

تکثیر غیر جنسی گونه چوبی کُنار (*Ziziphus spina christi* (L.) Willd) از طریق باززایی غیر مستقیم از ریزنمونه برگ در شرایط درون شیشه‌ای

اله احمدی^{۱*}، سید محمد حسینی نصر^۲، حمید جلیلود^۳ و حامد صالحیان آقبلاغ^۴

*۱- نویسنده مسئول مکاتبات، کارشناس ارشد جنگلداری، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری

پست الکترونیک: ahmadi_silva@yahoo.com

۲- استادیار، گروه جنگلداری دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری

۳- دانشیار، گروه جنگلداری دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری

۴- کارشناس ارشد بیوتکنولوژی، دانشکده علوم زراعی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۱/۰۴/۱۱

تاریخ دریافت: ۱۳۹۰/۱۲/۰۳

چکیده

با توجه به دگرگشتی گونه کُنار، لازم است برخی از پایه‌های نخبه را از طریق غیرجنسی و تکنیک کشت بافت تکثیر نمود. در این مطالعه قابلیت کالوس‌زایی و باززایی ریزنمونه برگ گونه کُنار مورد ارزیابی قرار گرفت. ریزنمونه‌های برگ بدست آمده از نهال تولید شده در شرایط درون شیشه‌ای، روی محیط کشت MS حاوی هورمون‌های 2,4-D, NAA, TDZ و BAP در سه سطح (۰/۵، ۱ و ۲ میلی‌گرم در لیتر) کشت شدند. به منظور باززایی، محیط پایه‌ی MS با سطوح مختلف از هورمون‌های TDZ, BAP و Kin (۱/۰، ۳/۰ و ۵/۰ میلی‌گرم در لیتر) و برای ریشه‌دار کردن گیاهچه‌ها از محیط پایه‌ی MS ۱/۲ با سطوح مختلف از هورمون‌های IBA و NAA با سطوح (۰/۵، ۱ و ۲ میلی‌گرم در لیتر) استفاده شد. نتایج نشان داد که در محیط کشت حاوی 2, 4-D و TDZ با غلظت ۰/۵ و ۱ میلی‌گرم در لیتر (x=۱۰) بالاترین میانگین کالوس‌زایی بدست آمد. تیمارهای Kin با غلظت ۵/۰ و TDZ با غلظت ۱/۰ میلی‌گرم در لیتر به ترتیب با میانگین عددی ۸/۸۴ و ۸/۹۵ دارای بالاترین میانگین شاخه‌زایی بودند، اما شاخه‌های تولید شده توسط TDZ، بی‌شکل و غیرعادی بودند، در حالی که در تیمار هورمونی Kin، شاخه‌های مستقیم و نرمالی تولید شدند. البته مقدار ریشه‌زایی توسط هورمون IBA نسبت به هورمون NAA در همه غلظت‌ها بیشتر است، اما هورمون IBA در غلظت ۱/۰ میلی‌گرم در لیتر از سایر غلظت‌ها در هر دو هورمون در تولید ریشه مؤثرتر است.

واژه‌های کلیدی: کشت بافت، باززایی، سایتوکنین، اکسین، کالوس و کُنار.

مقدمه

ایران محسوب می‌شود (Sadeghi & Farar, 2002).
عصاره این گونه به‌عنوان یک داروی هومئوپتیک محلی در
نواحی آسیای میانه، آفریقای جنوبی و آمریکای شمالی
استفاده می‌شود (Aea et al., 1998). میوه‌ی همه گونه‌ها

گونه کُنار با نام علمی (*Ziziphus spina christi* (L.) Willd متعلق به خانواده *Rhamnaceae* یکی از گونه‌های بومی ایران و به‌عنوان ذخایر ژنتیکی از گونه‌های با ارزش

تکثیر و اصلاح نژاد گیاهان با اهمیت زراعی، تجاری، باغبانی، دارویی و تحقیقات پایه محسوب می‌شود. یکی از مزایای این تکنیک، تکثیر تعداد زیاد گیاه در یک بازه زمانی کوتاه و همچنین تولید مواد دارویی از اندام‌های خاص در مقیاس انبوه می‌باشد. ولی کشت بافت درختان، توسعه کمتری نسبت به گیاهان علفی یافته است و این تفاوت به دلیل مشکل بودن ریزازدیادی گیاهان چندساله در مقایسه با گیاهان علفی است که تحت تأثیر عوامل زیادی است. مقالات اندکی در خصوص ریزازدیادی این گونه ارائه شده است که اندام‌زایی مستقیم از ریزنمونه‌های بالغ در گونه‌های وحشی در طبیعت متداول‌ترین روش باززایی آن است. طبق تحقیقات گذشته، تکثیر گونه کنار، از طریق کشت بافت در شرایط درون شیشه‌ای با استفاده از ریزنمونه‌های مختلف انجام شده است (Al-Sulaiman & Barakat, 2010; Assareh & Sardabi, 2005; Sudhersan & Hussain, 2003). مشکلات مختلفی از جمله محدودیت‌های ناشی از دخالت ترکیبات فنولی در مراحل کشت بافت این گیاه موجب شده است که هیچ گزارشی از باززایی گونه کنار از طریق کالوس وجود نداشته باشد. بهینه‌سازی فرایند کشت بافت و باززایی کنار با تثبیت و واسطه‌گری کشت کالوس، راهگشای انجام تحقیقات بنیادی و کاربردی در زمینه‌های مختلفی نظیر اصلاح گیاه از طریق تنوع سوماکلونال خواهد بود که خود نیز به‌عنوان زمینه‌ساز انجام پروژه‌های مرتبط با دست‌ورزی در سطوح عالی تر مهندسی ژنتیک همچون تراریختی و مهندسی مسیرهای بیوستز انواع متابولیت‌ها، مورد توجه قرار خواهد گرفت. بنابراین هدف از طراحی این مطالعه، تعیین قابلیت کشت و برآورد میزان سازگاری این گونه با شرایط کشت درون شیشه‌ای و همچنین تعیین تنظیم‌کننده‌های رشدی مناسب جهت کالوس‌دهی و

