Archive of SID

دو فصلنامه علمی-پژوهشی تحقیقات ژنتیک و اصلاح گیاهان مرتعی و جنگلی ایران
جلد ۲۵، شماره ۱، صفحه ۱۵۹-۱۴۸ (۱۳۹۶)

مطالعه اثرات ترکیب محیط‌کشت و نوع ریزنمونه در بهینه‌سازی کشت خارشتر (*Alhagi camelorum* F.)

حسین مرکی[۱]*، عادل سپهری[۲] و علی جعفری مفیدآبادی[۳]

۱* - نویسنده مسئول مکاتبات، دانشجوی کارشناسی ارشد، مرتع‌داری، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان
پست الکترونیک: hosseinmaraki@yahoo.com

۲ - استاد، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

۳ - دانشیار، مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، گرگان

تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۱۱/۱۱ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۵/۰۳/۳۱

چکیده

خارشتر (*Alhagi camelorum* F.) گیاهی است از خانواده بقولات که سازگاری خوبی با شرایط آب و هوایی مناطق خشک دارد. به دلیل پروتئین قابل هضم بالا، همچنین امکان بهره‌برداری ترنجبین از ساقه‌های آن و سازگاری با شرایط سخت زیست‌محیطی به عنوان یکی از گونه‌های مهم مرتعی و دارویی محسوب می‌شود. تکثیر این گونه در طبیعت توسط بذر و ریزوم انجام می‌شود، ولی بذر آن برای جوانه‌زنی دارای مشکل است. هدف این تحقیق، بررسی تأثیر غلظت‌های مختلف ساکارز در ریزازدیادی گیاه خارشتر از طریق کشت تخمدان و جنین بذری برای بهبود تکثیر آن می‌باشد. برای این هدف، با جداسازی جنین از تخمدان و همچنین حذف پوسته بذر (جنین‌بذری)، ریزنمونه‌ها در محیط‌کشت MS حاوی غلظت‌های ۰، ۱۵، ۳۰، ۴۵ و ۶۰ گرم در لیتر ساکارز برای بررسی جوانه‌زنی و تکثیر کشت شدند. درصد جوانه‌زنی و سایر صفات رشد گیاهچه طی چهار هفته بررسی شد. نتایج نشان داد که بین دو ریزنمونه در میزان درصد جوانه‌زنی و طول گیاهچه اختلاف معنی‌دار وجود داشت و درصد جوانه‌زنی جنین‌بذری در مقایسه با تخمدان به‌طور معنی‌داری ($P<0.01$) بیشتر بود. بیشترین درصد جوانه‌زنی جنین بذری (۹۳/۳ درصد) در تیمار ۱۵ گرم در لیتر ساکارز به‌دست آمد که با مقایسه با سایر غلظت‌های ساکارز اختلاف معنی‌دار و مثبت داشت. با افزایش غلظت ساکارز تا ۱۵ گرم بر لیتر سایر صفات رشد جنین مانند طول ریشه‌چه، طول ساقه‌چه و همچنین شاخص بنیه افزایش یافت. البته غلظت‌های بیشتر از ۱۵ گرم در لیتر ساکارز در تمامی صفات اندازه‌گیری شده جنین اثر منفی داشت.

واژه‌های کلیدی: جنین، ساکارز، خارشتر، کشت تخمدان

مقدمه

گیاه خارشتر با نام علمی (*Alhagi camelorum* F.) متعلق به خانواده پروانه‌واران (*Fabaceae*) است (Ali, 1977). خارشتر گیاهی چند ساله و پایاست. شکل رویشی آن به‌صورت بوته‌ای، نیمه‌درختچه‌ای و نیمه‌چوبی است. ارتفاع این گیاه اغلب ۵۰ تا ۸۰ و در مواردی نیز به ۱۵۰ سانتی‌متر می‌رسد. ترنجبین حاصل از گیاه خارشتر یکی از فراورده‌های مورد مصرف در داروسازی و طب‌سنتی

www.SID.ir

Archive of SID

است و امکان صادرات آن به خارج از کشور هم وجود دارد. با توجه به پراکندگی وسیع خارشتر در سطح مراتع خشک و نیمه‌خشک و بهره‌برداری ترنجبین از آن در مناطق مرکزی و جنوب خراسان، شمال سیستان و بلوچستان، زرند و طبس، یکی از گونه‌های مهم علوفه‌ای، صنعتی و دارویی محسوب می‌شود (Samsam-Shariat, 1992). عصاره حاصل از خارشتر در درمان فشارهای سخت سوء هاضمه و اسهال خونی، مشکلات شکم و تب استفاده می‌شود (Khan, Marwat *et al.*, 2008; 2009). از این گیاه همچنین به‌عنوان ملین، ادرارآور و خلط‌آور استفاده می‌شود و تزریق آن معرق است (Varshney & Singh, 2008). گیاه خارشتر با وجود خواص فراوان و مقاومت بالای آن به شرایط نامساعد آب و هوایی و خاکی با محدودیت تکثیر از طریق بذر مواجه است. در تحقیقی Bazoobandi و همکاران (۲۰۰۶) پوسته سخت بذر را عامل جوانه‌زنی کم این گیاه معرفی کردند. از طرف دیگر تقاضا برای مصرف ترکیبات و داروهای گیاهی افزایش یافته است اما بسیاری از این گیاهان، زیستگاه‌های طبیعی محدود دارند. با توجه به شرایط محیطی و جغرافیایی محل رویش گیاه، جمع‌آوری آنها با مشکلاتی مواجه است. غلظت پایین مواد مؤثره و ترکیبات دارویی در گیاه، محدودیت منابع طبیعی، تخریب روزافزون جنگل‌ها و مراتع، نابودی گونه‌های متنوع گیاهی را نشان داده است. از این‌رو توجه محققان را به استفاده از راهکارهای فناوری‌زیستی برای افزایش تولید و بهره‌وری از این گیاه معطوف کرده است. فناوری‌زیستی با بهره‌گیری از علوم مختلف مانند بیولوژی، بیوشیمی، ژنتیک و با استفاده از راه‌کارهای کشت سلول، کشت اندام‌ها و بافت‌ها، مهندسی ژنتیک، نشانگرهای مولکولی، بررسی مسیرهای مؤثر در تولید و افزایش بیان ژن برای ایجاد تغییرات ژنتیکی قادر است کارآیی گیاهان را به‌عنوان منابع تجدیدپذیر برای تولید دارو افزایش دهد (Kumar & Gupta, 2008). درحال حاضر کشت بافت و به‌ویژه ریزازدیادی یکی از گسترده‌ترین کاربردهای فناوری زیستی است. کشت بافت و ریزازدیادی مهمترین تکنیک استفاده شده برای تکثیر سریع در شرایط درون‌شیشه‌ای است. به‌منظور جلوگیری از سقط جنین می‌توان از فن کشت جنین بهره جست (Ivanica & Mokra, 1982). گزارش‌های زیادی وجود دارد که نشان می‌دهد آزاد شدن جنین از پوسته و لپه‌ها در به حداقل رساندن دوره خواب بذر و تکثیر گیاه در کوتاه مدت نقش مهمی دارد. به‌عنوان مثال Jafari Mofidabadi (۲۰۱۵) موفق به تولید دورگه‌هایی بین گونه‌هایی از صنوبر و تکثیر درون شیشه آنها از طریق کشت جنین بالغ شد، همچنین Emam و همکاران (۲۰۱۳) به‌منظور ریزازدیادی بادام و تولید سریع‌تر گیاهچه، کشت جنین در محیط کشت MS را موفقیت‌آمیز گزارش کردند. Naraghi (۲۰۱۴) برای کاهش خفتگی و سرعت بخشیدن به سبز شدن بذرهای سرخدار (*Taxus baccata*)، تکثیر درون شیشه آن را مورد استفاده قرار داد. براساس نتایج به‌دست آمده، کشت جنین در ریزازدیادی موفقیت‌آمیز و مثبت ارزیابی شد و ۶۵ درصد از جنین‌ها جوانه زدند و دانه‌رست‌ها تشکیل شدند. در بررسی انجام شده در گونه *Areca catechu* توسط Liyun و همکاران (۲۰۱۲) جنین این گیاه در محیط کشت حاوی غلظت‌های مختلف ساکارز و کربن فعال کشت شد. با توجه به نتایج تحقیق آنها بیشترین میزان جوانه‌زنی و طول ریشه در محیط کشت MS حاوی ۴ گرم در لیتر کربن فعال به‌همراه ۴۰ گرم در لیتر ساکارز اتفاق افتاد و ترکیب فوق را به‌عنوان بهترین فرمول برای تکثیر این گیاه معرفی کردند.

