکارز ۳ درصد و آگار ۸ درصد (موراشیگ و اسکوگ، ۱۹٦۲)، به‌همراه هورمون D-۲، ٤ با غلظت ٤ سی‌سی از محلول پایه ۰/۵ پی‌پی‌ام استفاده شد. محیط‌های کشت در ظرف‌های شیشه‌ای در بسته ریخته شد و پس از تنظیم pH روی ۵/۷-۵/٦ و اضافه کردن آگار به‌مدت ۲۰ دقیقه در ۱۲۱ درجه و فشار ۱/۵ اتمسفراتوکلاو شدند. وسایل لازم جهت انتقال ریزنمونه به محیط کشت شامل پنس، اسکالپل و غیره در آون و در دمای ۲۰۰ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۳ ساعت سترون گردید. ریز نمونه‌های گرفته شده از نهال‌های نارون چینی شامل شاخه به‌همراه جوانه‌های جانبی بود که داخل هر ظرف شیشه‌ای حاوی محیط MS یک قطعه ۱ سانتی‌متری از شاخه به همراه یک تک گره قرار داده شد.

مراحل سترون کردن نمونه‌ها:

۱- زدودن آلودگی‌های سطحی با مسواک و مایع ظرفشویی

Archive of SID

www.SID.ir

۲- قرار دادن نمونه‌ها در اتانول ۹۶ درصد به مدت ۱۰ ثانیه

۳- شستشو با آب مقطر

٤- قرار دادن در الکل ۷۰ در صد به مدت ۱ دقیقه، سپس شستشو با آب مقطر استریل

۵- ضدعفونی کردن نمونه‌ها با سدیم هیپوکلریت ۱/۵ درصد (وایتکس معمولی) به مدت ۱۵ دقیقه و سپس شستشو با آب مقطر استریل ۳-٤ مرتبه (انجام مراحل ٤ و ۵ زیر هود لامینار فلو).

سپس، نمونه‌های سترون شده در مجاورت شعله به محیط کشت انتقال داده شدند. ظروف کشت شده تحت شرایط سترون در دمای ۲± ۲۵ درجه سانتی‌گراد و طول روز ۱٦ ساعت روشنایی با شدت ۲۰۰۰ لوکس در اتاقک کشت قرار داده شد. پس از گذشت ٤ هفته و دستیابی به کالوس اولیه، به‌منظور ازدیاد آن‌ها در محیط‌های مختلف هورمونی با غلظت‌های متفاوت در دو محیط کشت پایه B5 (گامبورگ و همکاران، ۱۹٦۸)، MS (موراشیگ و اسکوگ، ۱۹٦۲) واکشت شدند. مشخصات تیمارها و تعداد تکرار آن‌ها در جدول یک قید شده است. کال‌های تولید شده هر تیمار بعد از ۵ هفته تحت شرایط استریل، با ترازوی دیجیتال با دقت ۰/۰۰۱ گرم وزن شدند. آزمایش‌ها به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی انجام گرفت و داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SAS مورد تجزیه تحلیل آماری قرار گرفت. مقایسه میانگین اثر تیمارهای مختلف به روش دانکن، جهت معرفی بهترین تیمار در افزایش وزن کالوس انجام شد.

