Archive of SID

دوماهنامه علمی- پژوهشی تحقیقات گیاهان دارویی و معطر ایران
جلد ۳۳، شماره ۲، صفحه ۲۵۵-۲۴۴ (۱۳۹۶)
شناسه دیجیتال (DOI): 10.22092/ijmapr.2017.106967.1814

بهینه‌سازی باززایی و ریشه‌زایی موسیر بومی ایران (*Allium stipitatum*) در شرایط درون شیشه‌ای

ابوالفضل حاجی‌حیدر[۱]، مسعود توحیدفر[۲]، سید مهدی میری[۳]، امیررضا زارع کاریزی[۴*]، سمیه قادرمزی[۱] و خدیجه سمیعی[۵]

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه باغبانی، واحد کرج، دانشگاه آزاد اسلامی، کرج، ایران

۲- دانشیار، گروه بیوتکنولوژی، دانشکده مهندسی انرژی و فناوریهای نوین، دانشگاه شهید بهشتی، تهران، ایران

۳- استادیار، گروه باغبانی، واحد کرج، دانشگاه آزاد اسلامی، کرج، ایران

۴*- نویسنده مسئول، مربی، گروه بیوتکنولوژی، پژوهشکده گیاهان دارویی جهاد دانشگاهی، کرج، ایران

پست الکترونیک: amirrzare@gmail.com

۵- کارشناس، گروه بیوتکنولوژی، پژوهشکده گیاهان دارویی جهاد دانشگاهی، کرج، ایران

تاریخ دریافت: تیر ۱۳۹۵ تاریخ اصلاح نهایی: مهر ۱۳۹۵ تاریخ پذیرش: آذر ۱۳۹۵

چکیده

در این پژوهش تکثیر درون شیشه‌ای کارآمد موسیر (*Allium stipitatum*)، از طریق طبق پیاز بررسی شد. به‌منظور باززایی، ریزنمونه‌های طبق پیاز در محیط کشت MS همراه با تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی BA (صفر، ۱ و ۲ میلی‌گرم در لیتر) و NAA (صفر، ۰/۵ و ۱ میلی‌گرم در لیتر) کشت شدند. سپس پیازچه‌های باززایی شده برای ریشه‌زایی در محیط کشت MS و ½MS حاوی غلظت‌های مختلف هورمون‌های BA، NAA، IAA و زغال فعال قرار گرفتند. گیاهچه‌های ریشه‌دار شده با موفقیت در شرایط برون شیشه‌ای سازگار شدند. نتایج نشان داد که بیشترین تعداد پیازچه (۱۲/۶۶) در محیط کشت MS حاوی ۲ میلی‌گرم بر لیتر BA به همراه ۱ میلی‌گرم در لیتر NAA بدست آمد. همچنین بیشترین تعداد (۱/۷۷) و طول ریشه (۲/۵۵ سانتی‌متر) پیازچه‌ها در محیط کشت ½MS حاوی ۱ میلی‌گرم در لیتر IAA به همراه ۱ گرم بر لیتر زغال فعال مشاهده شد و ۱۰۰٪ گیاهان کشت شده در بستر کوکوپیت، پرلیت و پیت ماس با نسبت ۱:۲:۱ زنده ماندند. باتوجه به کاربردهای فراوان این گیاه و انقراض آن، تهیه دستورالعمل تکثیر سریع موسیر ضروری به نظر می‌رسد.

واژه‌های کلیدی: موسیر (*Allium stipitatum*)، باززایی، ریشه‌زایی، زغال فعال.

مقدمه

موسیر بومی ایران (*Allium stipitatum*) طبق آخرین رده‌بندی‌ها در خانواده Amaryllidaceae قرار گرفته است (Friesen & Sapir, 2014). ریشه‌یابی تفاوت دو گونه *A. stipitatum* و *A. hirtifolium* Boiss.، تفاوت در ساقه و تخمدان و معنی لاتین آن می‌باشد، که در گونه *A. stipitatum* (*stipitatum*) تخمدان دارای تیغه میانی بوده و پهنک برگ دارای کرک می‌تواند باشد یا نباشد. در صورتی‌که در گونه *A. hirtifolium* Boiss. (*hirtifolium*) برگ‌ها دارای کرک و پرز می‌باشد. موسیر دارای پیاز فشرده کروی شکل با ساقه باریک و بلند به رنگ سبز و اغلب ارغوانی به طول ۱۲۰-۷۰ سانتی‌متر می‌باشد. پراکندگی آن

www.SID.ir

Archive of SID

در فلات ایران گزارش شده‌است و در خاک‌های رسی کوهپایه‌ها، کوهستان‌ها، دامنه جلگه‌ها و در زیر سایه درختان و درختچه‌ها می‌روید (Fritsch & Abbasi, 2013). موسیر در ایران بیشتر در مناطق غرب به‌ویژه کردستان کشت می‌شود. این گونه به‌دلیل برداشت بی‌رویه در طبیعت در حال حاضر گونه در حال انقراض محسوب شده و از این رو اهمیت اقتصادی قابل ملاحظه‌ای دارد (Rahbar *et al*., 2005). در صنایع غذایی و دارویی موسیر کاربرد گسترده‌ای داشته و از فرآورده‌های آن برای کاهش قند خون در افراد دیابتی استفاده می‌شود. Rahbar و همکاران (۲۰۰۵) نشان دادند که عصاره استخراجی از موسیر دارای اثرات ضدباکتریایی، ضدمیکروبی و ضدقارچی می‌باشد.

با توجه به کاربردهای فراوان این گیاه در صنایع غذایی، دارویی و بهداشتی، نیاز به روش‌هایی است که بتوان در زمان کوتاه تکثیر سریع و انبوه آن را انجام داد. ارزش دارویی، تقاضای بازار و سطح فرآوری از مهمترین شاخص‌های سنجش اقتصادی یک گیاه است. از مهمترین گیاهان دارویی صادراتی ایران در سال‌های گذشته موسیر، زیره سبز، آویشن و ... بوده که به‌طور کلی به کشورهای اروپای غربی و اروپای شرقی و آمریکا، هندوستان و کشورهای حوزه خلیج فارس صادر می‌شود (Kashfi Bonab, 2011) که بیانگر این مسئله است که صادرات موسیر در کشور ایران اهمیت قابل ملاحظه‌ای داشته و بهینه‌سازی کشت بافت موسیر که سریع‌ترین راه برای تکثیر این گیاه دارویی در حال انقراض است، می‌تواند راهگشایی برای تجاری‌سازی تکثیر این گیاه با ارزش اقتصادی باشد.