در تحقیقی Sanchez-Zamora و همکاران (۲۰۰۶) موفق به جوانه‌دار کردن جنین گردو (*Juglans regia* L.) در شرایط این‌ویترو شدند. جوانه‌زنی سریع جنین‌های *Leymus chinensis* از خانواده گرامینه که دارای خواب بذر بالایی هستند روی محیط کشت MS توسط Liu و همکاران (۲۰۰۴) گزارش شده است. در پژوهشی Mohan و همکاران (۲۰۱۱) نیز موفق به جوانه‌دار کردن بذر و کشت جنین جاتروفا (*Jatropha curcas* L.) در شرایط این‌ویترو شدند.

از عوامل مؤثر در موفقیت در کشت جنین، ترکیب محیط کشت است. شرایط ویژه محیط‌های کشت مانند میزان تراکم

www.SID.ir

Archive of SID

سلول‌ها و فشار اسمزی درون آنها، که قسمتی تحت تأثیر میزان قند موجود در محیط کشت می‌باشند، نیز می‌تواند بر تکثیر درون شیشه‌ای ریزنمونه اثر تحریک‌کننده داشته باشد. از طرف دیگر با توجه به اینکه ریزنمونه‌های مورد کشت پس از جدا شدن از گیاه مادری، دیگر خودساز نیستند، از این‌رو کربوهیدرات‌های موجود در محیط‌کشت (به‌ویژه ساکارز و مالتوز) اهمیت خاصی پیدا کرده‌اند. همچنین نوع کربوهیدراتی که در ترکیب محیط‌های کشت بافت به‌کار می‌رود تنها عامل تعیین کننده نیست، بلکه مقدار و غلظت این مواد نیز می‌تواند اثرات عمیقی بر چگونگی رشد مواد گیاهی موجود و رفتار آنها از لحاظ جنین‌زایی رویشی داشته باشد (Merkle *et al*., 1995; Arnold, 1987). در این زمینه Litz (۱۹۸۶) بیان کرد که غلظت‌های بالاتر کربوهیدرات‌ها موجب تحریک جنین‌زایی می‌شود. بنابراین افزودن کربوهیدرات‌ها به محیط کشت از اهمیت خاصی برخوردار است. نوع، مقدار و غلظت کربوهیدرات محیط کشت می‌تواند بر چگونگی رشد ریزنمونه‌ها و رفتار آنها از لحاظ رشد جنین اثر داشته باشد (Gram *et al*., 1996؛ Rodriguez *et al*., 2000؛ Kim *et al*., 2004؛ Majd *et al*., 2006؛ Burrell *et al*., 2006). بنابراین به‌نظر می‌رسد غلظت ساکارز محیط کشت علاوه بر نوع گیاه، تابع اندامی که نمونه از آن گرفته شده است نیز می‌باشد (Takamura & Miyajima, 1997). در بررسی کشت جنین گیاه نوروزک در محیط MS حاوی غلظت ۳۰ گرم در لیتر ساکارز به‌همراه هورمون‌های گیاهی، Modares و همکاران (۲۰۱۴) گزارش کردند که در اغلب تیمارها، ریشه‌چه پس از گذشت ۲۴ ساعت از زمان کشت شروع به رشد کرد و سرعت بالایی داشت. تحقیقات Rai و همکاران (۲۰۰۷) نشان داد که استفاده نکردن از ساکارز در محیط جنین‌زای گواوا، باعث جلوگیری از تشکیل جنین رویشی می‌شود. همچنین Jafari Mofidabadi و Modir-Rahmati (۲۰۰۰) گزارش کردند که در محیط کشت MS حاوی ۳۰ گرم در لیتر ساکارز بیشترین جوانه‌زنی جنین صنوبر حاصل شد. استفاده از ساکارز نسبت به گلوکز اثر تحریک‌کنندگی بیشتری روی توسعه جنین رویشی گل سرخ داشت (Burrell *et al*., 2006). محققان مختلف در گل سرخ (Kim *et al*., 2004) و در کاج اروکاریا (*Araucaria excels*) (Majd *et al*., 2006; Guerra *et al*., 2000) مقدار ۲ تا ۳ درصد ساکارز را برای جوانه‌زنی و تکامل جنین مناسب ارزیابی کردند. در بررسی جنین‌زایی رویشی دو رقم گوجه‌فرنگی در محیط‌های مختلف کشت بافت، Zirkouhi Piri و همکاران (۲۰۰۹) تأثیر غلظت‌های ۱۰، ۲۰، ۳۰ و ۴۰ گرم در لیتر ساکارز را مورد بررسی قرار دادند، نتایج این بررسی نشان داد که غلظت‌های مختلف ساکارز بر میزان جنین‌زایی تأثیر معنی‌داری داشت و ۲۰ گرم در لیتر را مناسب‌ترین غلظت ساکارز در محیط کشت اعلام کردند. به‌طوری که در غلظت‌های بالاتر ساکارز، این پدیده کاهش یافت. در مطالعات دیگری که توسط دیگر محققان انجام شد، به این نکته اشاره شده است که همیشه غلظت‌های بالاتر هیدرات‌های کربن مانند ساکارز، موجب افزایش جنین‌زایی رویشی نمی‌شود. به‌طور مثال Arnold (۱۹۸۷) ثابت کرد که شروع جنین‌زایی رویشی در کشت درخت نوئل در غلظت ۱ درصد ساکارز بهتر از غلظت‌های بالاتر آن می‌باشد. در تحقیقی که توسط Calagari و همکاران (۲۰۰۴) برای دورگ‌گیری در صنوبر پده با استفاده از روش درون شیشه‌ای نجات رویان انجام شد، از ۲ غلظت ۲۰ و ۳۰ گرم در لیتر ساکارز در محیط کشت‌های MS و ۱/۲MS برای بررسی جوانه‌زنی و تولید گیاهچه استفاده کردند. در پژوهشی دیگر Karami و همکاران (۲۰۰۹) اثر غلظت‌های ۱۵، ۳۰، ۶۰، ۹۰ و ۱۲۰ گرم در لیتر ساکارز، مالتوز، گلوکز و فروکتوز را در محیط کشت MS، بر روی تشکیل پینه، تشکیل رویان و جوانه‌زنی میخک (*Dianthus caryophyllus* L.) مورد بررسی قرار دادند که بیشترین فراوانی تشکیل پینه در محیط کشت MS حاوی ۹۰ گرم در لیتر ساکارز حاصل شد؛ رویان‌های توسعه‌یافته در غلظت‌های ۱۵ و ۳۰ گرم ساکارز، غیر نرمال و در غلظت‌های ۶۰، ۹۰ و ۱۲۰ گرم ساکارز نرمال بودند و حداکثر میزان جوانه‌زنی در محیط کشت حاوی ۳۰ گرم در لیتر ساکارز به‌دست‌آمد و در نهایت مشخص شد که ساکارز