نتایج و بحث

نشان داد بین ترکیبات مختلف، محیط‌ها و اثرات متقابل آن‌ها با یکدیگر از نظر وزن کال‌ها در سطح احتمال پنج درصد اختلاف معنی‌داری وجود داشت. نوع محیط و تنظیم‌کننده‌های رشد روی وزن کال‌ها تأثیر معنی‌داری داشتند. تأثیر محیط کشت موراشیگ و اسکوگ با تیمارهای مختلف به‌کار رفته روی رشد کال‌ها در سطح ۵ درصد معنی‌دار بود، در حالی که این تأثیر در تیمارهای مختلف محیط کشت گامبورگ تفاوت معنی‌داری را نشان نداد (جدول ۲). با توجه به ترکیب نمک‌های غیرآلی در محیط MS که از نظر مقدار نیترات، پتاسیم و آمونیوم در مقایسه با محیط گامبورگ در سطح بالاتری است (باقری و آزادی، ۲۰۰۲؛ معینی و کهریزی، ۲۰۰۳)، می‌توان چنین نتیجه گرفت که احتمالاً سطوح بالای این املاح در افزایش وزن کال‌ها تأثیر معنی‌داری گذاشته است، ولی محیط کشت B5 به دلیل فقدان این نمک‌ها محیط مناسبی برای رشد و استقرار کال‌های حاصل از نارون چینی و یا به‌طورکلی برای رشد گیاهان چوبی نمی‌باشد. مقایسه میانگین بین تیمارها به روش دانکن، در محیط کشت MS نشان داد که تیمار A (شیرنارگیل ۲۰ درصد) از نظر وزن تر کالوس، افزایش معنی‌داری نسبت به تیمارهای B، C، D، E، F و G و تیمارهای D، E، F و G نیز، نسبت به تیمارهای B و C افزایش معنی‌داری در سطح ۵ درصد دارد و بالاترین وزن کالوس مربوط به تیمار A و پایین‌ترین وزن مربوط به تیمار B بود (جدول ۲). نتایج حاصل از تجزیه داده‌ها در محیط کشت B5 نشان داد که اختلاف معنی‌داری بین تیمارهای مختلف در سطح ۵ درصد وجود ندارد (جدول ۲).

جدول ۱- نوع و غلظت تیمارهای بکار رفته و تعداد تکرار آن‌ها در آزمایش.

تیمار	غلظت	تکرار
A: شیرنارگیل ۲۰ درصد	۲۰ درصد	۳
B: شیرنارگیل به همراه توفوردی (D-٤، ۲)	٤ سی‌سی از محلول پایه ۰/۵پی پی‌ام با شیر نارگیل ۲۰ درصد	۳
C: توفوردی (D-٤، ۲)	۳ سی‌سی از محلول پایه ۰/۵پی پی‌ام	۳
D: بنزیل آمینوپورین (BA)	۰/۱ پی پی‌ام	۳
E: نفتالین استیک اسید (NAA)	٤ سی‌سی از محلول پایه ۰/۵پی‌پی‌ام	۳
F: کینتین (KIN)	۰/۵ پی پی‌ام	۳
G: شاهد	فقط محیط کشت	۳

Archive of SID

www.SID.ir

جدول ۲- تأثیر ترکیبات مختلف هورمونی و شیر نارگیل در دو محیط MS و B5 بر وزن کال‌ها (پس از ۳۵ روز نگهداری در درجه حـرارت ۲± ۲۵ درجه سانتی‌گراد، با ۳ تکرار).

تیمارها	MS (گرم)	B5 (گرم)
A: شیرنارگیل ۲۰ درصد	۲/۳۷[a]	۰/ ۵۷[a]
B: شیرنارگیل به همراه توفوردی (D-۲،٤)	۰/۱٦[c]	۰/۰۷[a]
C: توفوردی (D-۲،٤)	۰/۱۹[c]	۰/۷۹[a]
D: بنزیل آمینوپورین (BA)	۰/۹۵[b]	۰/۹۲[a]
E: نفتالین استیک اسید (NAA)	۱/۳۳[b]	۰/۵۳[a]
F: کینتین (KIN)	۱/۰۹[b]	۰/٦۰[a]
G: شاهد	۱/۸[b]	۰/٤۸[a]
LSD (۵ درصد)	۰/۵۸	۱/۲۷

میانگین‌هایی که دارای حروف مشترک نیستند، در سطح ۵ درصد تفاوت معنی‌دار دارند.
MS: محیط موراشیگ و اسکوگ. B5: محیط غذایی گامبورگ