مصرف خوراکی دارند و ارزش تغذیه‌ای فراوان داشته و قابلیت تجاری بالایی دارند (Sudhersan & Hussain, 2003). مشخصات ویژه این گیاه نظیر منظرسازی و زیبایی آفرینی، مقاومت به خشکی و شوری، تداوم حیات و سرزندگی در بدترین شرایط آب و هوایی اقلیم‌های بیابانی و نیمه‌بیابانی و داشتن سایر ویژگی‌های اعجاز‌آور، درخت کنار را به‌عنوان یکی از معجزات الهی در آفرینش مطرح کرده است (Assareh & Sabaghzadeh, 2001). از مهمترین مسائل در احیای این گونه از دیاد آن می‌باشد. تکثیر عادی این گیاه از طریق بذر است که روش بسیار مفید و قابل توصیه برای تولید نهال در امر توسعه و کشت این گیاه می‌باشد (Sohail et al., 2009). اما بذر این گونه به دلیل دارا بودن پوسته بسیار سخت چوبی دارای خفتگی می‌باشد (Al-Sulaiman & Barakat, 2010) و برای جوانه‌زنی نیاز به تیمارهای مخصوص خواب شکنی دارد. جوانه‌زنی این گونه بدون تیمارهای رفع خفتگی (اگر شرایط بهینه دمای خاک (در محدوده ۲۴ و ۲۷ درجه سانتی‌گراد) فراهم باشد)، بسیار پایین و حدود ۳۰ می‌باشد (Sohail et al., 2009). همچنین بسیاری از بذرهای این گونه به وسیله حشرات آسیب می‌بینند و در نتیجه تعداد بذرهای زنده قابل دسترس برای جوانه‌زنی کاهش می‌یابد. با این حال و با توجه به دگرگشتی شدید این گیاه و تفرق صفات در نسل‌های بعدی لازم است برای حفظ برخی از صفات اقتصادی و بهره‌گیری از آنها در امر باغبانی، جنگل‌کاری، برخی از پایه‌های نخبه را از طریق غیرجنسی تکثیر نمود (Assareh & Sardabi, 2005). در این راستا روش‌های کشت بافت گیاهی برای ریزازدیادی گیاه از جایگاه بسیار مهمی برخوردار شده‌اند. تکنیک کشت بافت به‌عنوان بخشی از علم بیوتکنولوژی، یک روش بنیادی در

کالوس‌های صاف، آبدار و شیری رنگ به‌عنوان غیرجنین‌زا تلقی شدند (Chitra & Kumar, 2006). محیط کشت استفاده شده برای باززایی، از محیط کشت پایه‌ی MS با سطوح مختلف هورمون‌های TDZ, BAP و Kin (۱/۰، ۳/۰ و ۵/۰ میلی‌گرم در لیتر) در ترکیب با NAA (۰/۵ میلی‌گرم در لیتر) استفاده شد. بعد از انتقال کالوس‌ها به محیط باززایی، ابتدا نمونه‌ها به مدت ۱ هفته در شرایط تاریکی و دمای 26 ± 1 درجه‌ی سانتی‌گراد تیمار گردیدند. بعد از این مدت نمونه‌ها در تیمار ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی در دمای 25 ± 1 درجه‌ی سانتی‌گراد قرار گرفتند (Xiaoja et al., 2006). گیاهان حاصل از باززایی، جهت ریشه‌زایی به محیط کشت پایه‌ی MS (۱/۲ محیط MS که غلظت کلیدی مواد تشکیل‌دهنده آن به نصف کاهش یافته است)، با سطوح مختلف از هورمون‌های IBA و NAA با سطوح (۰/۵، ۱ و ۲ میلی‌گرم در لیتر) منتقل گردیدند. گیاهان ریشه‌دار شده از لوله‌ی آزمایش خارج شده و پس از کشت در خاک استریل به محیط سازگارسازی انتقال داده شدند (Arefi et al., 2003). درصد کالوس‌زایی و باززایی و ریشه‌زایی در قالب طرح کاملاً تصادفی در چهار تکرار محاسبه گردید. فاکتور مورد بررسی در مرحله کالوس‌زایی و ریشه‌زایی، ترکیبات مختلف هورمون‌ها بررسی شد. در مرحله ریشه‌زایی دو فاکتور غلظت و هورمون مورد بررسی قرار گرفت. درصد کالوس‌زایی با استفاده از فرمول ۱ و درصد باززایی با استفاده از فرمول ۲ و درصد ریشه‌زایی با استفاده از فرمول ۳ محاسبه گردید.

ارزایی پتانسیل باززایی این گونه در شرایط کشت بافت می‌باشد.

مواد و روشها

بذرهای گونه‌ی مورد مطالعه از سازمان جنگل‌ها و مراتع استان خوزستان تهیه شد. بذرها ابتدا به مدت ۱۰ دقیقه در محلول ۰/۱٪ کلرید جیوه، استریل سطحی شده و بعد دو بار با آب مقطر استریل شستشو داده شد. سپس بذرها در اتانول ۷۰٪ به مدت ۴۰ ثانیه غوطه‌ور گردید. در نهایت مجدداً با آب مقطر استریل به خوبی شستشو داده شدند. بذرهای استریل شده به منظور تولید نهال استریل در لوله‌های آزمایش حاوی محیط کشت MS بدون هورمون کشت شده و در ژرminatور نگهداری شدند. پس از رشد گیاهچه‌ها، به منظور القاء کالوس از ریز نمونه‌های برگ، برگ‌ها که از وسط به دو قسمت (دور از محور دمبرگ و نزدیک محور دمبرگ) تقسیم و روی محیط کشت MS حاوی غلظت‌های مختلف (۰/۵، ۱ و ۲ میلی‌گرم در لیتر) هورمون‌های TDZ, NAA, 2,4-D و BAP کشت شدند. کشت‌ها در انکوباتور در دمای 26 ± 1 درجه سانتی‌گراد در شرایط تاریکی نگهداری شدند. نمونه‌ها هر هفته مورد بازبینی قرار گرفته و تعداد ریزنمونه‌هایی که کالوس تولید کردند، شمارش شده و درصد کالوس‌زایی برای هر تیمار به طور جداگانه محاسبه گردید. دو هفته پس از واكشت، کالوس‌های جنین‌زا برای باززایی گیاه، به محیط باززایی انتقال داده شدند. کالوس‌های سبز، زرد روشن، گره‌دار و ترد و شکننده جنین‌زا و در مقابل

$$\text{درصد کالوس زایی} = \frac{\text{تعداد کالوس های تولید شده}}{\text{تعداد برگ کشت شده}} \times 100 \quad (\text{فرمول ۱})$$

$$\text{درصد باززایی} = \frac{\text{تعداد کالوس های باززایی شده}}{\text{تعداد کالوس های انتقال داده شده}} \times 100 \quad (\text{فرمول ۲})$$

$$\text{درصد ریشه زایی} = \frac{\text{تعداد شاخه های ریشه دار شده}}{\text{تعداد شاخه های انتقال داده شده}} \times 100 \quad (\text{فرمول ۳})$$