www.SID.ir

Archive of SID

تنها قندی است که با وجود آن پینه‌زایی رویان انجام شد. با توجه به اهمیت مرتعی، دارویی و صنعتی گیاه خارشتر استفاده از روش‌های کشت بافت، مهندسی ژنتیک و بیوتکنولوژی برای اصلاح، حفظ ژرم‌پلاسم و افزایش تولید این گونه ضروری به‌نظر می‌رسد و از آن‌جایی که جوانه‌زنی مستقیم جنین بدون عبور از مرحله کال‌زایی از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است، در این تحقیق تلاش شد با به‌کارگیری محیط کشت و تنظیم مواد غذایی و ترکیبات موجود در آن، کشت درون شیشه‌ای جنین گیاه خارشتر بهینه‌سازی گردد تا علاوه بر تکثیر آن راه برای تحقیقات بیوتکنولوژی در این گیاه هموار شود.

مواد و روش‌ها

انتخاب بهترین زمان برداشت نمونه

برای انجام آزمایش‌های مربوط به کشت جنین با بررسی مراحل فنولوژی گیاه، کشت تخمدان در اوایل مردادماه و ۱۴ روز پس از گرده‌افشانی گیاه و کشت جنین در اوایل شهریورماه با رسیدن بذرها انجام شد.

کشت تخمدان

برای کشت تخمدان به‌مدت دو هفته بعد از آغاز گرده‌افشانی گل‌ها، با جداسازی تخمدان‌ها از پایه مادری اقدام به کشت شد. روش کار به این صورت بود که جنین‌های ۱۴ روزه از داخل تخمدان گیاه توسط اسکالپل در شرایط سترون و زیر هود لامینار خارج و در شرایط ایزوله درون محیط کشت MS، (Murashige & Skooge, 1992) با مقادیر متفاوتی از ساکارز (۰، ۱۵، ۳۰، ۴۵ و ۶۰ گرم در لیتر ساکارز) و فاقد هورمون گیاهی کشت شدند. برای کشت جنین‌های جداشده از تخمدان، از لوله‌های آزمایش استفاده شد و در هر لوله آزمایش یک عدد جنین کشت شد. پس از چهار هفته، تعداد جنین‌های جوانه‌زده شمارش شدند. همه محیط‌های کشت در شرایط محیطی ۲ $\pm$ ۲۶ درجه سانتی‌گراد در اتاق رشد با روشنایی دائم (۲۰۰۰ لوکس) نگهداری شدند. اسیدیته (pH) همه لوله‌های کشت پس از اتوکلاو روی ۵/۸ تنظیم شد و برای جامد شدن محیط کشت از آگار به‌میزان ۷ گرم در لیتر استفاده شد. مشاهده نمونه‌ها پس از انجام آزمایش، به فاصله زمانی هر ۳ روز یکبار انجام شد و تغییرات مورفولوژیکی شامل خروج ریشه‌چه و ساقه‌چه ثبت شد و درصد رویان‌های رشد کرده، طول اندام هوایی، طول ریشه، شاخص بنیه و سرعت جوانه‌زنی مورد ارزیابی قرار گرفت.

کشت جنین بذری

به‌منظور کشت جنین بذری نیز پس از کامل شدن مرحله بذردهی، بذرهای رسیده جمع‌آوری شدند. بذرهای جمع‌آوری شده پس از جداسازی غلاف روی آنها ضدعفونی شدند. بذرها با استفاده از الکل ۷۰ درصد به‌مدت ۳۰ ثانیه شسته شده و در محلول وایتکس ۶۰ درصد به‌مدت ۱۰ دقیقه قرار داده شدند. سپس با شستشو توسط آب مقطر سترون برای کشت آماده شدند. برای ضدعفونی وسایل آزمایش مانند لوله‌های آزمایش، پنس، دستکش و همچنین ضدعفونی محیط کشت آماده شده، آب مقطر سترون و ...، تمامی آنها به‌مدت ۶۰ دقیقه داخل دستگاه اتوکلاو با دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد ضدعفونی شدند. از آن‌جایی که محیط‌کشت نسبت به آلودگی‌ها خیلی حساس است و محلی مناسب برای رشد انواع باکتری و ویروس‌ها می‌باشد؛ پس از آنکه از اتوکلاو بیرون آورده شدند درب لوله‌های آزمایش توسط پلاستیک سلفون محکم شدند و برای انجام مراحل کشت به اتاقک رشد، زیر هود لامینار که هوای سترون تولید می‌کند انتقال داده شدند. برای بررسی جوانه‌زنی، ابتدا پوشش روی بذرها توسط تیمار ۱۵ دقیقه‌ای با اسید سولفوریک ۹۶ حذف شد و بذرهای بدون پوشش (جنین‌های بذری) پس از ضدعفونی مطابق دستورالعمل فوق به محیط کشت MS حاوی غلظت ۰، ۱۵، ۳۰، ۴۵ و ۶۰ گرم در لیتر ساکارز فاقد تنظیم‌کننده رشد منتقل شدند.