وزن کال‌ها، در محیط پایه MS با حضور شیرنارگیل نسبت به شاهد (محیط MS فاقد هورمون) ۳۱/۷ درصد افزایش معنی‌داری یافت (جدول ۲). همچنین نسبت به تیمار حاوی شیرنارگیل با ۲ و ٤- دی کاهش چشمگیری یافت. در تیمارهایی که به آن‌ها تنظیم‌کننده رشد ۲ و ٤- دی افزوده شد، کاهش معنی‌داری در سطح اطمینان ۵ درصد، در وزن کال‌ها مشاهده شد. علی‌رغم افزایش معنی‌دار وزن کال‌ها که در تیمارهای حاوی شیرنارگیل مشاهده گردید، حضور تنظیم‌کننده رشد ۲ و ٤- دی اثر شیرنارگیل را کم نموده است، اثر کمی و کیفی تنظیم‌کننده‌های اکسینی مختلف در محیط کشت بافت یکسان نیست. اکسین‌هایی همانند ۲ و ٤- دی محرکی قوی برای ایجاد و رشد کالوس هستند (آروین، ۲۰۰۲)، ولی احتمالاً حضور تنظیم‌کننده رشد ۲ و ٤- دی با شیر نارگیل یک اثر بازدارنده یا به‌عبارتی کاهنده در رشد کال‌ها دارد. به‌طوری که وزن کال‌ها در تیمارهایی که شیرنارگیل و تنظیم کننده رشد ۲ و ٤- دی به‌صورت توام بودند، در مقایسه با تیماری که در آن ۲ و ٤- دی به تنهایی به‌کار رفته بود کاهش یافت، اما این کاهش از لحاظ آماری معنی‌دار نبود. وزن کال‌ها در محیط پایه MS در تیمارهای حاوی بنزیل آمینوپورین، نفتالین استیک اسید و کینتین و شاهد تفاوت معنی‌داری در سطح اطمینان ۵ درصد با یکدیگر نشان ندادند (جدول ۲). همچنین رنگ کالوس حاصل و شکل ظاهری آن‌ها از لحاظ نرمی و سختی، خشکی و آبدار بودن متفاوت بود (جدول‌های ۳ و ٤). در آن دسته از کال‌ها که زرد و کمی آبکی بودند، توده سلولی به راحتی از هم جدا نمی‌گردید و دسته دیگر از کال‌ها ظاهری تیره داشتند. قهوه‌ای شدن بافت‌ها اتوکاتالیزور است، تراوش‌های سمی فنلی موجب جراحت شده و در نتیجه باعث افزایش تراوش می‌شود که منجر به قهوه‌ای شدن بافت می‌گردد (باقری و همکاران، ۲۰۰٤). در کشت‌های کالوس کاج *Pinus sylvestris* شروع قهوه‌ای شدن با افزایش سنتز پروتیین و نشاسته و کاهش تولید همراه بوده است. پس از آن که قهوه‌ای شدن شدیدتر گردید، سنتز پروتیین کاهش یافته و تخریب بافت شروع می‌شود (لیندفورس و همکاران، ۱۹۹۰). از طرفی قهوه‌ای شدن بافت‌های گیاهان چوبی در محیط کشت به تجمع کینون‌های حاصل از فعالیت سیستم آنزیمی پلی‌فنل‌اکسیداز نسبت داده شده است، این موضوع همچنین می‌تواند ناشی از آلودگی مایکوباکتریایی نیز باشد (صادقی و همکاران، ۲۰۰٦). متداول‌ترین روش برای ممانعت از قهوه‌ای شدن، واکشت مکرراست (باقری و همکاران، ۲۰۰٤). با انتقال کشت‌ها در فواصل زمانی قسمت‌های مرده بافت‌ها را می‌توان قبل از آن که حیات سلول‌ها را با مواد فنلی سمی خود از بین ببرند، حذف نمود (ماس کارنهاس و همکاران، ۱۹۸۷).

Archive of SID

www.SID.ir

جدول ۳- مقایسه خصوصیات ظاهری کال‌ها در تیمارهای مختلف محیط پایه MS به همراه تنظیم‌کننده‌های رشد مورد استفاده در آزمایش.