بذرهای موسیر دارای رکود عمیق فیزیولوژیکی و پوسته سخت بذر می‌باشند و باید پس از یک دوره سرما کاشته شوند تا خواب بذر شکسته شود (Ghaemizadeh *et al*., 2011). کشت بافت گیاهی امکان تکثیر و انبوه بسیاری از گیاهان دارویی مهم را فراهم کرده است. گیاهان تکثیر شده از طریق کشت درون شیشه‌ای، عاری از بیماری و از نظر ژنتیکی و کیفی یکنواخت می‌باشند (Omidi & Farzin, 2012). گیاه موسیر تکثیر شده به روش کشت بافت از قدرت رشد بالایی نسبت به گیاه موسیری که به روش‌های سنتی تکثیر می‌شود، برخوردار است. همچنین به‌دلیل یکنواختی گیاه موسیر حاصل از کشت بافت و نیز سازگاری بهتر این گیاه حاصل، عملکرد و میزان بهره‌وری افزایش می‌یابد (Ghahremani Majd *et al*., 2010). تکثیر جنس آلیوم از طریق کشت بافت مورد مطالعه قرار گرفته و از قسمت‌های مختلفی مانند بذر (Wawrosch *et al*., 2001)، مریستم ریشه (Luciani *et al*., 2006؛ Martin Urdiroz *et al*., 2004)، بخش‌های مختلف گل (Luciani *et al*., 2006) و طبق پیاز (Basal disc) (Xu *et al*., 2008؛ Gabriela & Luciani, 2006؛ Ayabe & Sumi, 1998) به‌منظور ریزازدیادی استفاده شده‌است. طبق پیاز در گیاهان پیازی از بخش‌های مناسب برای ریزازدیادی و تولید گیاهان عاری از ویروس محسوب می‌شود. از نظر تئوری، با کشت ریزنمونه‌های طبق پیاز در شرایط کشت درون شیشه‌ای پس از حداکثر ۴ هفته از یک پیاز موسیر به قطر ۴-۳ سانتی‌متر می‌توان حداکثر ۱۵-۱۰ پیازچه تولید کرد که این مقدار تفاوت قابل توجهی با تولید پیازچه در روش ازدیاد سنتی (۳-۲ پیازچه در سال) را نشان می‌دهد (Ghahremani Majd *et al*., 2010).

ریشه‌زایی و سازگاری از مراحل اصلی تکثیر درون شیشه‌ای گیاهان می‌باشند. تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی و زغال فعال در ریشه‌زایی مؤثرند. به‌طور کلی، محیط کشت ریشه‌زایی به سایتوکینین کم و اکسین زیاد نیاز دارد. با در نظر گرفتن سازگاری گیاهچه به محیط طبیعی، چگونگی و کیفیت ریشه‌زایی اهمیت بیشتری پیدا می‌کند (Jafari *et al*., 2015). اگرچه ریشه‌زایی و سازگاری گونه‌های *Allium* به‌طور کلی آسان است، اما موسیر استثناء می‌باشد (Tubić *et al*., 2014). تنظیم‌کننده‌های رشد اکسینی در تقسیم سلولی اثر داشته و برای باززایی و ریشه‌زایی لازم است. سایتوکینی‌ها نیز با تحریک رشد و نمو و تقسیم سلولی موجب باززایی می‌شوند (Ghahremani Majd *et al*., 2010). زغال فعال هم نقش حیاتی در ریزازدیادی، ریشه‌زایی و اندام‌زایی دارد و هم به‌طور طبیعی در رشد گیاه،

www.SID.ir

Archive of SID

تیره شدن محیط، جذب ویتامین‌ها و یون‌های فلزی تأثیر می‌گذارد. اثرات آن به‌دلیل جذب غیرقابل برگشت ترکیب‌های محیط کشت، کاهش متابولیت‌های سمّی، ترشح فنل و انتشار برخی مواد جذب شده مانند مواد مغذی و تنظیم‌کننده‌های رشد می‌باشد (Thomas, 2008). در این پژوهش اثر تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی، نوع محیط کشت و زغال فعال بر باززایی و ریشه‌زایی و نیز سازگاری گیاه موسیر بومی ایران بررسی شده است.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی

گیاهچه درون شیشه‌ای موسیر عاری از ویروس با مشخصات به‌شرح جدول ۱، از بانک گیاهی مرکز ملی ذخایر ژنتیکی و زیستی ایران تهیه و ادامه مراحل آزمایش در گروه بیوتکنولوژی گیاهان دارویی، پژوهشکده گیاهان دارویی جهاد دانشگاهی کرج انجام شد.

جدول ۱- مشخصات گیاه موسیر مورد آزمایش

منطقه جغرافیایی	ارتفاع از سطح دریا (متر)	طول جغرافیایی	عرض جغرافیایی	شماره
زنجان، قیدار	۲۰۵۶	E48˚30́	N36˚09́	IBRCP1007067

باززایی و ریشه‌زایی

طبق پیاز گیاهچه‌های درون شیشه‌ای موسیر عاری از ویروس برای باززایی و تولید پیازچه به قطعات ۰/۵ سانتی‌متری جدا شده و در محیط کشت MS (Murashige & Skoog, 1962) بدون هورمون (شاهد) یا حاوی ۱ میلی‌گرم در لیتر BA همراه با ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA و نیز ۲ میلی‌گرم در لیتر BA همراه با ۱ میلی‌گرم در لیتر NAA قرار گرفتند و پس از یک ماه تعداد پیازچه‌ها یادداشت‌برداری گردید. پیازچه‌های تولید شده برای ریشه‌زایی در دو محیط کشت پایه MS و ½MS حاوی غلظت‌های مختلف تنظیم‌کننده‌های رشد (جدول ۲) کشت شدند. یک ماه پس از کشت صفات تعداد برگ، طول برگ، تعداد ریشه و طول ریشه پیازچه‌ها محاسبه شد. به تمامی محیط‌های کشت ۳۰ گرم در لیتر ساکارز به‌عنوان منبع کربن افزوده شد. پس از تهیه محیط کشت و افزودن هورمون، pH محلول روی ۵/۸ تنظیم و در نهایت آگار به میزان ۷ گرم در لیتر اضافه و با استفاده از اتوکلاو در دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد با فشار ۱/۲ کیلوپاسکال به مدت ۲۰ دقیقه استریل گردید. ریزنمونه‌ها در شیشه‌های کشت با حجم ۴۰۰cc حاوی ۳۰-۲۵ میلی‌لیتر محیط کشت قرار گرفتند. تمام کشت‌ها در اتاقک رشد در شرایط دمایی ۲±۲۵ درجه سانتی‌گراد و طول روز ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی نگهداری شدند.