آزمایش‌ها در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۵ تکرار و در هر تکرار تعداد ۱۵ عدد لوله آزمایش حاوی جنین (جمعاً ۳۷۵ نمونه) برای هر ریزنمونه، در آزمایشگاه بیوتکنولوژی

www.SID.ir

Archive of SID

مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی گرگان انجام شد و تجزیه‌وتحلیل داده‌ها با نرم‌افزار آماری SPSS انجام شد. مقایسه میانگین‌ها توسط آزمون دانکن در سطح ۵ و ۱ درصد انجام گردید. برای رسم نمودارها از نرم‌افزار Excel استفاده شد.

نتایج

اثر نوع ریزنمونه در جوانه‌زنی

جوانه‌زنی جنین بذری، به‌تدریج و یک هفته بعد از کشت در محیط MS آغاز شد، در حالی که جنین‌هایی که در مرحله رسیدگی تخمدان جدا و در محیط MS کشت شدند، پس از سه هفته از تاریخ کشت شروع به جوانه‌زنی کردند. میزان جوانه‌زنی آنها نسبت به جنین بذری بسیار کمتر بود. نتایج حاصل از تجزیه‌وتحلیل اثرات نوع ریزنمونه در جوانه‌زنی نشان داد که بین نوع ریزنمونه در سطح ۱ درصد ($P\leq ۰/۰۱$) اختلاف معنی‌دار وجود داشت. بیشترین درصد جوانه‌زنی از کشت جنین بذری با میانگین ۸۵/۰۶ درصد حاصل شد و کمترین میزان جوانه‌زنی در کشت تخمدان، با میانگین ۳/۸۴ درصد اتفاق افتاد. در ارزیابی طول گیاه، جنین بذری به‌طور معنی‌داری با تخمدان اختلاف داشت. در کشت جنین بذری بیشترین طول گیاهچه با میزان ۵۸/۴۴ میلی‌متر به‌دست آمد (جدول ۱).

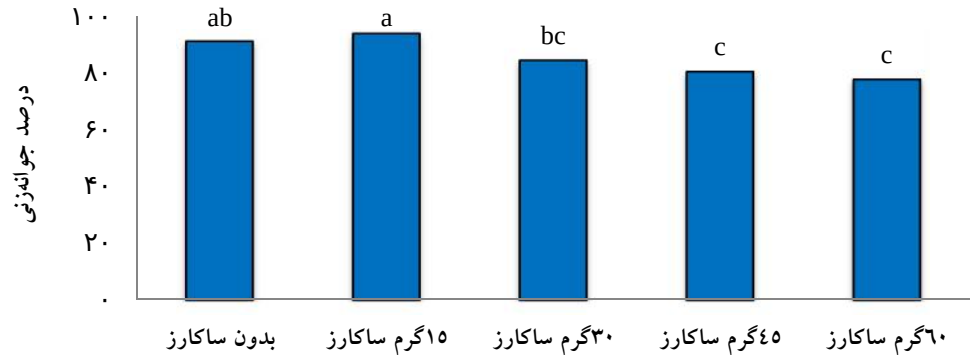
جدول ۱- دسته‌بندی میانگین اثرات ریزنمونه بر درصد جوانه‌زنی و طول گیاهچه

ریزنمونه	درصد جوانه‌زنی	طول گیاهچه (mm)
جنین بذری	**۸۵/۰۶a**	**۵۸/۴۴a**
تخمدان	**۳/۸۴b**	**۲۷/۰۳b**

اختلاف میانگین‌های قرار گرفته در هر ستون با حروف متفاوت با هم معنی‌دار است.

اثرات مقادیر مختلف ساکارز بر درصد جوانه‌زنی

نتایج تجزیه واریانس حاصل از ارزیابی اثرات مقادیر مختلف ساکارز بر روی درصد جوانه‌زنی جنین بیانگر این بود که غلظت‌های مختلف ساکارز در محیط کشت MS بر درصد جوانه‌زنی جنین خارشتر در سطح یک درصد ($P<۰/۰۱$) معنی‌دار بود (جدول ۲). نتایج حاصل از مقایسه میانگین‌ها نشان داد که افزایش میزان ساکارز در محیط کشت به‌طور معنی‌داری باعث کاهش میزان جوانه‌زنی شد. به‌طوری که بیشترین میزان جوانه‌زنی جنین مربوط به تیمار محیط کشت با غلظت ۱۵ گرم در لیتر ساکارز (به میزان ۹۳/۳ درصد) و کمترین میزان جوانه‌زنی مربوط به تیمارهای ۴۵ و ۶۰ گرم در لیتر ساکارز در محیط کشت MS به‌ترتیب با ۸۰ و ۷۷/۳ درصد بود (شکل ۱).



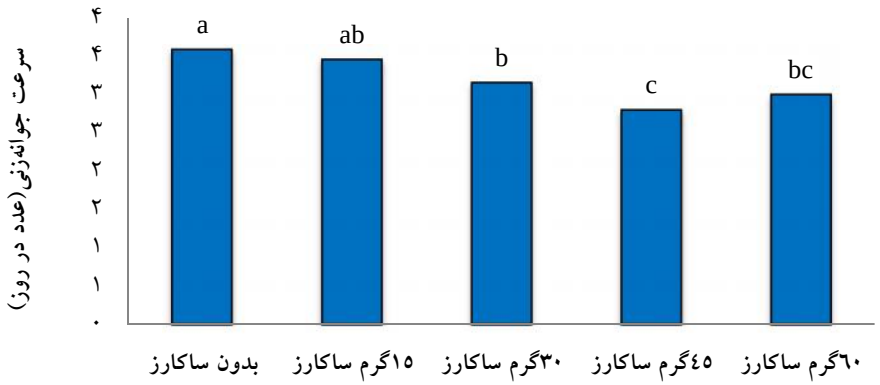
شکل ۱- میانگین درصد جوانه‌زنی خارشتر تحت تیمار جنین گیاه در محیط کشت MS حاوی غلظت‌های مختلف ساکارز