	تیمار	رنگ	حالت ظاهری
A	شیرنارگیل ۲۰ درصد	زرد روشن	محکم و سخت و به هم پیوسته
B	شیرنارگیل به همراه توفوردی(D-۴،۲)	تیره رنگ	سست
C	توفوردی(D-۴،۲)	تیره رنگ	سست
D	بنزیل آمینوپورین (BA)	زرد رنگ	نسبتا ترد و شکننده
E	نفتالین استیک اسید (NAA)	کرم مایل به قهوه ای	سست و آبدار
F	کینتین (KIN)	تیره رنگ	سست
G	شاهد*	کرم رنگ	سست

*شاهد: محیط MS بدون تنظیم کننده رشد

*غلظت آگار مورد استفاده درتمام تیمارها، در سطح ۸ درصد می باشد.

جدول ٤- مقایسه خصوصیات ظاهری کال‌ها در تیمارهای مختلف محیط پایه B5 به همراه تنظیم‌کننده‌های رشد مورد استفاده در آزمایش.

	تیمار	رنگ	حالت ظاهری
A	شیرنارگیل ۲۰ درصد	زرد روشن	بسیار ترد و شکننده
B	شیرنارگیل به همراه توفوردی (D-٤،۲)	تیره رنگ	سست
C	توفوردی (D-٤،۲)	تیره رنگ	سست
D	بنزیل آمینوپورین (BA)	کرم رنگ	ترد و شکننده
E	نفتالین استیک اسید (NAA)	قهوه ای کم رنگ	ترد
F	کینتین (KIN)	کرم رنگ	ترد
G	شاهد*	کرم رنگ	ترد