جدول ۲- ترکیب‌های محیط کشت ریشه‌زایی پیازچه‌های موسیر

ردیف	محیط کشت پایه	تنظیم‌کننده‌های رشد (میلی‌گرم بر لیتر)			زغال فعال (گرم بر لیتر)
		BA	NAA	IAA	
۱	½MS	–	–	۱	–
۲	½MS	–	–	۱	۱
۳	½MS	–	۰/۱	–	–
۴	½MS	–	۰/۱	–	۱
۵	MS	۱	۰/۵	–	–
۶	MS	۲	۱	–	–

www.SID.ir

Archive of SID

مرحله سازگاری

گیاهان ریشه‌دار با آب ولرم شستشو داده شده و در گلدان‌هایی با قطر دهانه ۷ سانتی‌متر که با ترکیبی از کوکوپیت، پرلیت و پیت ماس با نسبت‌های مختلف پر شده بودند، قرار داده شدند (جدول ۳). گلدان‌ها با مقدار کمی آب مقطر مه‌پاش و بعد برای حفظ حداکثر رطوبت، روی گلدان‌ها با سرپوش پلاستیکی پوشانده شده و به اتاقک رشد با دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و شرایط ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی منتقل شدند. برای انجام سازگاری تدریجی و به‌منظور تهویه بهتر هر چند ساعت یک‌بار سرپوش را برداشته و اندکی مه‌پاش انجام شد. پس از دو هفته به‌منظور سازگار شدن گیاهان با محیط بیرون منافذی در سرپوش ایجاد شد تا اینکه سرپوش‌ها به‌طور کامل برداشته و بعد از دو هفته گیاهان به گلخانه با دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و رطوبت نسبی ۵۰٪ انتقال یافتند و درصد زنده‌مانی بعد از یک ماه محاسبه شد.

جدول ۳- بسترهای کشت به‌منظور سازگاری گیاه موسیر

ردیف	نسبت ترکیب‌های بستر کشت		
	کوکوپیت	پرلیت	پیت‌ماس
۱	۱	–	۱
۲	۱	۱	۱
۳	۱	۲	۱
۴	۱	۱	–
۵	–	۱	۱

تجزیه و تحلیل آماری

این آزمایش در قالب طرح پایه کاملاً تصادفی با سه تکرار (هر تکرار سه ریزنمونه) و با استفاده از نرم‌افزار MSTATC مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. مقایسه میانگین‌ها توسط آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ۵٪ انجام و نمودارها توسط نرم‌افزار Excel رسم شدند.

نتایج

ریزنمونه‌های طبق پیاز، برای باززایی در محیط کشت MS حاوی غلظت‌های مختلف هورمون‌های BA و NAA قرار گرفتند. نتایج تجزیه واریانس تعداد پیازچه نشان داد که اثر ترکیب‌های هورمونی بر تعداد پیازچه در سطح احتمال ۵٪ معنی‌دار بود (جدول ۴).

جدول ۴- تجزیه واریانس اثر ترکیب‌های هورمونی بر تعداد پیازچه موسیر

منبع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات
		تعداد پیازچه
تیمار	۲	۱۲۰/۷۷ ❋
خطا	۶	۱۸/۵۵

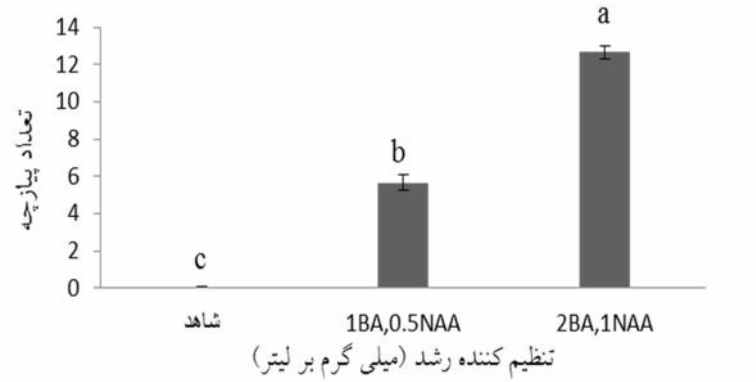
❋: معنی‌دار در سطح احتمال ۵٪

www.SID.ir

Archive of SID

نتایج آزمایش باززایی نشان داد که افزایش غلظت هورمون بنزنیل آدنین و نفتالن استیک اسید تأثیر معنی‌داری بر روی تعداد پیازچه‌ها داشت(شکل ۱) ، به‌طوری که در غلظت ۲ میلی‌گرم در لیتر BA به همراه ۱ میلی‌گرم در لیتر NAA بیشترین تعداد پیازچه (۱۲/۶۶) مشاهده شد (شکل ۶- تصویر سمت راست)، در حالیکه در شاهد هیچگونه باززایی انجام نشد.

نتایج تجزیه واریانس صفات اندازه‌گیری شده نشان داد که اثر ترکیب‌های هورمونی بر صفت تعداد برگ در سطح احتمال ۵٪ و صفات طول برگ، تعداد ریشه و طول ریشه در سطح احتمال ۱٪ معنی‌دار شدند (جدول ۵).



شکل ۱- مقایسه میانگین اثر تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی بر تعداد پیازچه

حروف غیرمشابه نشان‌دهنده اثرات معنی‌دار براساس آزمون دانکن در سطح احتمال ۵٪ می‌باشد.