رنگ آبدار بودند، در صورتی که کالوس های تولید شده به وسیله TDZ کالوس های سبز رنگ با ساختار کروی سفت بودند. در این تحقیق مشاهده شد که برخی از ریزنمونه ها که بر روی محیط کشت MS حاوی هورمون NAA بود، ریشه های مویی تولید کرد. تأثیر ترکیبات هورمونی متفاوت بر تولید کالوس در جدول ۱ نشان داده شده است. نتایج حاصل از تجزیه واریانس بین مقادیر درصد تشکیل کالوس در تیمارهای هورمونی نشان می دهد که اثر تیمارهای متفاوت بر میزان کالوس زایی، معنی دار (۰/۰۱ < P) شده است. شکل ۴ تغییرات مورفولوژیکی کالوس های تولید شده از ریزنمونه برگ را نشان می دهد.

به دلیل اینکه داده ها به صورت درصد بوده و از توزیع نرمال برخوردار نبودند، از تبدیل داده ی $\sqrt{x + 0.5} \text{ArcSin}$ برای نرمال کردن داده ها استفاده شد (Bagheri et al., 2008) و میانگین ها در سطح احتمال ۵ درصد مقایسه گردید. تجزیه و تحلیل داده ها با استفاده از نرم افزار آماری SPSS نسخه ی ۱۶ انجام شد.

نتایج

کالوس زایی: بعد از گذشت ۶ روز از کشت ریزنمونه ها بر روی محیط کشت حاوی هورمون، ریزنمونه ها شروع به تورم و تولید کالوس کردند. کالوس های تولید شده به وسیله 2,4-D کالوس های سفید

جدول ۱- تجزیه واریانس تأثیر ترکیبات هورمونی مختلف بر کالوس زایی

مقدار F	میانگین مربعات	درجه آزادی	منابع تغییرات
۱۲/۵۴۲**	۶/۱۷۴	۱۱	ترکیبات هورمونی
	۰/۴۹۲	۴۸	خطای آزمایش
	۱۱/۳		ضریب تغییرات

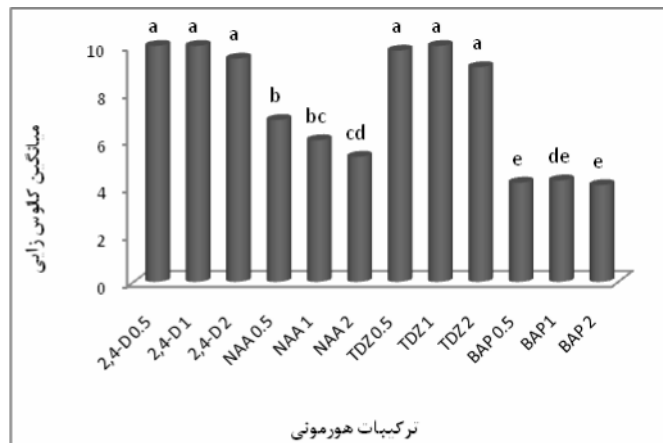
** و * : معنی دار در سطح احتمال ۱٪ و ۵٪ ns: عدم معنی داری

دارای بالاترین میانگین کالوس زایی می باشد. در مقابل محیط کشت های حاوی BAP در هر سه سطح کمترین مقدار کالوس زایی را به خود اختصاص دادند. از میان

نتایج مقایسه میانگین نشان داد که از میان تیمارهای به کار برده شده، محیط کشت حاوی 2, 4-D و TDZ با غلظت ۰/۵ و ۱ میلی گرم در لیتر با میانگین عددی ۱۰

غلظت‌های ذکر شده بودند. در هورمون NAA نیز با افزایش غلظت کالوس‌زایی کاهش یافت و تشکیل کالوس با این هورمون در حد میانه قرار داشت (شکل ۱).

سایر تیمارها، محیط کشت‌های حاوی TDZ و 2,4-D در غلظت ۲ میلی‌گرم در لیتر با میانگین کالوس‌زایی ۹/۸۲ دارای بیشترین مقادیر بعد از 2, 4-D و TDZ با



شکل ۱- مقایسه میانگین کالوس‌زایی در ترکیبات هورمونی مختلف

کالوس‌های استفاده شده بعد از گذشت ۴ ماه در جدول ۲ نشان داده شده است. تجزیه واریانس اثر تیمارهای هورمونی بر باززایی نشان داد که اثر تیمار بر میزان شاخه-زایی، معنی‌دار ($P < 0.01$) گردید.

باززایی: کالوس‌های تولید شده از ریزنمونه‌های مختلف بعد از چندین بار واكشت به منظور تکثیر، به محیط کشت‌های باززایی حاوی سطوح مختلف هورمون انتقال داده شدند. تأثیر تیمارهای مختلف و منشأ

جدول ۲- تجزیه واریانس تأثیر ترکیبات هورمونی مختلف بر کالوس‌زایی

مقدار F	میانگین مربعات	درجه آزادی	منابع تغییرات
۵/۴۶۰**	۲۲/۶۷۹	۸	تیمارهای هورمونی
	۰/۴۹۲	۹۹	خطای آزمایش
	۱۱/۳		ضریب تغییرات

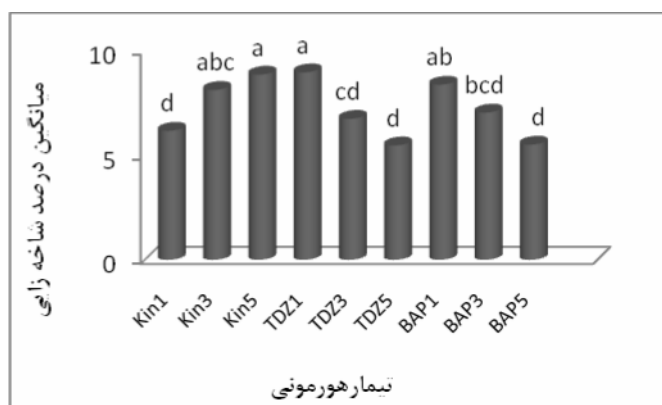
**، * معنی‌دار در سطح احتمال ۱٪ و ۵٪ ns: عدم معنی‌داری

میانگین شاخه‌زایی بودند، اما همان طور که در بخش قبلی توضیح داده شد شاخه‌های تولید شده در تیمار هورمونی TDZ، بی‌شکل و غیرعادی بودند؛ کدر حالی که در تیمار هورمونی Kin، شاخه‌های مستقیم و نرمالی تولید شدند.