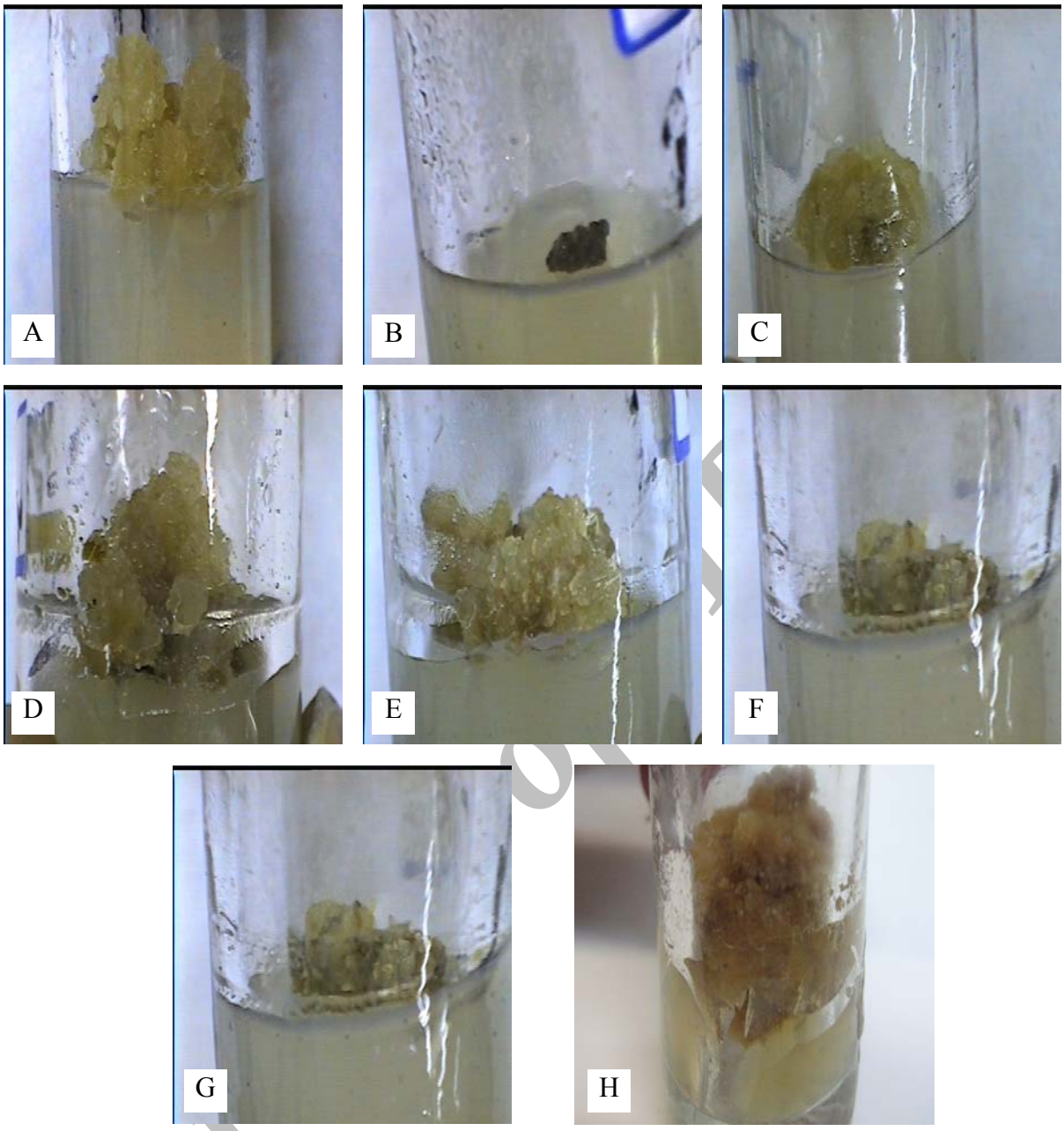
*شاهد: محیط B5 بدون تنظیم کننده رشد

*غلظت آگار مورد استفاده درتمام تیمارها، در سطح ۸ درصد می‌باشد.

در نتیجه‌گیری کلی حاصل از تجزیه و تحلیل داده‌ها چنین استنباط می‌شود که شیر نارگیل در افزایش وزن کال‌ها تأثیر زیادی داشته است و غلظت‌های متفاوت آن می‌تواند پاسخ‌های متفاوتی بدهد که پیشنهاد می‌شود در بررسی‌های آینده به این مورد نیز پرداخته شود. نکته حایز اهمیت در این بررسی نشان داد که علاوه‌بر نقش این ترکیب طبیعی در افزایش وزن کالوس، تأثیر زیاد آن، در به تعویق انداختن دوره پیری کالوس می‌باشد (شکل ۱)، که می‌توان این نتایج را به‌علت خاصیت شبه سیتوکینینی شیرنارگیل دانست، زیرا سیتوکینین‌ها هم در تشکیل کالوس، هم در تسریع سایر فرآیندهای درگیر در تقسیم سلولی نقش دارند (آروین، ۲۰۰۲). بنابراین، دستاوردهای این تحقیق می‌تواند مقدمه و کمکی برای تولید نهال‌های مقاوم و سالم نارون از طریق ریزازدیادی باشد که این امر، ادامه تحقیق در زمینه باززایی گیاه از کال‌ها را می‌طلبد.

Archive of SID

www.SID.ir



شکل ۱- مشخصات ظاهری کالوس‌های حاصل از واکشت نارون چینی در تیمارهای مختلف، پس از ۳۵ روز نگهداری در درجه حرارت ۲±۲۵درجه سانتی‌گراد: **A**: شیر نارگیل بیست در صد، **B** : شیر نارگیل + توفوردی، **C**: توفوردی، **D**: بنزیل آمینو پورین، **E**: نفتالین استیک اسید، **F**: کینتین، **G** : شاهد، **H**: کالوس کشت شده در شیر نارگیل پس از ٦ ماه.