جدول ۵- تجزیه واریانس اثر ترکیب‌های هورمونی بر صفات اندازه‌گیری شده موسیر

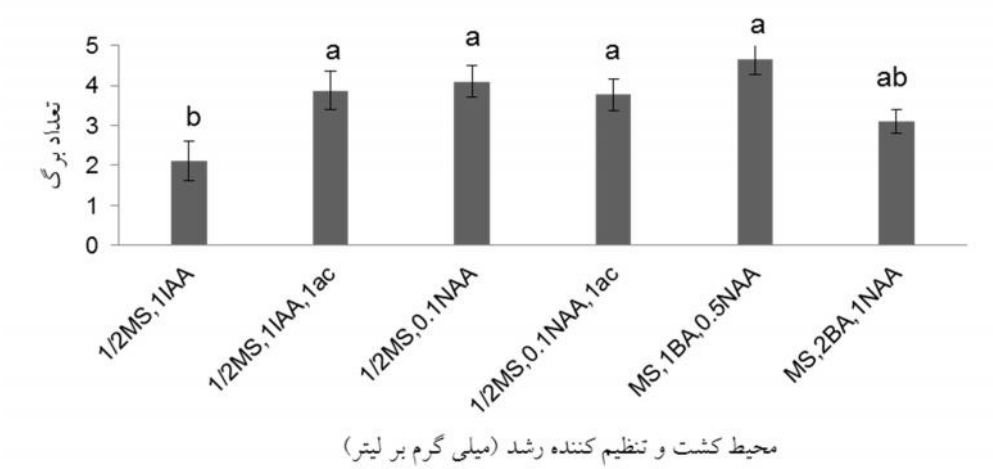
منبع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات			
		تعداد برگ	طول برگ	تعداد ریشه	طول ریشه
ترکیب‌های هورمونی	۵	۲/۳۸ *	۳/۴۲ **	۱/۲۳ **	۲/۷ **
خطا	۱۰	۰/۶۸	۵/۹	۰/۰۷	۰/۱
ضریب تغییرات		۲۲/۸۴	۱۶/۳۷	۱۸/۴۸	۳۱

**: معنی‌دار در سطح احتمال ۱٪، *: معنی‌دار در سطح احتمال ۵٪

نتایج مقایسه میانگین تعداد برگ (شکل ۲) نشان داد در محیط کشت ½MS حاوی ۱ میلی‌گرم در لیتر IAA کمترین تعداد برگ‌ها (۲/۱۱) مشاهده شد و تفاوت معنی‌داری نسبت به سایر تیمارها بجز تیمار ۲ میلی‌گرم در لیتر BA به همراه ۱ میلی‌گرم در لیتر NAA داشت.

www.SID.ir

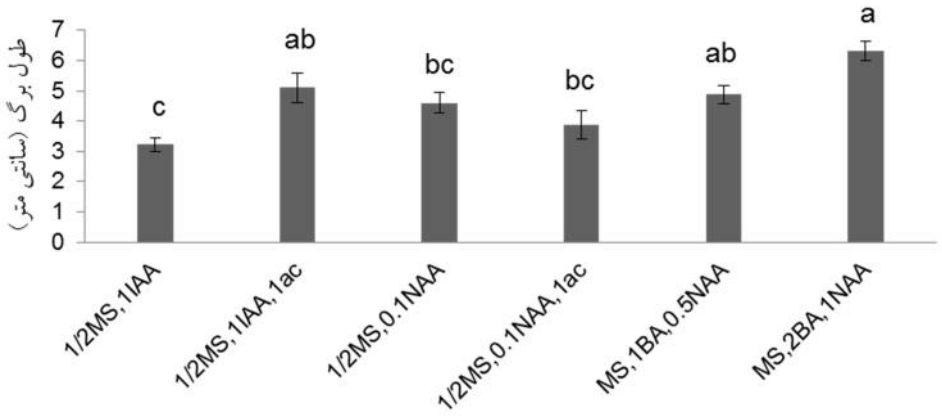
Archive of SID



شکل ۲- مقایسه میانگین اثر محیط کشت حاوی تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی و زغال فعال بر تعداد برگ

حروف غیرمشابه نشان‌دهنده اثرات معنی‌دار براساس آزمون دانکن در سطح احتمال ۵٪ می‌باشد.

AC (زغال فعال): activated charcoal



شکل ۳- مقایسه میانگین اثر محیط کشت حاوی تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی و زغال فعال بر طول برگ

حروف غیرمشابه نشان‌دهنده اثرات معنی‌دار براساس آزمون دانکن در سطح احتمال ۵٪ می‌باشد.

AC (زغال فعال): activated charcoal

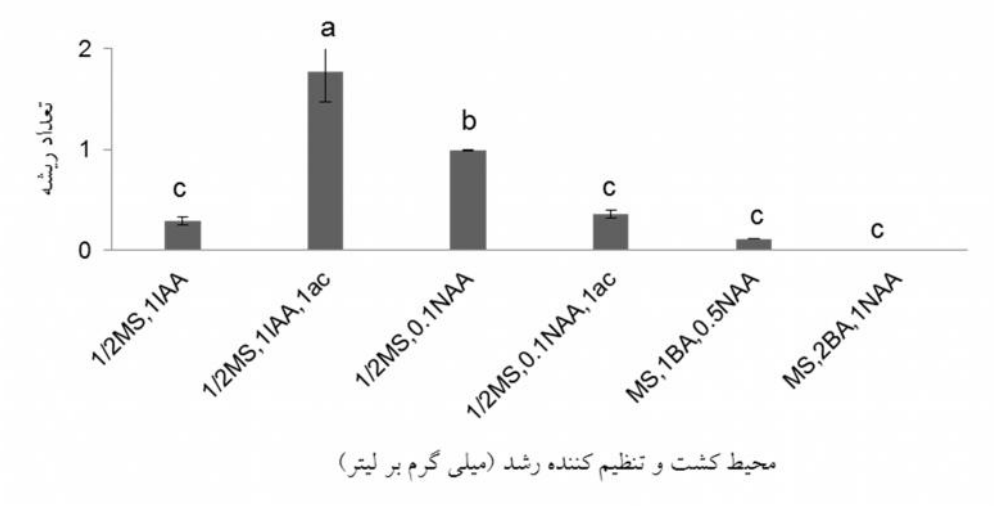
همان‌طور که در شکل ۳ مشاهده می‌شود بیشترین طول برگ‌ها (۶/۳۲ سانتی‌متر) در محیط کشت MS حاوی ۲ میلی‌گرم در لیتر BA به همراه ۱ میلی‌گرم در لیتر NAA و کمترین (۳/۲۲ سانتی‌متر) در محیط کشت ½MS حاوی ۱ میلی‌گرم در لیتر IAA مشاهده شد.