نتایج مقایسه میانگین نشان داد که از میان تیمارهای هورمونی به‌کار رفته، تیمارهای Kin با غلظت ۵/۰ میلی-گرم در لیتر و TDZ با غلظت ۱/۰ میلی‌گرم در لیتر به ترتیب با میانگین عددی ۸/۸۴ و ۸/۹۵ دارای بالاترین

۸/۱۱ و ۸/۳۸ دارای بیشترین مقادیر شاخه‌زایی بوده است. وضعیت سایر تیمارها نیز در شکل ۲ ارائه گردیده است. از یافته‌های به دست آمده می‌توان به این نتیجه رسید که غلظت‌های بالای هورمون Kin و غلظت‌های پایین دو هورمون TDZ و BAP در میزان شاخه‌زایی تأثیر مثبت دارند.

در مقابل در تیمارهای ۱/۰ میلی‌گرم در لیتر Kin، ۵/۰ میلی‌گرم در لیتر TDZ و ۵/۰ میلی‌گرم در لیتر BAP، کمترین مقدار شاخه‌زایی اتفاق افتاد. بعد از Kin و TDZ ۱/۰ و ۵/۰ میلی‌گرم در لیتر که در بالا ذکر شد، از میان سایر تیمارها، تیمار ۳/۰ میلی‌گرم در لیتر Kin و ۱/۰ میلی‌گرم در لیتر BAP، به ترتیب با میانگین شاخه‌زایی



شکل ۲- مقایسه میانگین شاخه‌زایی در تیمارهای هورمونی مختلف

مختلف بر ریشه‌زایی گیاهچه‌های تولید شده نشان داد که اثر ساده‌ی غلظت و هورمون بر روی درصد ریشه‌زایی معنی‌دار گردید ($P < 0/01$)، در حالی که اثر متقابل غلظت و هورمون بر درصد ریشه‌زایی در سطح ($P < 0/05$) معنی‌دار گردید. ریشه‌زایی گیاهچه‌ها در محیط‌کشت‌های مختلف در شکل ۴-۷ و ۸ نشان داده شده است.

ریشه‌زایی: در این مطالعه مشاهده شد که زغال فعال در ریشه‌زایی تأثیر مثبت دارد، به طوریکه در بعضی از محیط کشت‌های بدون زغال فعال، انتهای شاخه‌ها توده‌ی کالوس تشکیل شد. تأثیر غلظت‌های مختلف دو هورمون NAA و IBA بر ریشه‌زایی گیاهچه‌ها در جدول ۳ نشان داده شده است. تجزیه واریانس اثر غلظت هورمون‌های

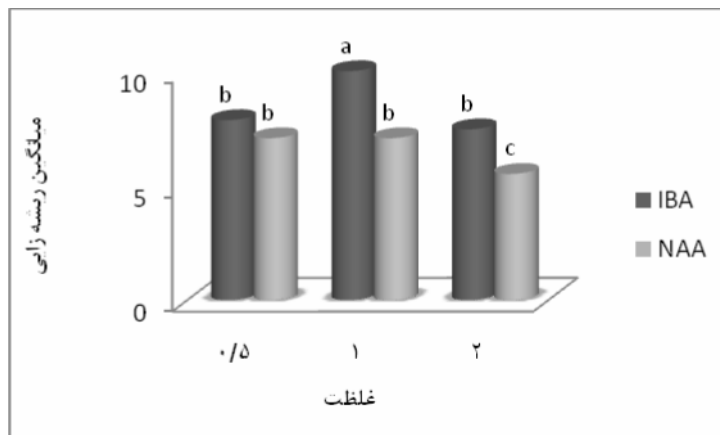
جدول ۳- تجزیه واریانس تأثیر نوع و غلظت هورمون روی درصد ریشه‌زایی

منابع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات	مقدار F
غلظت هورمون	۲	۸/۳۴۹	۱۹/۶۷۷**
هورمون	۱	۲۱/۴۷۰	۵۰/۵۹۹**
هورمون × غلظت هورمون	۲	۲/۲۸۴	۵/۳۸*

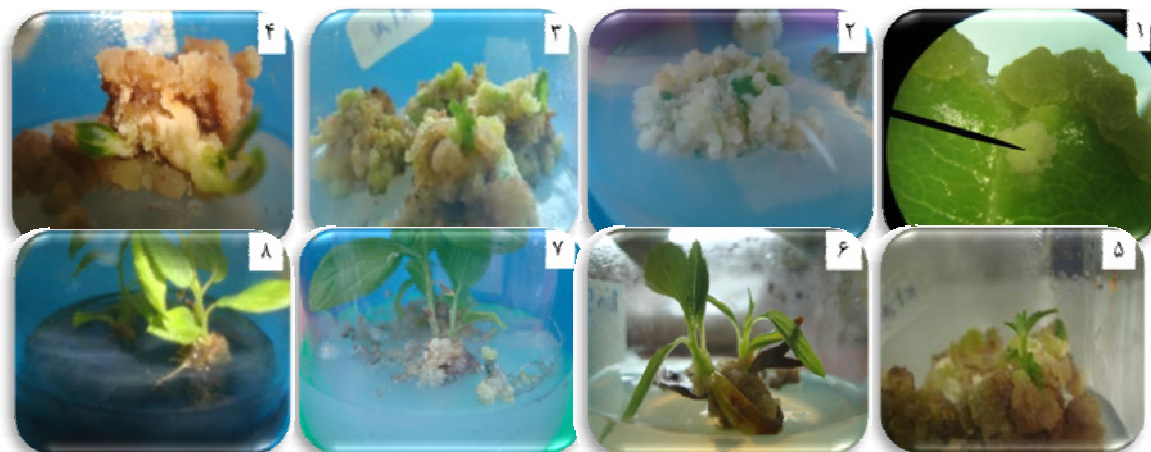
** : معنی‌دار در سطح ۱٪ * : معنی‌دار در سطح ۵٪ ns : عدم معنی‌داری