www.SID.ir

Archive of SID

اثرات ساکارز بر سرعت جوانه‌زنی

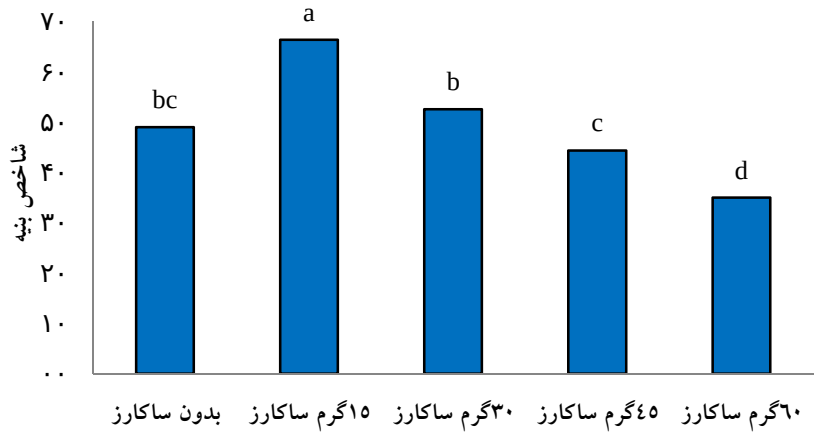
نتایج تجزیه واریانس نشان داد که غلظت‌های مختلف ساکارز در محیط کشت MS بر سرعت جوانه‌زنی جنین خارشتر در سطح یک درصد (P<۰/۰۱) معنی‌دار بود (جدول ۲). براساس دسته‌بندی میانگین‌ها به‌روش دانکن، اختلاف آماری معنی‌داری بین اثر محیط‌های کشت بر روی سرعت جوانه‌زنی وجود داشت. به‌طوری که بیشترین سرعت جوانه‌زنی جنین (۳/۵۷ عدد در روز) مربوط به تیمار جنین در محیط کشت بدون ساکارز و کمترین سرعت جوانه‌زنی در غلظت ۴۵ گرم در لیتر ساکارز در محیط کشت MS به‌میزان ۲/۷۹ عدد در روز حاصل شد (شکل ۲).



شکل ۲- میانگین سرعت جوانه‌زنی جنین در گیاه خارشتر تحت تیمار محیط کشت MS حاوی غلظت‌های مختلف ساکارز

اثر مقادیر مختلف ساکارز بر شاخص بنیه جنین

نتایج تجزیه واریانس نشان داد که بین غلظت‌های مختلف ساکارز در محیط کشت MS بر شاخص بنیه جنین خارشتر در سطح یک درصد (P<۰/۰۱) اختلاف معنی‌دار وجود داشت (جدول ۲). نتایج حاصل از مقایسات میانگین نشان داد که بیشترین میزان بنیه بذر جنین مربوط به غلظت ۱۵ گرم در لیتر ساکارز در محیط کشت MS و کمترین مقدار بنیه بذر مربوط به تیمار محیط کشت MS با غلظت ۶۰ گرم در لیتر ساکارز بود (شکل۳).



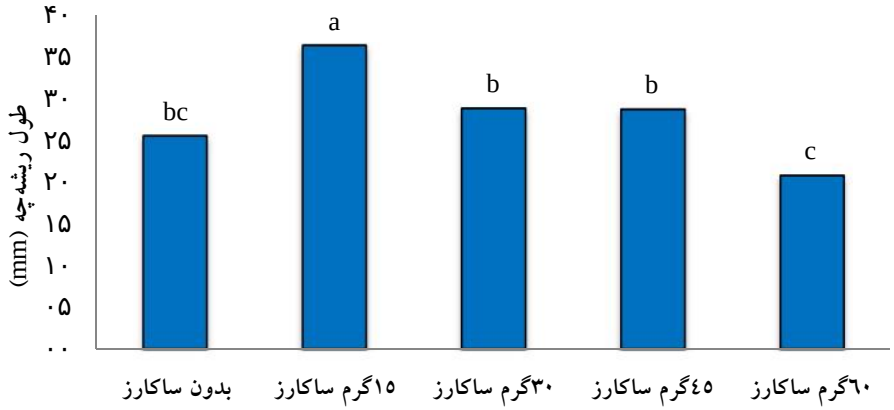
شکل ۳- میانگین شاخص بنیه در گیاه خارشتر تحت تیمار جنین گیاه در محیط کشت MS حاوی غلظت‌های مختلف ساکارز

www.SID.ir

Archive of SID

اثر ساکارز بر شاخص طول ریشه‌چه

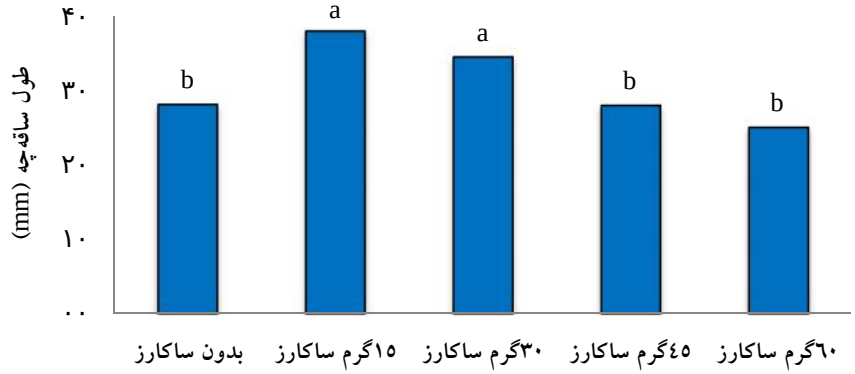
نتایج تجزیه واریانس نشان داد که غلظت‌های مختلف ساکارز در محیط کشت MS بر شاخص طول ریشه‌چه جنین خارشتر تفاوت معنی‌داری در سطح یک‌درصد وجود داشت (جدول ۲). نتایج حاصل از مقایسات میانگین نشان داد که بیشترین میزان طول ریشه‌چه (۳۶/۱۲ میلی‌متر) مربوط به تیمار جنین در غلظت ۱۵ گرم در لیتر ساکارز در محیط کشت MS و کمترین مقدار طول ریشه‌چه (۲۰/۶۴ میلی‌متر) مربوط به تیمار محیط کشت MS با غلظت ۶۰ گرم در لیتر ساکارز بود و بین تیمارهای ۳۰ و ۴۵ گرم در لیتر ساکارز تفاوت معنی‌داری در طول ریشه‌چه وجود نداشت (شکل ۴).



شکل۴- میانگین شاخص طول ریشه‌چه، تحت تیمار جنین خارشتر در محیط کشت MS حاوی غلظت‌های مختلف ساکارز

اثر ساکارز در شاخص طول ساقه‌چه

غلظت‌های مختلف ساکارز در محیط کشت MS بر شاخص طول ساقه‌چه جنین خارشتر در سطح یک‌درصد معنی‌دار بود (جدول ۲). نتایج حاصل از مقایسات میانگین نشان داد که بیشترین میزان طول ساقه‌چه به مقدارهای ۳۷/۸ و ۳۴/۳۶ میلی‌متر به‌ترتیب مربوط به تیمار جنین در غلظت‌های ۱۵ و ۳۰ گرم در لیتر ساکارز در محیط کشت MS و در بین سایر غلظت‌های ساکارز در محیط MS تفاوت معنی‌داری در میزان طول ساقه‌چه وجود نداشت (شکل ۵).