به‌منظور ریشه‌زایی از محیط کشت MS و ½MS همراه با تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی BA، NAA، IAA و زغال فعال استفاده شد. نتایج مقایسه میانگین تعداد ریشه (شکل ۴) نشان داد که بیشترین تعداد ریشه (۱/۷۷) در محیط کشت ½MS حاوی ۱ میلی‌گرم در لیتر IAA به همراه ۱ گرم در لیتر زغال

www.SID.ir

Archive of SID

فعال (شکل۶- تصویر سمت چپ) و کمترین (۰/۱۱) هم در محیط کشت MS همراه با ۱ میلی‌گرم در لیتر BA و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA بدست آمد. در محیط کشت MS حاوی ۲ میلی‌گرم در لیتر BA به همراه ۱ میلی‌گرم در لیتر NAA هیچگونه ریشه‌زایی مشاهده نشد.

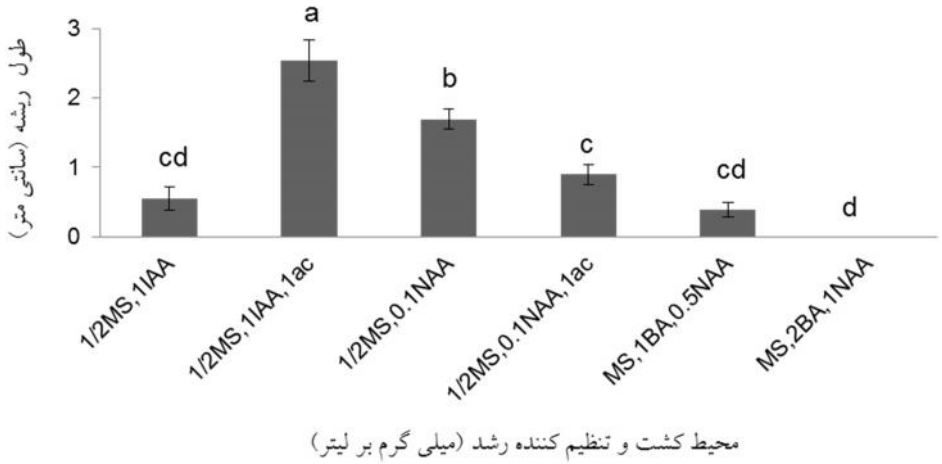


شکل ۴- مقایسه میانگین اثر محیط کشت حاوی تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی و زغال فعال بر تعداد ریشه

حروف غیرمشابه نشان‌دهنده اثرات معنی‌دار براساس آزمون دانکن در سطح احتمال ۵٪ می‌باشد.

AC (زغال فعال): activated charcoal

در محیط کشت MS همراه با ۱ میلی‌گرم در لیتر BA و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA کمترین طول ریشه‌ها (۰/۳۸ سانتی‌متر) مشاهده شد که کاهش معنی‌داری با محیط کشت ½MS حاوی ۱ میلی‌گرم در لیتر IAA همراه با ۱ گرم در لیتر زغال فعال (شکل ۶- تصویر سمت چپ) و محیط کشت ½MS همراه با ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر NAA داشت (شکل ۵).



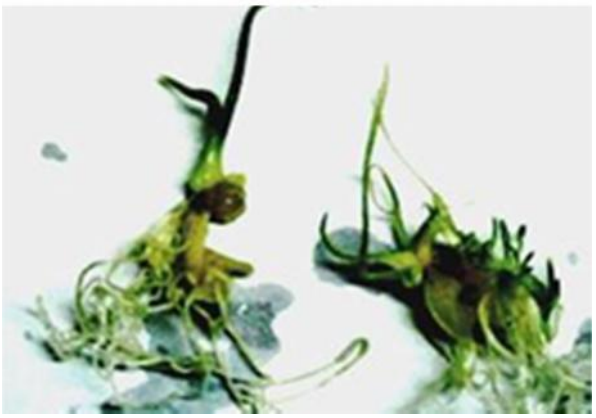
شکل ۵- مقایسه میانگین اثر محیط کشت حاوی تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی و زغال فعال بر طول ریشه

حروف غیرمشابه نشان‌دهنده اثرات معنی‌دار براساس آزمون دانکن در سطح احتمال ۵٪ می‌باشد.

AC (زغال فعال): activated charcoal

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۶- ریشه‌زایی پیازچه‌های موسیر

راست: بیشترین تعداد پیازچه در تیمار ۲ میلی‌گرم در لیتر BA به همراه ۱ میلی‌گرم در لیتر NAA

چپ: بیشترین تعداد و طول ریشه در تیمار ۱ میلی‌گرم در لیتر IAA همراه با ۱ گرم در لیتر زغال فعال

جدول ۶- تجزیه واریانس اثر بستر کشت بر درصد زنده‌مانی در مرحله سازگاری

منبع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات
		سازگاری
تیمار	۴	۲۵۷۲/۵ **
خطا	۱۰	۲۰

**: معنی‌دار در سطح احتمال ۱٪

تجزیه واریانس داده‌های حاصل از درصد زنده‌مانی در مرحله سازگاری (جدول ۶) نشان داد که بسترهای کشت در مرحله سازگاری در سطح احتمال ۱٪ معنی‌دار بود.

به‌منظور سازگاری از نسبت‌های مختلف کوکوپیت، پرلیت و پیت ماس استفاده شد و نتایج مقایسه میانگین درصد زنده‌مانی (شکل ۷) نشان داد که نسبت ۱:۲:۱ اثر معنی‌داری با بقیه بسترهای کشت داشت و ۱۰۰٪ گیاهان سازگار شدند، در حالیکه در نسبت‌های ۰:۱:۱ و ۱:۱:۰ کمترین درصد سازگاری (۳۰٪) بدست آمد. شکل ۸ مراحل باززایی، ریشه‌زایی و سازگاری موسیر با محیط بیرون و انتقال به گلخانه را نشان می‌دهد.