میلی گرم در لیتر) و پایین تر (۰/۵ میلی گرم در لیتر) این هورمون ریشه‌زایی کاهش یافت. پس می‌توان به این نتیجه رسید که غلظت‌های ۰/۵ تا ۲/۰ میلی گرم در لیتر هورمون IBA غلظت ایده‌آل به منظور ریشه‌زایی می‌باشد. در هورمون NAA غلظت‌های ۰/۵ و ۱/۰ میلی گرم در لیتر اثر مشابه نشان دادند و غلظت ۲/۰ میلی گرم در لیتر تأثیر کمی بر تولید ریشه در گیاهچه‌ها داشت (شکل ۳).

نتایج حاصل از مقایسه میانگین درصد ریشه‌زایی گیاهچه‌ها به روش دانکن در شکل ۳ نشان داده شده است. همان‌طور که مشاهده شد، مقدار ریشه‌زایی توسط هورمون IBA نسبت به هورمون NAA در همه غلظت‌ها بیشتر است. همچنین در شکل ۳ نشان داده شده که هورمون IBA در غلظت ۱/۰ میلی گرم در لیتر از سایر غلظت‌ها در هر دو هورمون در تولید ریشه مؤثرتر است. در غلظت‌های بالاتر (۲)



شکل ۳- مقایسه میانگین ریشه‌زایی تحت تأثیر تیمارهای مختلف



شکل ۴- (۱) کالوس‌های سفت و سبز رنگ که در محل برش ریزنمونه برگ تولید شده، (۲) ریشه مویی تولید شده توسط ریزنمونه برگ کشت شده بر روی محیط کشت حاوی NAA، (۳) آغاز باززایی از کالوس‌ها و ایجاد شاخه‌های نابجا، (۴) باززایی کالوس ریشه بر روی محیط کشت 1 mg/l TDZ، (۵) شاخه‌زایی بر روی محیط کشت 5 mg/l Kin، (۶) شاخه‌های تولید شده بر روی محیط کشت 1 mg/l BAP، (۷) کشت گیاهچه بر روی محیط کشت MS فاقد زغال فعال و تشکیل کالوس در انتهای گیاهچه، (۸) آغاز ریشه‌زایی در گیاهچه‌ی کشت شده بر روی محیط کشت حاوی هورمون IBA

بحث

گونه *Jatropha curcas* استفاده کردند مشابه بود. اکسین 2,4-D به تنهایی یا در ترکیب با سایتوکنین به طور گسترده در تولید و حفظ کالوس استفاده می‌شود (Castillo et al., 2008) و در تحقیقات زیادی مشاهده شد که 2, 4-D بهترین و معمول‌ترین اکسین به منظور تولید کالوس در تک لپه‌ای‌ها و حتی در دولپه‌ای‌ها می‌باشد (Mamun et al., 1996) و نتایج این مطالعه نیز با این یافته‌ها موافق بود. نتایج تحقیق حاضر نشان داد که با استفاده از 2, 4-D ۱۰۰٪ ریزنمونه‌ها کالوس تولید کردند (شکل ۱)، این نتایج با یافته‌های Mungole و همکاران (۲۰۰۹) مشابه بود. پایین‌ترین مقدار در تولید کالوس و همچنین درجه تشکیل کالوس در همه‌ی غلظت‌های سایتوکنین BAP مشاهده شد (شکل ۱). در حضور NAA کالوس‌های تشکیل شده، ریشه مویی تولید کردند. در تحقیقاتی که در گذشته صورت گرفته بیان شده که هورمون NAA اکسین بسیار مناسبی به منظور ریشه‌زایی می‌باشد، که در ازدیاد درون شیشه‌ای چندین گونه گیاهی این نکته به اثبات رسیده است (Maliti et al., 2008). کالوس‌های کشت شده بر روی محیط‌کشت‌های حاوی غلظت‌ها و ترکیبات مختلف از هورمون‌ها، پاسخ‌های مورفولوژیکی مختلفی نشان دادند و هر کالوس کشت شده بر روی محیط‌کشت‌های مختلف توان باززایی متفاوتی از خود نشان دادند (شکل ۴-۳، ۴، ۵ و ۶). از جدول ۳ می‌توان فاکتور غلظت‌ها و ترکیبات مختلف هورمون‌های استفاده شده را در محیط کشت و تأثیرات معنی‌دار پاسخ‌های کالوس‌های باززایی شده را استخراج کرد. با استناد به مشاهدات و ثبت داده‌های مورد نیاز می‌توان به این نتیجه رسید که هورمون Kin هم در توان باززایی کالوس‌ها و تولید آنها و هم در تکثیر آنها از دو

تولید کالوس با کیفیت خوب و بالا (کالوس‌های سبز رنگ با ساختار کروری و سفت) و باززایی مناسب گیاهان، یکی از مراحل اساسی در استفاده موفق از روش‌های مدرن در اصلاح ژنتیکی محصولات مطرح شده است (Khalafalla et al., 2010). در تحقیق انجام شده مشخص شد که کشت برگ در سمت دور از محور دمبرگ بر روی محیط‌کشت باعث افزایش تولید کالوس می‌شود. افزایش تولید کالوس در سمت دور از محور می‌تواند به ساختار اپیدرمی متفاوت در دو جهت دور از محور و نزدیک محور مرتبط باشد. سمت دور از محور دمبرگ دارای سطح ناصاف بوده که به‌طور مستقیم در برخورد با محیط‌کشت قرار می‌گیرد. این سطح ناصاف دارای کوتیکول نازک بوده و راحت‌تر و به‌طور مؤثرتری مواد غذایی و هورمون‌های رشد را از محیط‌کشت جذب می‌کند. مطالعات زیادی نشان دادند که برای تولید کالوس با هدف باززایی، ریزنمونه برگ مفید واقع شده است (Meiners et al., 2007). از بین ۴ هورمون استفاده شده، سایتوکنین BAP و اکسین NAA واکنش خوبی به منظور تولید کالوس نشان ندادند. بر خلاف این دو هورمون، هورمون‌های TDZ و 2,4-D تأثیر بسیار زیادی در تولید کالوس و شکل‌زایی (مورفوزن) آن داشتند. هورمون TDZ شبه سایتوکنین موثر در کشت بافت گونه‌های چوبی می‌باشد (Kumar et al., 2011). در همه‌ی غلظت‌های TDZ، افزایش تولید و تکثیر کالوس مشاهده شد و نتایج تمام غلظت‌ها تقریباً مشابه بود (شکل ۱). این نتیجه با یافته‌های Gomez-Leyva و همکاران (۲۰۰۸) که از هورمون TDZ برای تولید و تکثیر کالوس گونه *Arbutus unedo* و همچنین Sharma و همکاران (۲۰۱۱) بر روی