منابع

1.Arvin, M.J. 2002. Tissue culture of wood trees. Shahid Bahonar univ. of Kerman. univ. Press. 279pp. (Translated in Persian Language).
2.Bagheri, A., Ziaratnia, M., and Hossaini, M. 2004. Tissue culture of trees. univ. of Ferdowsii, univ. Press. Mashhad, Iran. 205pp. (Translated in Persian Language).
3.Bagheri, H., and Azadi, P. 2002. Plant tissue culture, techniques and experiments. Mashhad jehad. Daneshgahi Press. 154pp. (Translated in Persian Language).
4.Brasier, C.M. 2001. Rapid evolution of introduced plant pathogens via interspecific hybridization. Bioscience. 51:2.123-133.

www.SID.ir

5.Diez, J., and Gil, L. 2004. Micropropagation of *Ulmus minor* and *U. minor* × *U. pumila* from 4-years old ramets. Invest Agrar: Sist Recur for. 13:1.249-254.
6.Dorion, N., Bigot, C., and Neumann, P. 1994. Evaluation of Dutch elm disease susceptibility and pathogenicity of *Ophiostoma ulmi* using micropropagated elm shoots. Eur. J. Forest Pathology. 24:112-122.
7.Fenning, T.M., Gartland, A., and Brasier, M. 1993. Micropropagation and regeneration of English elm *Ulmus procera* Salisbury. J.Exp. Bot. 44:1211-1217.
8.Ghaemi, R. 1995. Dutch elm disease. J. Environment. 44-50p.
9.Gamburg, O.L., Miler, R.A., and Ojima, K. 1968. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. Exp Cell Res. 50:148-151.
10.Khatamsaz, M. 1990. Flore of Iran. Ulmaceae family, No. 4. Research Institue of forestry and range management, Tehran, Iran. Ministry of Agriculture, Press. 25pp.(In Persian with English Summary).
11.Lange, D.D. 1981. Technique for isolation, purifying, and culturing *Ulmus* protoplast. In: Y.P.S. Bajaj. Ed. Biotechnology in Agriculture and Forestry. Vol 1. Springer- Verlag,Heidelberg Newyork. pp. 326-340.
12.Lindfors, A., Kuusela, H., Hohtola, A., and Kupila-Ahvenniemi, S. 1990. Molecular correlates of tissue browning and deterioration in scots pine calli. Biol Plant. 32:171-180.
13.Mascarenhas, A.F., Kendurkar, S.V., Gupta, P.K., and Agrawal, D.C. 1987. Teak. In: JM Bonga and DJDurzan (eds)Cell and Tissue Culture in Forestry, Vol 3, Case Histories, Gymnosperms, Angiosperms and Palms, Martinus Nijhoff Publishers, Dordrecht. pp 300-315.
14.Mashayekhi, K. 2007. Plant Somatic Embryogenesis. Makhtomgholi Faraghi. Press, 483p.
15.Moini, A., and Kahrizi, D. 2003. Plant tissue culture. Student Basij univ. Press. 163pp. (Translated in Persian Language).
16.Murashige, T., and Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissue culture. Physiol Plant. 15:473-497
17.Nadgauda, R.S., Parasharmi, V.A., and Mascarenhas, A.F. 1990. Precocious flowering and seedling behaviour in tissue-cultured bamboos. Nature. 344:335-336.
18.Nori-Ghanballani, G. 1992. Experiences and background in plant tissue culture. Tabriz univ. Press. 411pp.(Translated in Persian Language).
19.Pijut, P.M., Lineberger, R.D., Domir, S.C., Ichida, J.M., and Krause, C.R. 1990. Ultrastructure of cells of *Ulmus americana* cultured in vitro and exposed to the culture filrtrate of *Ceratocystis ulmi.* Phytopathology. 80:764-767.
20.Rahnama, K., Asadeh, G.H., and Sala shoure, M. 2000. Current status and future of Dutch elm disease in Iran. The first Asian conference of plant pathology in China, Beijing. P.49.
21.Rahnam, K., Asadeh, G.H., and Taheri, A. 2002. Incidence of Dutch elm disease and decline of elm trees in new forestry areas of Golestan povince and prevention of elm species decline. In: Proceeding the second symposium of research project in Golestan province. Gorgan univ. of Agricultural Science and Natural Resources, Press. 52-53 (Abstract in Persian).
22.Rahnama, K. 2003. Incidence of Dutch elm disease in a new area of natural forest and urban trees of Iran. In: Proceedings: The second international Elm conference Spain. Valsain, Segovia. pp.34.
23.Sadeghi, H., Khavari-Nejad, R., Fahimi, H., and Falahian, F. 2006. Effect of growth regulators on calli production and callus growth in various pieces of stem tissue culture of Tehran pine (*Pinus eldarica* M.). J. Agri, Sciences & Nature. Resour. 13:4.128-141.
24.Smalley, E.B., and G.urines, R.P. 1993. Breeding elm for resistance to Dutch elm disease. Annual Rev.Phytopathol. 31:325-359.
25.Theodoropoulos, P.A., Roubelakis-Angelakis, protoplast isolation and K. 1990. Progress in culture from virus-free axenic shoot cultures of *Vitis vinifera* L. Plant Cell Rep. 8:407-410.
26.Valverde, R., Arias, O., and Thorpe, T. 1987. Pichloram- induced somatic embryogenesis in pejibaya palm *(Bactris gasipaes* H.B.K.).Plant Cell Tissue Organ Cult. 21:51-54.
27.White, A.R., Elmore, H.W., Watson, M.B., and Gill, J.P. 1989. Purification and partial characterization of polysaccharides from coconut milk. Ann Bot. 64:205-209.
28.Yarai, R. 1995. Plants of wide leaves resistant to stress condition. Urban landscape Dept, Tehran, Press. 155pp. (In Persian).