بحث

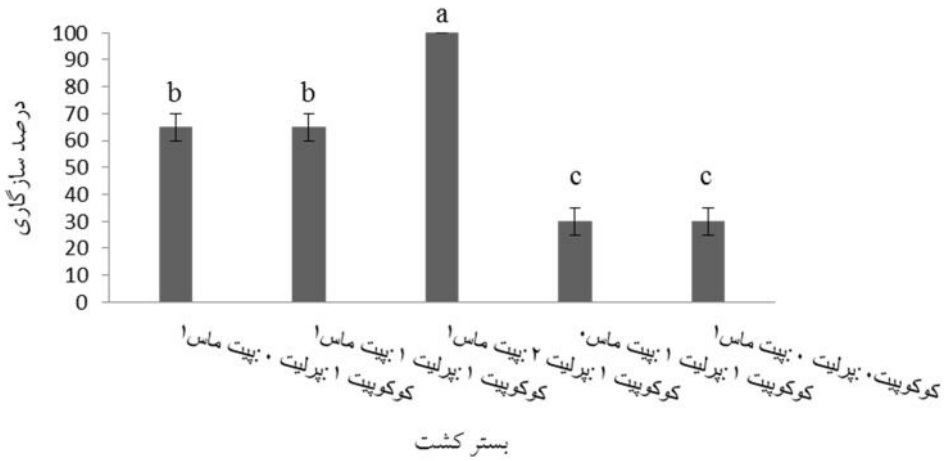
استفاده از کشت بافت به‌منظور تکثیر انبوه و تولید تجاری موسیر بومی ایران (*A. stipitatum*) که مترادف گونه (*A. hirtifolium*) می‌باشد و از لحاظ تفاوت در ساختار تخمدان با هم متفاوت می‌باشند، تاکنون گزارش نشده‌است و برای افزایش توان تکثیر این گیاه می‌توان از ریزنمونه‌های مختلفی استفاده کرد. واکنش ریزنمونه‌ها در شرایط کشت درون شیشه‌ای بستگی به فاکتورهای متعددی ازجمله مقادیر سطوح هورمون‌های داخلی، غلظت تنظیم‌کننده‌های رشد خارجی و برهم‌کنش اثر این تنظیم‌کننده‌ها دارد (Torres, 1989).

طبق نتایج حاصل از این تحقیق، غلظت ۲ میلی‌گرم در لیتر بنزیل آدنین در ترکیب با ۱ میلی‌گرم در لیتر نفتالن استیک اسید بیشترین تأثیر را در تعداد پیازچه داشته است، که افزایش ۲/۷ برابری نسبت به گزارش Ghahremani Majd و همکاران (۲۰۱۰) دارد. استفاده از اکسین نقش مؤثری در تقسیم سلولی دارد و در ترکیب با سایتوکینین باعث سریعتر شدن سرعت تقسیم سلولی می‌شود (Asghari *et al.*, 2012). Ghahremani Majd و همکاران (۲۰۱۰) گزارش کردند که نسبت دو برابر بنزیل آدنین نسبت به نفتالن استیک اسید اثر بهتری در تولید پیازچه در موسیر دارد و

www.SID.ir

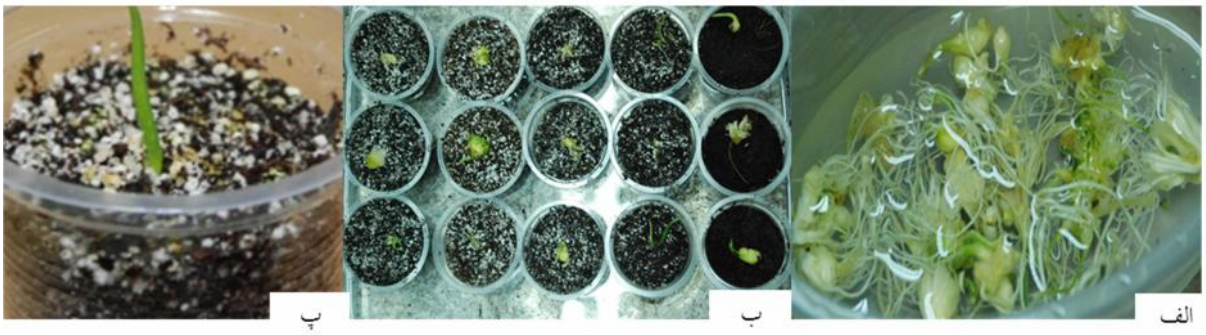
Archive of SID

عدم حضور سایتوکینی‌ها یا پایین بودن غلظت سایتوکینی‌ها نسبت به غلظت اکسین‌ها باعث کاهش و یا عدم تولید پیازچه در موسیر می‌شود.



شکل ۷- مقایسه میانگین اثر ترکیب‌های مختلف بسترهای کشت بر سازگاری موسیر

حروف غیرمشابه نشان‌دهنده اثرات معنی‌دار براساس آزمون دانکن در سطح احتمال ۵٪ می‌باشد.



شکل ۸- انتقال به خاک و سازگاری موسیر، الف) شستشوی ریشه‌های گیاهچه‌های کشت بافتی، ب) انتقال گیاهچه‌ها به ترکیب‌های مختلف بسترهای کشت، پ) رشد موسیر بعد از یک ماه در گلخانه

تشکیل برگ نیاز به تیمار اکسین و سایتوکینین دارد که البته تأکید بر این است که اکسین با غلظت پایین استفاده شود، زیرا کاربرد آن با غلظت بالا سبب غیر نرمال شدن برگ می‌شود (Bonga & Von Aderkas, 1992). در محیط کشت MS حاوی ۲ میلی‌گرم در لیتر بنزیل آدنین همراه با ۱ میلی‌گرم در لیتر نفتالن استیک اسید بیشترین طول برگ‌ها و در محیط ½MS حاوی ایندول استیک اسید کمترین طول برگ‌ها مشاهده شد. تمایز و اندام‌زایی در پاسخ به اکسین‌ها و سایتوکینی‌ها انجام شده و نسبت اکسین به سایتوکینین در محیط کشت بر طول برگ اثر می‌گذارد. Ghahremani Majd و همکاران (۲۰۱۰) گزارش کردند که عدم توازن اکسین و سایتوکینین در بافت موسیر موجب بهم خوردن تعادل فیزیولوژیکی شده و بر طول برگ اثر می‌گذارد. همچنین سایتوکینی‌ها بر باززایی و به‌دنبال آن طول برگ نقش دارند (Otroshi & Karimi Dehkordi, 2014).