(۲۰۱۰) بر روی ریزنمونه گره گونه کنار انجام دادند، مشابه است. در تحقیقی که توسط Ahmad و همکاران (۲۰۱۰) انجام شد، بیشترین باززایی و بیشترین تعداد شاخه در ریزنمونه برگ گونه *Ruta graveolens L.* در ترکیب BAP با NAA بدست آمد. آنها در تحقیق خود بیان داشتند که غلظت‌های پایین NAA در ترکیب با BAP یک تأثیر سینرژیک بر روی افزایش واکنش‌های مورفوژنتیک شاخه می‌گذارد. در تحقیق حاضر هم نتیجه مشابه به دست آمد و ترکیب BAP با اکسین NAA تأثیر مثبتی بر شاخه‌زایی داشته است. غالبیت سایتوکینین BAP در توان باززایی و تولید و تکثیر شاخه (Rathore et al., 2008) و همچنین از لحاظ بیولوژیکی، نسبت به سایتوکینین Kin در اغلب گونه‌های چوبی اعلام شده است. در صورتی که در تحقیق حاضر هورمون Kin از دو هورمون استفاده شده دیگر، واکنش بهتری نشان داد و هم در توان تولید و هم در تکثیر و تعداد شاخه‌زایی تأثیر بالاتری داشت. در این تحقیق با افزایش غلظت Kin، باززایی و توانایی در تولید و تکثیر شاخه، افزایش پیدا کرد. در تحقیقی Sanatombi و Sharma (۲۰۰۷) نیز در تحقیق خود بر روی گونه *Capsicum frutescens L.* به همین نتیجه دست یافتند. بررسی تأثیر دو اکسین IBA و NAA در غلظت‌های متفاوت بر روی ریشه‌زایی شاخه‌های ایجاد شده نشان داد که مقادیر استفاده شده در دو هورمون تفاوت معنی‌دار ($P < 0/01$) با یکدیگر داشته، اما تأثیر دو هورمون با هم اختلاف داشتند (جدول ۳). به طوریکه هورمون IBA در تولید ریشه از هورمون NAA مؤثرتر بود. هورمون IBA به طور گسترده به منظور ریشه‌زایی گیاهانی که به سختی ریشه‌دار شده و معمولاً در گونه‌های چوبی به‌کار برده می‌شود (Rathore et al.,

هورمون دیگر مؤثرتر بود. هورمون TDZ در مقایسه با هورمون BAP توان باززایی بالاتر داشت، اما در تکثیر و تولید شاخه به خوبی عمل نکرده و شاخه‌های تولید شده توسط این هورمون شاخه‌های نرمالی نبودند. در گزارش‌های متعددی آورده شده که TDZ در تشکیل شاخه بعضی از گونه‌ها به‌ویژه گونه‌های چوبی مؤثر می‌باشد (Lu, 2002)، از جمله گونه *Ziziphus jujube* (Feng et al., 2010) و *Cotoneaster wilsonii* (Sivanesan et al., 2010)، به‌طوری که نتیجه این مطالعه نیز با این یافته‌ها مشابه بود. TDZ محرک سنتز و انباشتگی بازهای پورین است. علاوه بر آن متابولیسم سایتوکینین را تغییر داده و موجب افزایش سطح سایتوکینین درونی به وسیله بازدارندگی عملکرد سایتوکینین اکسیداز خواهد شد (et al., 1998). در مطالعه حاضر همانطور که بیان شد، توان باززایی کالوس‌ها در حضور هورمون TDZ بالا بود، اما شاخه‌های تولید شده توسط این هورمون کوتاه و بی‌شکل بودند (شکل ۴-۴). گزارش مشابه با این نتیجه، در تحقیق Al-Wasel و همکاران (۲۰۰۰) بر روی گونه *Acacia seyal Del* اعلام شد. هورمون BAP نقش کلیدی در باززایی شاخه در شرایط این ویترو ایفا می‌کند (Xu et al., 2008). اضافه کردن BAP می‌تواند غالبیت انتهایی را به سمت جوانه جانبی هدایت کند، که این پدیده منجر به تقسیم سلولی در سلول‌های مرستمی در جوانه و افزایش تعداد شاخه شده و سرعت تقسیم سلولی در جوانه‌های جانبی را افزایش می‌دهد (Gomez-Leyva et al., 2008). در این تحقیق همانطور که در بالا ذکر شد، براساس نتایج بدست آمده، مشخص شد که غلظت‌های پایین BAP تأثیر بیشتری در تولید شاخه دارد. این نتیجه با یافته‌های تحقیقی که توسط Al-Sulaiman و Barakat &

شاخه‌های نرمال و خوبی تولید کرد. در مرحله ریشه‌زایی نیز مؤثرترین اکسین در ریشه‌زایی، هم از نظر تولید و هم از نظر تعداد ریشه، IBA شناخته شد. با توجه به منابع موجود تحقیق حاضر، اولین گزارش دستورالعمل کامل به منظور تولید کالوس از ریزنمونه برگ گونه کنار و باززایی و تولید نهال کامل از این گونه محسوب می‌شود. بافت کالوس عمدتاً به‌عنوان بافت هدف برای دستکاری ژنتیکی استفاده می‌شود و تشکیل کالوس برای باززایی بافت‌های تراریخت لازم است. در مرحله بعد سیستم باززایی از کالوس است که دستورالعمل تکثیر گیاه برای این گونه را به وجود می‌آورد. این دستورالعمل، نه تنها برای مطالعه و تحقیقات بیشتر بر روی این گونه از قبیل تغییر ژنتیکی از طریق آگروباکتریوم یا مطالعه ترکیب پروتوپلاست مفید است، بلکه برای نهالستانهای تجاری نیز کاربرد دارد. این نهالستان‌ها با استفاده از این دستورالعمل از گیاهان بدون ویروس استفاده می‌کنند که نیاز به آفت‌کش‌ها و عملیات کشاورزی را کاهش می‌دهد و باعث افزایش در کمیت و کیفیت محصول می‌شود.

