Archive of SID

بررسی کالزایی و باززایی در گونه جنگلی آزاد (*Zelkova carpinifolia*) در شرایط کشت درون شیشه‌ای

اکرم احمدی[۱*]، محمدرضا کاوسی[۲]، حسن سلطانلو[۳]، غلامرضا صالحی جوزانی[۴] و علی ستاریان[۵]

[۱] **ایران، گرگان، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی استان گلستان، بخش تحقیقات منابع طبیعی**

[۲] **ایران، گرگان، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گروه پاتولوژی جنگل**

[۳] **ایران، گرگان، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی**

[۴] **ایران، کرج، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی (AREEO)، پژوهشگاه بیوتکنولوژی کشاورزی ایران (ABRII)، بخش بیوتکنولوژی میکروبی**

[۵] **ایران، گنبد کاوس، دانشگاه گنبد کاوس، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، گروه جنگل‌داری**

تاریخ دریافت: ۹۴/۱۲/۱۲ تاریخ پذیرش: ۹۵/۹/۱۵

چکیده

درخت آزاد (*Zelkova carpinifolia*)، یکی از درختان جنگلی در معرض تهدید در ایران و جهان است که در حال حاضر به بیماری جهانی مرگ نارون توسط قارچ *Ophiostoma novo-ulmi* نیز مبتلا شده است. به‌طوری‌که ذخیره‌گاه‌های جنگلی این گونه در اثر ابتلا به این بیماری با سرعت بالایی در حال از بین رفتن هستند. این تحقیق به‌منظور بررسی کالزایی و باززایی در گونه جنگلی *Z. carpinifolia* در شرایط کشت درون شیشه انجام شد. آزمایش‌های بررسی تأثیر محیط کشت و ترکیبات هورمونی، ژنوتیپ و اثرات متقابل آنها بر درصد کالوس‌زایی و جوانه‌زنی کالوس‌ها در قالب طرح کاملا تصادفی با دو نوع ریزنمونه برگ و ساقه انجام شدند. نتایج ریزازدیادی نشان داد که درصد کالوس‌زایی در برگ (۸۲/۲ درصد)> نسبت به ریزنمونه ساقه (۷۲/۹ درصد) بیشتر بود. محیط کشت MS حاوی ۲ میلی‌گرم در لیتر BAP و ۱ *میلی‌گرم در* لیتر NAA بالاترین نرخ کالوس‌زایی (۹۴/۳ درصد) را داشت و به‌عنوان بهترین محیط کشت در نظر گرفته شد. بیشترین درصد القای تشکیل جوانه از کالوس (۷/۹۷ درصد) بر روی محیط کشت MS به همراه ۰/۰۵ میلی‌گرم در لیتر GA_3 مشاهده شد. محیط کشت MS غنی شده با IBA (۲ میلی‌گرم بر لیتر) و NAA (۲ میلی‌گرم بر لیتر) با ۷۰ درصد ریشه‌دهی، بهترین محیط ریشه‌زایی بود.

واژه‌های کلیدی: *Zelkova carpinifolia*، درخت آزاد، کالوس‌زایی، کشت بافت، باززایی

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۱۷۳۲۱۶۲۸۱۴ ، پست الکترونیکی: ahmadi.1870@gmail.com

مقدمه

درخت آزاد با نام علمی *Zelkova carpinifolia* و نام انگلیسی Caucasian elm از تیره نارون (Ulmaceae) می‌باشد (۲۴). از ۱۰ گونه جنس Zelkova که در سراسر جهان وجود دارد، تنها یک گونه در کشور ما یافت می‌شود که در استان‌های گلستان، گیلان، مازندران، آذربایجان، کردستان، خراسان و تهران پراکنش دارد. این گونه ازجمله گونه‌های نزدیک به تهدید معرفی شده است (۱۰). بررسی‌های انجام شده حاکی از افزایش روند نابودی این

www.SID.ir

Archive of SID

درختان در ذخیره‌گاه‌های جنگلی کشور به‌ویژه در ذخیره‌گاه جنگلی دلند (استان گلستان) می‌باشد.