www.SID.ir

Archive of SID

محیط کشت ½MS حاوی ایندول استیک اسید در ترکیب با زغال فعال بیشترین تأثیر را بر تعداد و طول ریشه‌ها داشت. زغال فعال برای کشت گیاهان در شرایط درون شیشه‌ای و بهبود رشد و نمو بکار می‌رود و کاربرد آن در محیط کشت ریشه‌زایی باعث افزایش طول ریشه می‌شود (Thomas, 2008). برای ریشه‌زایی ابتدا هورمون ریشه‌زایی لازم بوده و بعد اثر هورمون بازدارنده است، در نتیجه زغال فعال با جذب هورمون روی ریشه‌زایی تأثیر دارد. همچنین زغال فعال با تاریک کردن محیط کشت بر ریشه‌زایی و طول ریشه‌ها اثر می‌گذارد. پاسخ مورفوژنیک در شرایط درون شیشه‌ای تحت تأثیر اجزای مختلف محیط کشت، ازجمله غلظت و نوع تنظیم کننده رشد می‌باشد. هورمون‌ها در غلظت مناسب باعث ایجاد اثرات فیزیولوژیکی عمیق می‌شوند (Otroshi & Karimi Dehkordi, 2014). در محیط کشت ½MS حاوی ۰/۱ میلی گرم در لیتر نفتالن استیک اسید به تنهایی یا همراه با ۱ گرم در لیتر زغال فعال از تعداد و طول ریشه‌ها کاسته شد که به نظر می رسد جذب نفتالن استیک اسید توسط زغال فعال باعث کاهش غلظت زیر حد مناسب شده و چون غلظت اولیه پایین بود در نتیجه در تعداد و طول ریشه‌ها اثر مستقیم داشت. همچنین در محیط کشت MS حاوی بنزیل آدنین و نفتالن استیک اسید چون سایتوکینی‌ها اثر بازدارندگی بر ریشه‌زایی دارند، در نتیجه در محیط کشت MS حاوی ۲ میلی‌گرم در لیتر بنزیل آدنین به همراه ۱ میلی گرم در لیتر نفتالن استیک اسید هیچگونه ریشه‌زایی انجام نشد.

سازگاری موفقیت‌آمیز گیاهان تکثیر شده از طریق کشت بافت و انتقال آنها به شرایط مزرعه مرحله بسیار حساسی می‌باشد. در این پژوهش بیشترین درصد زنده‌مانی در مرحله سازگاری (۱۰۰٪) در بستر کوکوپیت، پرلیت و پیت‌ماس با نسبت ۱:۲:۱ مشاهده شد. درصد زنده‌مانی بالاتر این بستر کشت می‌تواند به‌دلیل تهویه بهتر، تخلخل بیشتر و زهکشی مناسب ناشی از بالا بودن نسبت پرلیت در این بستر باشد. در پژوهشی که Kashyap و Dhiman (۲۰۱۱) بر روی *Gloxinia* و *Saintpaulia* انجام دادند بیشترین درصد زنده‌مانی (۷۹/۰۲٪) را در بستر پرلیت، کوکوپیت با نسبت ۱:۳ مشاهده کردند.

به‌عنوان نتیجه‌گیری کلی می‌توان گفت که در این پژوهش، بیشترین تعداد پیازچه و طول برگ‌ها در محیط کشت MS همراه با ۲ میلی‌گرم در لیتر BA و ۱ میلی‌گرم در لیتر NAA و بیشترین تعداد برگ در محیط کشت MS حاوی ۱ میلی‌گرم در لیتر BA به همراه ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA بدست آمد. همچنین بیشترین تعداد و طول ریشه‌ها در محیط کشت ½MS حاوی ۱ میلی‌گرم در لیتر IAA همراه با ۱ گرم در لیتر زغال فعال مشاهده شد که می‌تواند به‌عنوان روشی کارآمد برای تولید تجاری این گونه با ارزش در شرایط درون شیشه‌ای معرفی گردد.

بر این اساس پیشنهاد می‌شود که در مطالعات آینده از ریزنمونه بذر و یا گیاهچه‌های حاصل از کشت بذرها، تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی همانند ایندول بوتریک اسید برای ریشه‌زایی استفاده گردد. گیاه موسیر تکثیر شده به روش کشت بافت از قدرت رشد بالایی نسبت به گیاه موسیری که به روش‌های سنتی تکثیر می‌شود، برخوردار است. همچنین به‌دلیل یکنواختی گیاه موسیر حاصل از کشت بافت و نیز سازگاری بهتر این گیاه حاصل، عملکرد و میزان بهره‌وری افزایش می‌یابد.

سپاسگزاری

از کارکنان بانک گیاهی مرکز ملی ذخایر ژنتیکی و زیستی ایران برای تهیه ریزنمونه و همچنین جناب آقای دکتر قادری مدیر گروه بیوتکنولوژی گیاهان دارویی پژوهشکده گیاهان دارویی جهاد دانشگاهی کرج و همکاران محترمی که در انجام این تحقیق ما را یاری کردند تشکر و قدردانی می‌گردد.