سپاسگزاری

در این بررسی از حمایت‌های بی‌دریغ و راهنمایی‌های ارزشمند سرکار خانم مهندس سکینه کیانی سوادکوهی بهره‌مند شدم. ایشان علاوه بر ابراز نظرات علمی و دقیق، همکاری بی‌دریغی در تحلیل داده‌ها داشتند. بنابراین از ایشان تشکر و قدردانی می‌شود.

در تحقیقات دیگری که بر روی همین گونه انجام شد، تأثیر هورمون IBA بر ریشه‌زایی نسبت به سایر اکسین‌ها بیشتر بود (Assareh & Sardabi, 2005; Al-Sulaiman & Barakat, 2010). نتایج نشان داد که غلظت ۱ میلی‌گرم در لیتر هورمون IBA در تولید ریشه تأثیر زیادی داشت، در صورتی‌که کمتر از این مقدار (۰/۵ میلی‌گرم در لیتر) و بیشتر از این مقدار (۲ میلی‌گرم در لیتر) کاهش تولید و تعداد ریشه را به همراه داشت. همینطور Khalafalla و همکاران (۲۰۱۰) در مطالعه خود دریافتند که غلظت ۱ میلی‌گرم در لیتر از هورمون IBA در افزایش تعداد ریشه و غلظت ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر آن بر افزایش طول ریشه مؤثر است. همچنین Singhi و Tiwari (2010) در تحقیق خود به اثر بازدارندگی IBA در غلظت‌های بالا (۲ میلی‌گرم به بالا) پی بردند. کاهش مقدار نمک‌های معدنی موجود در محیط‌کشت، مرحله انتقال به خاک و سازگاری ریشه را راحت‌تر می‌کند (Dalal & Rai, 2004). تأثیر کاهش نمک و ساکارز در مرحله ریشه‌زایی در گزارش متعددی بیان شده است (Nagori & Purohit, 2004). بر همین اساس در تحقیق حاضر نیز از محیط‌کشت MS ۱/۲ به منظور ریشه‌زایی استفاده شد و نتایج مطلوبی مشاهده بدست آمد.

نتیجه‌گیری کلی

در مرحله کالوس‌زایی از بین ۴ هورمون استفاده شده، TDZ در همه غلظتها و 2,4-D در غلظتهای پایین، مؤثرترین و بهترین هورمون برای تولید کالوس بودند. از سوی دیگر در مرحله باززایی از کالوسهای تولید شده بهترین نتیجه در باززایی توسط هورمون Kin مشاهده شد، زیرا که هورمون Kin در تمامی غلظتهای مورد استفاده،

منابع مورد استفاده

- Khalafalla, M.M., Elaleem, K.G. and Modawi, R.S., 2010. Callus formation and organogenesis of potato (*Solanum tuberosum* L.) Cultivar almera. *Journal of Phytology*, 2: 40–46.
- Kumar, N., Anand, K.G.V. and Reddy M.P., 2011. *In vitro* regeneration from petiole explants of non-toxic *Jatropha curcas*. *Industrial Crops Product*, 33: 146–151.
- Lu, M.C., 2002. Micropropagation of *Morus latifolia* Poilet using axillary buds from mature trees. *Scientia Horticulturae*, 96: 329–34.
- Maliti, C.M., Basile, D.V. and Corpe, W.A., 2005. Effects of *Methylobacterium* spp. Strains on rice *Oryza sativa* L. callus induction, plantlet regeneration, and seedlings growth. *In vitro Journal Torrey Botany Society*, 132: 355–367.
- Mamun, A.N.K., Islam, R., Reza, M.A. and Joadar, O.I., 1996. *In vitro* differentiation of plantlet of tissue culture of *Samanea saman*. *Plant Tissue Culture*, 6: 1-5.
- Meiners, J., Schwab, M. and Szankowski, I., 2007. Efficient *in vitro* regeneration systems for *Vaccinium* species. *Plant Cell Tissue Organ Culture*, 89:169–176.
- Mungole, A., Awati, R., Dey, S., Chaturvedi, A. and Zanwar, P., 2009. *In vitro* callus induction and shoot regeneration in *Ipomoea obscura* (L.): Potent Indian medicinal plant. *Indian Journal Science Technology*, 2: 24-26.
- Murthy, B.N.S., Murch, S.J. and Saxena, P.K., 1998. Thidiazuron: a potent regulator of *in vitro* plant morphogenesis. *In vitro Cellular and developmental Biology-plant*, 34: 267-275.
- Nagori, R. and Purohit, S.D., 2004. *In vitro* plantlet regeneration in *Annona squamosa* through direct shoot bud differentiation on hypocotyl segments. *Scientia Horticulturae*, 99: 89–98.
- Rathore, J.S., Rathore, M.S., Singh, M., Singh, R.P. and Shekhawat, N.S., 2007. Micropropagation of mature tree of *Citrus limon*. *Indian Journal of Bbiotechnology*, 6:239-244.
- Sadeghi, S.M. and Farar, N., 2002. Konar, value and user. Promote management and popular participation of Agriculture Jahad Organization of the Bushehr. *Journal of Promotional*, 20 p.
- Sanatombi, K. and Sharma, G.J., 2007. Micropropagation of *Capsicum frutescens* L. using axillary shoot explants. *Scientia Horticulturae*, 113: 96–99.
- Sharma, S., Kumar, N. and Reddy, M.P., 2011. Regeneration in *Jatropha curcas*: Factors affecting the efficiency of *in vitro* regeneration. *Industrial Crops Product*, 34: 943-951.
- Singh, J. and Tiwari, K.N., 2010. High-frequency *in vitro* multiplication system for commercial
- Aea, M., Rha, E.W. and Ma, H., 1998. Batanouny atanouny, phenology, germination and propagation of some wild trees and shrubs in south sinai, Egypt. *Egypt Journal Botany*, 36:91-107.
- Ahmad, N., Faisal, M., Anis, M. and Aref, I.F., 2010. *In vitro* callus induction and plant regeneration from leaf explants of *Ruta graveolens* L. *South African Journal of Botany*, 76: 597–600.
- Al-Sulaiman, M.A. and Barakat, M.N., 2010. *In vitro* shoot multiplication of *Ziziphus spina-christi* by shoot tip culture. *African Journal of Biotechnology*, 9: 850-857.
- Al-Wasel, A.S., 2000. Micropropagation of *Acacia seyal* Del. *in vitro*. *Journal of Arid Environments*, 46: 425–431.
- Arefi, H., Norouzi, M., and Bagheri, N.A., 2003. An investigation of callus induction and regeneration of rice genotypes (*Oryza sativa* L.) by anther culture. *Iranian Journal Agriculture Science*, 35: 293-299.
- Assareh, M.H. and Sabaghzade, F., 2001. *In vitro* somatic propagation of *Ziziphus spina christti* (L.) Willd via tissue culture. *Journal of Research and Construction*, 55:19-23.
- Assareh M.H. and Sardabi H., 2005. Macropropagation and micropropagation of *Ziziphus spina-christi*. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 5:459-465.
- Bagheri, N.A., BabaeianJelodar, N.A. and Ghanbari, A., 2008. Diallel analysis study of yield and yield-related traits in rice genotypes. *International Journal of Agricultural Research*, 3: 386-396.
- Castillo, A.M., Egana, B., Sanz, J.M. and Cistue, L., 1998. Somatic embryogenesis and plant regeneration from barley cultivars grown in Spain. *Plant Cell Report*, 17: 902-906.
- Chitra, S. and Anander Kumar, C.R., 2006. Plant regeneration from scutellum-derived callus of Assam rice collection (*Oryza sativa* L.). *Madras Agricultural Journal*, 93: 73-75.
- Dalal, N.V. and Rai, V.R., 2004. *In vitro* propagation of *Oroxylum indicum* Vent. a medicinally important forest tree. *Journal for Research*, 9:61–65.
- Feng, J.C., Yu, X.M., Shang, X.L., Li, J.D. and Wu, Y.X., 2010. Factors influencing efficiency of shoot regeneration in *Ziziphus jujuba* Mill. 'Huizao'. *Plant Cell Tissue Organ Culture*, 101:111–117.
- Gomez-Leyva, J.F., Martinez-Acosta, L.A., Lopez-Muraira, I.G., Silos-Espino, H., Ramirez-Cervantes, F. and Andrade-Gonzalez, I., 2008. Multiple shoot regeneration of roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) from a shoot apex culture system. *International Journal of Botany*, 4: 326–330.