تکنیک کشت بافت همواره به عنوان یکی از روش‌های مطلوب در تکثیر سریع گیاهان عاری از بیماری و یکنواخت و همچنین تولید گیاهان مقاوم استفاده شده است. تا به حال مطالعات بسیاری بر روی باززایی گیاهان چوبی در حال انقراض انجام شده است (۳۱). برای مثال، کالزایی و باززایی گیاهچه‌های گونه *Z. sinica* با استفاده از ریزنمونه جنین نابالغ توسط Jin و همکاران (۲۰۰۶) انجام شد و بیشترین باززایی گیاهچه در محیط کشت WPM حاوی هورمون‌های BAP و NAA بدست آمد (۱۶). همین محققان، در سال ۲۰۰۹ باززایی گونه *Z. schneideriana* را با استفاده از ریزنمونه برگ در شرایط درون شیشه‌ای انجام دادند و محیط کشت WPM را به همراه هورمون‌های BAP (۴/۴۴ µM) و NAA (۲/۶۸ µM) برای باززایی گیاهچه از کالوس توصیه نمودند (۱۵).

براساس بررسی‌های انجام شده تاکنون مطالعه ای در زمینه تکثیر این گونه بومی ایران انجام نشده است. با توجه به نبود مطالعات کافی در تکثیر این گونه نزدیک به تهدید، که هر ساله به انقراض نزدیکتر می‌شود، کمبود پژوهش در زمینه تکثیر این گونه درختی بسیار ضروری به نظر رسید. لذا این تحقیق با هدف دستیابی به روشی برای تکثیر *Zelkova carpinifolia* در شرایط کشت بافت و جلوگیری از نابودی این گونه مهم جنگلی انجام شد.

مواد و روشها

پارک جنگلی دلند یکی از ذخیره‌گاه‌های *Z. carpinifolia* در شرق استان گلستان به عنوان منطقه مورد مطالعه انتخاب شد. قلمه‌هایی از شاخه‌ها و سرشاخه‌هایی به قطر یک سانتی‌متر از درختان سالم و درختان بیمار به عنوان نمونه جدا شد. از آنجایی‌که قلمه گیری و ریشه زایی قلمه های گونه آزاد بسیار مشکل بوده و موفقیت اجرای آن بسیار ناچیز است، لذا این پژوهش با استفاده از روش کشت بافت و کالوس‌زایی انجام شد. لذا بدین منظور، ریزنمونه‌های برگ و ساقه از قلمه جدا و با استفاده از مایع ظرفشویی به مدت ۳ دقیقه آلودگی‌های سطحی آن زدوده شد. ریزنمونه‌ها پس از استریل شدن با قارچ کش بنومیل (۴ g/l) به مدت یک ساعت و محلول $HgCl_2$ ۰/۱ درصد به مدت ۷ دقیقه، با آب مقطر استریل سه بار شستشو داده شد.

به‌منظور بررسی کالزایی ریزنمونه‌ها، محیط کشت‌های MS و WPM حاوی ۰/۷ درصد آگار و ۲ درصد ساکارز با ترکیبات مختلفی از تنظیم کننده‌های رشد گیاهی شامل نفتالین استیک اسید (NAA)، ۶- بنزیل آمینوپورین (BAP)، ۲، ۴ دی کلرو فنوکسی استیک اسید (2,4-D) و کینیتین (Kin) مورد استفاده قرار گرفتند. برای باززایی و تولید گیاهچه، سه نوع محیط کشت MS (۲۵)، 1/2 MS و WPM با ترکیب متفاوتی از NAA، Kin، BAP، 2, 4-D و IAA استفاده شد. پس از تنظیم اسیدیته (pH=۵/۷) محیط کشت‌ها به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۱۲۱ درجه سانتی گراد در اتوکلاو استریل گردید. نوع محیط کشت‌ها و تیمارهای هورمونی مورد استفاده در مرحله کالوس‌زایی در جدول شماره یک نشان داده شده است.

به‌منظور کالوس‌زایی، قطعاتی از برگ (۰/۵ × ۰/۵ سانتی‌متر) و ساقه (۴-۳ میلی‌متر) بر روی محیط‌های کشت قرار داده شدند. کشت‌ها در مرحله کالوس‌زایی و تکثیر کالوس در تاریکی و از مرحله جنین‌زایی به بعد در اتاق رشد با شرایط نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی، با شدت نور ۵۰۰۰-۴۵۰۰ لوکس و دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد نگهداری و هر چهار هفته در محیط کشت مشابه واکشت شدند (۳، ۲، ۲۱، ۱۸).