Archive of SID

www.SID.ir

J. Agric. Sci. Natur. Resour., Vol. 14(3), July-Aug 2007
www.sid.ir
www.magiran.com/jasnr

The investigation of the effect of various hormonal compounds and coconut milk on the growth and production of Chinese elm callus (*Ulmus parvifolia* Jacq.)

M. Mamghani Ghazi Jahani[1], K. Mashayekhi[2] and K. Rahnama[3]
[1]M.Sc. student Dept. of plant protection, Gorgan Univ., of Agricultural Sci. and Natural Resources, Iran
[2]Assistant Prof. Dept. of Horticulture, Gorgan Univ., of Agricultural Sci. and Natural Resources, Iran [3]Associate Prof., Dept. of Plant protection, Gorgan Univ., of Agricultural Sci. and Natural Resources, Iran

Abstract

One of the main methods for the mass production of callus is the use of the technique of the plant tissue culture. The purpose of this study was the production of Chinese elm callus *Ulmus parvifolia* Jacq. by application of coconut milk. Samples of tip shoots and shoots with buds, after surface disinfection with ethanol and sodium hypochlorite were cultured on the Murashige&Skoog (MS) and Gamburg (B_5) media culture. The effect of different compounds and coconut milk was compared in these two media on growth of calli. The trial was established in the randomized complete block design with 14 treatments and three replications in vitro. Treatments were two basic media culture of MS and B5 which contained coconut milk with 2,4-dicholoro phenoxy acetic acid (2,4-D), Benzylamino purine (BAP), Kinetin (Kin),Naphthalene acetic acid (NAA) and control were without MS and B5 media cultures plant growth regulator. The results showed that coconut application within MS media culture increased significantly weight of calli (2.37g) 35 days after incubation while there was not significant (p=%5) differences between various treatments in B5 media culture. Among of calli, callus were grown on MS containing coconut milk had significantly greater weight (%31.7) than treatments without coconut milk. Morphological characters of callus in agar media culture with coconut milk were produced yellow cell tissue, hard and intensive tissues. In the treatments containing only 2,4-D callus weight decreased significantly. This study is the first report that investigated on this species in Iran and Asia.

***Keywords*:** Tissue culture; Coconut milk; Callus; Chinese elm

Archive of SID

www.SID.ir