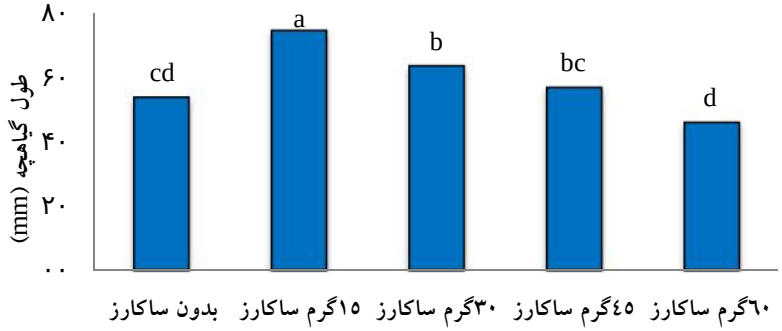
شکل ۵- میانگین شاخص طول ساقه‌چه، تحت تیمار جنین خارشتر در محیط کشت MS حاوی غلظت‌های مختلف ساکارز

www.SID.ir

Archive of SID

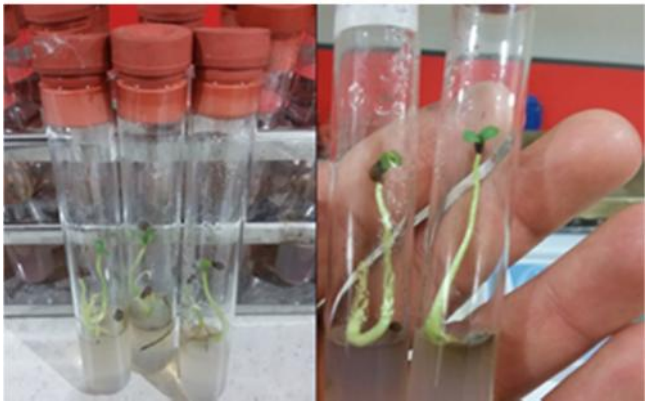
اثر غلظت‌های ساکارز بر طول گیاهچه

غلظت‌های مختلف ساکارز در محیط کشت MS بر شاخص طول گیاهچه خارشتر نیز در سطح یک‌درصد معنی‌دار بود (جدول ۲). بیشترین میزان طول گیاه‌چه (۷۳/۹۲ میلی‌متر) مربوط به تیمار جنین در غلظت ۱۵ گرم در لیتر ساکارز در محیط کشت MS و کمترین میزان طول گیاه‌چه (۴۵/۵۶ میلی‌متر) در غلظت ۶۰ گرم در لیتر ساکارز در محیط کشت MS به‌دست آمد (شکل۶). در شکل ۷، گیاهچه حاصل از تیمار جنین در غلظت ۱۵ گرم در لیتر ساکارز مشاهده می‌گردد.



شکل ۶- میانگین شاخص طول گیاهچه، تحت تیمار جنین خارشتر در محیط کشت MS حاوی غلظت‌های مختلف ساکارز

با ارزیابی کلی اثرات ترکیب محیط کشت بر روی صفات جوانه‌زنی مشخص شد که بین ترکیب‌های مختلف اختلاف معنی‌داری در درصد جوانه‌زنی و سایر پارامترهای اندازه-گیری شده در سطح ۱ درصد وجود دارد (جدول ۲). با توجه به نتایج مقایسه میانگین تأثیر مقادیر مختلف ساکارز بر روی درصد و سایر خصوصیات جوانه‌زنی و تولید گیاهچه خارشتر (شکل‌های ۱ تا ۶)، در تمامی شاخص‌های اندازه‌گیری شده بجز شاخص سرعت جوانه‌زنی وجود میزان ۱۵ گرم در لیتر ساکارز به‌عنوان بهترین ترکیب محیط کشت برای تکثیر گیاه معرفی می‌گردد.



شکل ۷- گیاهچه حاصل از کشت جنین گیاه خارشتر در محیط کشت MS حاوی غلظت ۱۵ گرم در لیتر ساکارز

جدول ۲- تجزیه واریانس تیمار محیط کشت MS حاوی غلظت‌های مختلف ساکارز

منبع تغییرات	درصد جوانه‌زنی	سرعت جوانه‌زنی	طول ریشه‌چه	طول ساقه‌چه	طول گیاهچه	شاخص بنیه
درجه آزادی	۴	۴	۴	۴	۴	۴
میانگین مربعات	۲۳۲/۸۸۵**	۰/۵۲۳**	۱۵۹/۵۶۲**	۱۴۰/۷۷۰**	۵۷۰/۵۶۴**	۶۷۳/۶۸۳**