www.SID.ir

Archive of SID

منابع مورد استفاده

- Asghari, F., Hossieni, B., Hassani, A., Asghari, M.R. and Farrokhi, J., 2012. Effect of different hormonal combination on *In vitro* direct shoot regeneration of basil (*Ocimum basilicum*). Journal of Agricultural Biotechnology, 4(2): 1-15.
- Ayabe, M. and Sumi, S., 1998. Establishment of novel tissue culture method stems disc culture and practical application to micro propagation of garlic (*Allium sativum* L.). Plant Cell Reports, 17: 773-779.
- Bonga, J.M. and Von Aderkas, P., 1992. *In Vitro* Culture of Trees. Nighoff Publishers, Dordereht, 238p.
- Friesen, N. and Sapir, O.F., 2014. A new *Allium* species from section Molium from Israel: *A. akirense* (Amaryllidaceae). Phytotaxa Magnolia, 173(2): 140-148.
- Fritsch, R.M. and Abbasi, M., 2013. A Taxonomic Review of *Allium* subg. Melanocrommyum in Iran. Leibniz-Institut für Pflanzengenetik und Kulturpflanzenforschung Gatersleben (IPK), 240p.
- Gabriela, F. and Luciani, A.K., 2006. Effect of explants and growth regulators in garlic callus formation and plant regeneration. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 87: 139-143.
- Ghaemizadeh, F., Dashti, F. and Ghahremani, H., 2011. Study of dormancy and germination among different populations of Mooseer. Abstracts of the 7th Congress of Iranian Horticultural Science, Isfahan, 5-8 September: 522-524.
- Ghahremani Majd, H., Dashti, F., Piri, Kh. and Yari, M.B., 2010. In vitro bulblet formation of Mooseer (*Allium hirtifolium*). Journal of Plant Production Technology, 9(2): 65-73.
- Jafari, R., Moieni, A., Karimzadeh, G. and Movahedi, Z., 2015. Effect of the BAP, Kin and GA3 on the *in vitro* shoot regeneration and effects of the activated charcoal and IAA on *in vitro* rooting in lisianthus plant (*Eustoma grandiflurom*). Journal of Applied Crop Breeding, 3(1): 57-67.
- Kashfi Bonab, A., 2011. The relative economic advantage the cultivation and trade of medicinal plants in Iran and its value in world markets. Commercial Surveys, 44(8): 78-67.
- Kashyap, B. and Dhiman, S.R., 2011. Effect of media on hardening of *in vitro* multiplied plantlets of gloxinia and saintpaulia under low cost polytunnels. International Journal of Farm Sciences, 1(2): 63-67.
- Luciani, G.F., Mary, A.K., Pellegrini, C. and Curvetto, N.R., 2006. Effects of explants and growth regulators in garlic callus formation and plant regeneration. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 87: 139-143.
- Martín-Urdíroz, N., Garrido-Gala, J., Martín, J. and Barandiaran, X., 2004. Effect of light on the organogenic ability of garlic roots using a one-step *in vitro* system. Plant Cell Reports, 22(10): 721-724.
- Murashige, T. and Skoog, F., 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiology Plant, 15: 473-497.
- Omidi, M. and Farzin, N., 2012. Biotechnology approaches for improvement of medicinal plants. Modern Genetics Journal, 7(30): 209-220.
- Otroshi, M. and Karimi Dehkordi, R., 2014. Effect of different concentrations of plant growth regulators on *in vitro* micropropagation of cherry tomato. Journal of Science and Technology of Greenhouse Culture, 5(19): 127-134.
- Rahbar, M., Hoseini Taghavi, SA., Diba, K. and Heidari, A., 2005. A study of the effects of bactericidal extract shallot. Journal of Medicinal Plants, 13: 26-29.
- Torres, K., 1989. Tissue Culture for Horticulture Crop. Published by Van Nostrand Reinhold, New York, 224p.
- Tubić, L., Anačkov, G., Milojević, J., Ghalawenji, N., Mitić, N., Igić, R. and Zdravković-Korać, S., 2014. High variability in the tissue culture response of root-tips of *Allium ascalonicum* individuals and optimization of the regeneration procedure. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 118(1): 101-110.
- Wawrosch, C., Malla, P.R. and Kopp, B., 2001. Micropropagation of *Alliun wallichii* Kunth, a threatened medicinal plant of Nepal. *In Vitro* Cellular & Developmental Biology-Plant, 37: 555-557.
- Xu, Z., Um, Y.C., Kim, C.H., Lu, G., Guo, D.P., Liu, H.L., Bah, A.A. and Mao, A., 2008. Effect of plant growth regulators, temperature and sucrose on shoot proliferation from the stem disc of Chinese jiaotou (*Allium chinense*) and *in vitro* bulblet formation. Acta Physiologiae Plantarum, 30(4): 521-528.

www.SID.ir

Archive of SID

Optimizing the regeneration and rooting of Iranian native shallot (*Allium stipitatum*) via *in vitro*

A. Hajiheidar[1], M. Tohidfar[2], S.M. Miri[3], A.R. Zarekarizi[4*], S. Ghadermazi[1] and Kh. Samiee[5]

1- M.Sc. Student, Department of Horticulture, Karaj Branch, Islamic Azad University, Karaj, Iran
2- Department of Biotechnology, Faculty of Engineering, Energy and New Technology, Shahid Beheshti University, Tehran, Iran
3- Department of Horticulture, Karaj Branch, Islamic Azad University, Karaj, Iran
4*-Corresponding author, Medicinal Plant Research Center, Institute of Medicinal Plants, Academic Center for Education, Culture and Research, Karaj, Iran, E-mail: amirrzare@gmail.com
5- Medicinal Plant Research Center, Institute of Medicinal Plants, Academic Center for Education, Culture and Research, Karaj, Iran

Received: July 2016 Revised: October 2016 Accepted: November 2016

Abstract

This research was aimed to achieve the optimal protocol for micropropagation of shallot (*Allium stipitatum*) via basal disc. For regeneration, the basal disc explants were cultured on Murashig & Skoog (MS) medium containing different concentrations of Benzyladenine (BA) (0, 1 & 2 mgl^{-1}) and Naphthalene acetic acid (NAA) (0, 0.5 & 1 mgl^{-1}). The regenerated bulblets were rooted on MS and ½MS medium supplemented with different concentrations of BA, NAA, Indole-3-acetic acid (IAA) and activated charcoal (AC). The rooted plantlets were successfully acclimatized under *ex vitro* conditions. The results indicated that the maximum number of bulblet (12.66) was observed on medium containing 2 $mg.l^{-1}$ BA and 1 $mg.l^{-1}$ NAA. In addition, the highest root number (1.77) and length (2.55 cm) were observed on 1 $mg.l^{-1}$ IAA and 1 $g.l^{-1}$ activated charcoal and the survival rate was 100% in pots filled with a coco peat: perlite: peat moss (1:2:1 v/v) mixture. This research could be a suitable method for micropropagation of this endangered plant. Hence, the rapid micropropagation of shallot is compulsory because of its various applications and extinction.

Keywords: *Allium stipitatim*, regeneration, rooting, activated charcoal.

www.SID.ir