- Xiaojia, G., Zhaohui, C., Yongjun, L. and Shiping, W., 2006. A tissue culture system for different germplasms of indica rice. *Plant Cell Report*, 25: 392-402.
- 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 stemdisc of Chinese jiaotou (*Allium chinense*) and *in vitro* bulblet formation. *Acta Physiologiae Plantarum*, 40: 521-528.
- propagation of pharmaceutically important *Clitoria ternatea* L., A valuable medicinal plant. *Industrial Crops and Products*, 32: 534-538.
- Sivanesan, I., Song, J.Y., Hwang, S.J. and Jeong, B.R., 2010. Micropropagation of *Cotoneaster wilsonii* Nakai, a rare endemic ornamental plant. *Plant Cell Tissue Organ Culture*. DOI 10.1007/s11240-010-9841-2.
- Sohail, M., Saied, A.S., Gebauer, J. and Buerkert, A., 2009. Effect of NaCl salinity on growth and mineral composition of *Ziziphus spina-christi* (L.) Willd. *Journal Agriculture Rural Development Tropical and Subtropics*, 110:107-114.
- Sudhersan, C. and Hussain, J., 2003. *In vitro* Clonal Propagation of a Multipurpose Tree, *Ziziphus spina Christi* (L.) Desf. *Turkish Journal Botany*, 27:167-171.

***In vitro* somatic propagation of *Ziziphus spina christii* (L.) Willd via indirect regeneration from leaf explants**

E. Ahmadi^{1*}, S.M. Hosseini Nasr², H. Jalilvand³ and H. Salehian Aghblaq⁴

1* - Corresponding author, M.Sc., College of Natural Resources, Sari Agricultural Science and Natural Resources University, Sari, I.R.Iran, Email: Ahmadi_silva@yahoo.com

2- Asist. Prof., College of Natural Resources, Sari Agricultural Science and Natural Resources University, Sari, I.R.Iran.

3- Assoc. Prof., College of Natural Resources, Sari Agricultural Science and Natural Resources University, Sari, I.R.Iran.

4- M.Sc., College of Crop Science, Sari Agricultural Science and Natural Resources University, Sari, I.R.Iran.

Received: 21.02.2012

Accepted: 01.07.2012

Abstract

Regarding cross-pollination and a wide range of genetic variation in *Ziziphus spina christii* (L.) populations, vegetative propagation through tissue culture techniques is necessary to reproduce the elite single plants. In this study effects of different levels of growth regulators on callogenesis and regeneration capabilities of callus of leaf explants of the species were evaluated. Leaf explants of aseptic seedlings were cultured on MS medium containing 2, 4-D, NAA, TDZ and BAP levels (0.5, 1 and 2 mg/l). MS medium with different levels of BAP, TDZ and Kin (1, 3 and 5 mg / liter) was used for regeneration. Rooting process was done on 1/2MS medium with different levels of IBA and NAA levels (0.5, 1 and 2 mg /l). Results showed that the medium containing 2, 4-D and TDZ at concentrations of 0.5 and 1 mg/l ($x=10$) had the highest rate of callus induction. Kin treatments (5 mg/l) and TDZ (1 mg/l) with averages of 8.84 and 8.95 had the highest rate of shoot production, but the shoot produced by TDZ treatments had an unusual shape, whereas, Kin treatments, produced normal shoots. Average rooting on IBA was higher than NAA treatments on all concentrations. One mg/l IBA showed the highest rate of rooting capability compared to the other treatments.

Key words: Tissue culture, Regeneration, Cytokinin, Auxine, Callus, *Ziziphus spina christii*.