**: معرف معنی‌دار بودن اثر غلظت‌های مختلف ساکارز در سطح احتمال ۹۹ درصد می‌باشد.

www.SID.ir

Archive of SID

بحث

قوه نامیه پایین و درصد جوانه‌زنی کم در بذر گیاه خارشتر برای تکثیر این گیاه ارزشمند یک مشکل اساسی به‌حساب می‌آید. نتایج این تحقیق نشان داد که کشت درون شیشه‌ای جنین گیاه خارشتر به‌طور چشم‌گیری باعث افزایش جوانه‌زنی این گیاه شد. از آن جا که در همه محیط کشت‌های مورد بررسی، جنین پس از جدا شدن از پوشش دانه شروع به‌رشد کرد، احتمالاً مواد بازدارنده رشد در پوسته وجود دارند. گزارش‌های زیادی وجود دارد که نشان می‌دهد اثر جدا شدن جنین از پوسته دانه در میزان جوانه-زنی معنی‌دار بوده و جوانه‌زنی آن را تا حد زیادی سرعت می‌بخشد. به‌عنوان مثال کشت جنین گیاه بادام درون محیط کشت بر میزان جوانه‌زنی و تولید گیاهچه اثر معنی‌دار و مثبت داشته است (Emam *et al*., 2013). از عوامل دیگری که در موفقیت کشت جنین کمک می‌کند ترکیب عناصر محیط کشت به‌ویژه کربوهیدرات‌هایی مانند ساکارز و مالتوز است (Burrell *et al*., 2006). به‌همین منظور در این تحقیق برای بهینه‌سازی و تعیین بهترین غلظت ساکارز در کشت جنین درون محیط کشت MS غلظت‌های مختلف این کربوهیدرات مورد آزمون قرار گرفت. نتایج این تحقیق نشان داد که غلظت‌های مختلف ساکارز درون محیط کشت بر خصوصیات جوانه‌زنی گیاه خارشتر اثر معنی‌داری دارد. به‌طوری که میزان جوانه‌زنی گیاه را تا ۹۳/۳ درصد مربوط به‌غلظت ۱۵ گرم در لیتر ساکارز افزایش داد که نسبت به سایر غلظت‌های ساکارز مثبت و معنی‌دار بود. در غلظت‌های بالاتر ساکارز روند درصد و سایر خصوصیات جوانه‌زنی مانند سرعت جوانه‌زنی، شاخص بنیه، طول ریشه‌چه، ساقه-چه و گیاهچه رو به کاهش گذاشته و با افزایش غلظت ساکارز از میزان هریک از پارامترهای اندازه گیری شده کاسته شد. در این زمینه Karami و همکاران (۲۰۰۹) بیان کردند که در غلظت‌های ۱۵ و ۳۰ گرم در لیتر ساکارز رویان‌های تشکیل شده میخک غیر نرمال بودند، در حالتی که در غلظت‌های بالاتر ساکارز رویان‌ها را نرمال گزارش کردند. به‌علاوه اینکه بیشترین میزان جوانه‌زنی را در غلظت ۳۰ گرم در لیتر اعلام کردند. ولی در این تحقیق بیشترین درصد جوانه‌زنی در تیمار ۱۵ گرم در لیتر ساکارز به‌دست آمد. در کشت جنین گیاه نوروزک، Modares و همکاران (۲۰۱۴) گزارش کردند که در محیط کشت MS حاوی ۳۰ گرم در لیتر ساکارز سرعت جوانه‌زنی به‌طور چشمگیری افزایش یافت و ریشه‌چه پس از گذشت ۲۴ ساعت از زمان کشت شروع به‌رشد کرد و بیشترین میزان طول ریشه‌چه نیز در همین تیمار رخ داد. ولی در این تحقیق مشخص شد که بیشترین سرعت جوانه‌زنی جنین در محیط عاری از ساکارز و بیشترین میزان طول ریشه‌چه در غلظت ۱۵ گرم در لیتر ساکارز اتفاق افتاد که با گزارش فوق در گیاه نوروزک مغایرت دارد. نتایج این تحقیق با نتایج Piri Zirkouhi و همکاران (۲۰۰۹) در تأثیر غلظت‌های مختلف ساکارز بر جنین‌زایی گوجه فرنگی مشابهت دارد. به این صورت که طبق نتایج حاصل از جنین‌زایی گیاه گوجه فرنگی، غلظت-های پایین ساکارز (۱۰ تا ۲۰ گرم در لیتر) به‌عنوان مناسب-ترین تیمارها برای جنین‌زایی است و در این تحقیق نیز غلظت ۱۵ گرم در لیتر ساکارز بیشترین میزان جوانه‌زنی را به‌همراه داشت. استفاده از ۲ تا ۳ درصد ساکارز در جوانه-زنی و تکامل جنین گل سرخ توسط Kim و همکاران (۲۰۰۴) مناسب و مثبت ارزیابی شد که با نتایج حاصل از این تحقیق همسو می‌باشد. طبق نتایج مقایسه میانگین اثر غلظت‌های مختلف ساکارز بر جوانه‌زنی جنین خارشتر مشخص شد که در غلظت‌های بیشتر از ۱۵ گرم در لیتر ساکارز، تمامی شاخص‌های اندازه‌گیری شده کاهش یافتند که با نتایج Litz (۱۹۸۶) مبنی بر اینکه غلظت‌های بالاتر کربوهیدرات‌ها موجب تحریک جنین‌زایی می‌گردد، تناقض دارد. همینطور Liyun و همکاران (۲۰۱۲) وجود ساکارز در محیط کشت را در جهت بهبود تکثیر گیاه در *Areca catechu* مثبت ارزیابی کردند که با نتایج این تحقیق هم راستا می‌باشد. در مطالعات دیگری که توسط دیگر محققان انجام شده است، به این نکته اشاره شده که همیشه غلظت‌های بالاتر هیدرات‌های کربن مانند ساکارز، موجب افزایش جنین‌زایی رویشی نمی‌شود. به‌طور مثال

www.SID.ir

Archive of SID

Arnold (۱۹۸۷) ثابت کرد که شروع جنین‌زایی رویشی در کشت درخت نوئل در غلظت ۱ درصد ساکارز بهتر از غلظت‌های بالاتر آن می‌باشد. طبق نتایج این تحقیق، کشت جنین بذری خارشتر نسبت به تخمدان این گیاه در شرایط یکسان از جوانه‌زنی بالاتری برخوردار است که این موضوع احتمالاً به‌دلیل نارس بودن تخمدان می‌باشد. جنین گیاه خارشتر که با مشکل جوانه‌زنی بذر مواجه بود، در محیط کشت MS با غلظت ۱۵ گرم در لیتر ساکارز و بدون هورمون گیاهی رشد مناسبی داشته و بهترین تیمار برای تکثیر این گیاه معرفی می‌گردد.

منابع مورد استفاده

-Ali, S.I., 1977. Flora of West Pakistan, pp 319–320.

-Arnold, S.V., 1987. Improved efficiency of somatic embryogenesis in mature embryos of *Picea abies* (L.) Karst. Journal of Plant Physiology, 128: 233-244.

-Bazoobandi, M., Barati, M. and Haghighi, S., 2006. Physiological response of *Alhagi pseudoalhagi* to root exhausting management during fallow season. Iranian Journal of Weed Science, 2: 84-95.

-Burrell, A.M., Lineberger, R.D., Rathore, K.S. and Byrne, D.H., 2006. Genetic variation in somatic embryogenesis of Rose. Hort Science, 41: 1165-1168.

-Calagari, M., Jafari Mofidabadi. A., Tabari, M. and Hosseini, S.M., 2004. Intraspecific hybridizationin *Populus euphratica* Oliv. Using *in vitro* embryo rescue technique. Pajouhesh & Sazandegi, 61: 6-9.

-Emam, M., Ghamari Zare, A., Asadicorom, F. and Looki Anaraki. K., 2013. Micropropagation of *Amygdalus scoparia* L. by bud and embryo culture. Iranian Journal of Rangelands and Forests Plant Breeding and Genetic Research, 21: 77-86.

-Gram, T., Mattsson, O. and Joersbo, M., 1996. Division frequency of pea protoplasts in relation to starch accumulation. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 45: 179-183.

-Guerra, M.P., Silveira, V., Dos Santos, A.L.W., Astarita, L.V. and Nodari, R.O., 2000. Somatic embryogenesis in *Araucaria angustifolia* (BERT) O .Ktze. In Jan, M.S., Gupta, P.K. and Newton, R.J. (ed.), Somatic Embryogenesis in Woody Plants. Kluwer Academic Publishers. Netherlands, 6: 457-478.

-Ivanica, J. and Mokra, A., 1982. Development and cultivation of early-ripening cherry embryos. Biologia Czechoslovakia, 37: 1, 3-12.

-Jafari Mofidabadi, A., 2015. Production of inter-specific hybrid between *Populus caspica* and *P.nigra* using mature embryo culture. Iranian Journal of Rangelands and Forests Plant Breeding and Genetic Research, 23:49-55.

-Jafari Mofidabadi, A. and Modir-Rahmati, A.R., 2000. Production of *Populus euphratica* Oliv. × *P. alba* L. hybrid poplars through ovary and ovule cultures. Plant Genetic Newsletter, 122:13-15.

-Karami, O., Deljou, A. and Bahmani, R., 2008. Type and concentration role of sugar in somatic embryogenesis of carnation (*Dianthus caryophyllus* L.) cultivar of Nelson. Journal of Horticulture Science, 22: 13-21.

-Khan, F.M., 2009. Ethno-veterinary medicinal usage of flora of greater Cholistan desert (Pakistan). Pak Vet J, 29: 75–80.

-Kim, C.K., Oh, J.Y., Chung, J.D., Burrel, A.M. and Byrne, D.H., 2004. Somatic embryogenesis and plant regeneration from *in-vitro*-grown leaf explant of rose. Hort Science, 39: 1378-1380.

-Kumar, J. and Gupta, P.K., 2008. Molecular approaches for improvement of medicinal and aromatic plants. Plant Biotechnology Reports, 2: 93-112.

-Liyun, H., Jie, L., Huanqi, Z. and Haikuo, F., 2012. Study on the mix recipe screening in *Areca catechu* embryo culture. Chinese Agricultural Science Bulletin, 34, 014.

-Litz, R.E., 1986. Effect of osmotic stress on somatic embryogenesis in *Carica suspension* cultures. J. Amer. Soc. Hort. Sci., 111: 969-970.

-Liu, G.S., Liu, J.S., Qi, D.M., Chu, C.C. and Li, H.J., 2004. Factors affecting plant regeneration from tissue cultures of Chinese leymus (*Leymus chinensis*). Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 76: 175-178.

-Majd, A., Chamandosti, F., Mehrabia, S. and Sheidai, M., 2006. Somatic embryogenesis and plant regeneration in *Brassica napus* L. Biological Science, 9: 729-734.

-Marwat, S.K., Khan, M.A., Ahmad, M., Zafar, M. and Rehman, F., 2008. Ethnophytomedicines for treatment of various diseases in D. I. Khan district. Sarhad J. Agric., 24: 306–316.

-Merkle, S.A., Parrott, W.A. and Flinn, B.S., 1995. Morphogenic aspects of somatic embryogenesis. In: Thorpe, T.A. (ed.): *In vitro* embryogenesis in plants. Kluwer Academic Publishers, Netherlands: 1-16.

www.SID.ir

Archive of SID

-Modares, M., Lahuty, M., Ganj Ali, A. and Asili, J., 2014. Optimization of *in vitro* culture of embryos Zygotic *S. leriifolia* (*Salvia leriifolia* Benth.). Journal of Horticultural Science, 28: 319-326.

-Mohan, N., Nikdad, S. and Singh, G., 2011. Studies on seed germination and embryo culture of *Jatropha curcas* L. under *in vitro* conditions. Research Article, Biotechnol, Bioinf, Bioeng, 1: 187-194.

-Murashige, T. and Skooge, F., 1962. A revised medium for rapid growth and bio- assays with tobacco tissue culture. Physiologia Plantarum, 15: 473-597.

-Naraghi, T.S., 2014. *In vitro* propagation of yew (*Taxus baccata*) by culture of sexual embryos. Iranian Journal of Rangelands and Forests Plant Breeding and Genetic Research, 12:335-343.

-Piri Zirkouhi, M., Mashayekhi, K., Kamkar, B., Hemmati, K.h. and Vahdatpour, F., 2009. Embryogenesis of a commercial and a native tomato cultivar using different culture media. J. of Plant Production, 16:101-114.

-Rai, M.K., Akhtar, N. and Jaiswal, V.S., 2007. Somatic embryogenesis and plant regeneration in *Psidium guajava* L. cv. *Banarasi* local. Scientia Horticulture, 113: 129-133.

-Rodriguez, R., Berros, B., Centeno, M.L., Rovira, M., Rodrigues, A. and Radojevic, L., 2000 Applied and basic studies on somatic embryogenesis in hazelnut (*Corylus avellana* L.), In: Jan, M.S., Gupta, P. and Newton, R.J. (eds.), Somatic Embryogenesis in Woody Plants. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht-The Netherland, 6: 291-359.

-Samsam-Shariat, S.H., 1992. Qualitative and quantitative evaluation of the active constituents and control methods for medical plants. Isfahan: Mani Publications, pp: 23-30.

-Sanchez-Zamora, M. Á., Cos-Terrer, J., Frutos-Tomás, D. and García-López, R., 2006. Embryo germination and proliferation *in vitro* of *Juglans regia* L. Scientia Horticulturae, 108: 317-321.

-Takamura, T. and Miyajima, I., 1997. Micropropagation of *Cyclamen persicum* Mill. In: Bajaj, Y.P.S. (ed) Biotechnology in Agriculture and Forestry, Vol. 40: High-Tech and Micropropagation. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg: 96-112.

-Varshney, K., and Singh, A.K., 2008. Inventory of some ethnomedicinal plant species used by rural people of Etah district, UP, India. Plant Arch, 8: 757–759.

www.SID.ir

Archive of SID

Studying the effects of media and micro-explants on optimization of *Alhagi camelorum* F. culture

H. Maraki[*1], A. Sepehry[2] and A. J. Mofidabadi[3]

1* - Corresponding author, M.Sc., Range Management, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, I.R. Iran. Email: hosseinmaraki@yahoo.com

2 – Prof., Dept. of Range Management, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, I.R. Iran.

3- Assoc. Prof., Research Center of Agricultural and Natural Resources of Golestan Province, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), I.R. Iran.

Received: 30.01.2016 Accepted: 20.06.2016

Abstract

Camel thorn (*Alhagi camelorum* F.), a plant from *Fabaceae* family, has a great adaptation in arid conditions. Due to high digestible proteins, possibility of extracting manna from its stems for medicinal purposes and its high tolerance to harsh arid environments, it is considered as an important forage and medicinal plant. It grows via seed and rhizome, but its seed germination rate is very low. Aim of the research was to investigation possible effects of different sucrose concentration levels in micro- propagation of the species via ovary and seed embryo culture to improve its propagation. Seed germination of the species was tested by two explant treatments of ovary and seed embryo in 5 sucrose levels of 0, 15, 30, 45 and 60 gr/l concentrations in MS medium in 5 replications. Germination rate was recorded during four weeks. Results of comparison of germination rates between the two explant treatments in different sucrose concentrations showed that the percentage of embryo germination and seedling height was significantly higher than that of ovary culture. The highest significant embryo germination rate (93/3%) was recorded on 15 gr/l sucrose concentration. By increment of sucrose concentration to 15 gr/l, embryo attributes such as radicle length, plumule length, seedling length, and seed germination index also increased. By increasing sucrose concentration over 15 gr/l, reverse effect was observed on all of the studied attributes.

Keywords: Camel thorn, embryo, ovary culture, sucrose,

www.SID.ir