برای رشد کالوس‌ها از محیط کشت MS حاوی ۰/۷ درصد آگار، ۲٪ ساکارز، ۲ میلی‌گرم در لیتر BAP و ۱ میلی‌گرم

www.SID.ir

Archive of SID

در لیتر NAA استفاده شد.

جدول ۱- نوع محیط کشت‌ها و تیمارهای هورمونی مورد استفاده در مرحله کالوس‌زایی

محیط کشت	کد محیط کشت	هورمون‌ها (میلی‌گرم بر لیتر)			
		Kin	2,4-D	BAP	NAA
MS	*MBN	-	-	۲	۱
MS	**M2K	۲	۱	-	-
WPM	***WBN	-	-	۱	۱

*MBN: MS+ BAP+ NAA, **M2K= MS+ 2,4-D + Kin, ***WBN= WPM+ BAP+ NAA

قرار دادن کالوس‌ها در محیط جنین‌زایی سوماتیکی و انتقال به محیط کشت باززایی: به منظور جنین‌زایی سوماتیکی کالوس‌ها به سه روش متفاوت مورد استفاده قرار گرفت.

- به منظور جنین‌زایی سوماتیکی، کالوس‌ها به محیط کشت MS دارای NH_4NO_3 (MS+1.9mg/l NH_4NO_3) منتقل شدند. بعد از دو هفته، کالوس‌ها به محیط کشت MS به همراه KNO_3 (1 mg/l) به منظور بلوغ جنین منتقل شدند (KNO_3 برای القای جنین مناسب نیست ولی برای بلوغ جنین بسیار مؤثر است). سپس، بعد از ۵ هفته کالوس‌ها به محیط کشت MS دارای ۰/۰۵ میلی گرم بر لیتر GA_3 منتقل شدند (۱۱).

- به منظـور تمایز جنین‌هایی با ساختار گلوبولار از محیط کشت MS به همراه BAP 1.0 mg/l و 2,4-D 0.5 mg/l استفاده گردید. سپس برای ادامه تشکیل جنین گلوبولار شکل و جوانه‌زنی جنین‌های محیط MS حاوی BAP 1 mg/l، NAA 1 mg/l و KN 0.5 mg/l مورد استفاده قرار گرفت (۹).

- به منظور جنین‌زایی اولیه از محیط (MS3%+2 BAP+0.5 IAA) و جنین‌زایی ثانویه از محیط کشت (MS3%+1.5 BAP mg/l+0.5 mg/l IAA) استفاده گردید. به منظور جوانه‌زنی و تولید گیاهچه، جنین‌های سوماتیکی به محیط کشت Half-MS3% بدون هورمون انتقال یافتند (۱۴).

روش آماری و تجزیه و تحلیل داده‌ها در مطالعات کشت بافت: مطالعات کشت بافت آزاد در شرایط درون شیشه‌ای به‌صورت آزمایشی در قالب طرح کاملا تصادفی با سه تکرار ده تایی و همچنین آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملا تصادفی با سه تکرار انجام شد. تجزیه واریانس و مقایسه میانگین داده‌ها از طریق آزمون دانکن با استفاده از نرم افزار SPSS انجام گردید.

نتایج

اثر محیط کشت‌های مختلف و تنظیم کننده‌های رشد بر القای کالوس: نتایج نشان داد ریزنمونه‌های برگ و ساقه، در هر ۳ محیط کشت مورد استفاده قادر به القای کالوس بودند ولی شروع و سرعت کالوس‌زایی در آنها متفاوت بود. کالوس‌زایی از قسمت‌های در تماس با محیط کشت به‌ویژه از قسمت‌های حاشیه که برش یافته بودند، شروع شد و گسترش یافت. در ریزنمونه برگ، ۴ تا ۵ روز بعد از کشت در محیط MS با تیمار هورمونی ۲ میلی‌گرم در لیتر BAP و ۱ میلی‌گرم در لیتر NAA کالوس تشکیل شد (شکل ۲). القای کالوس تا ۵ هفته بعد از کشت ادامه داشت، اگرچه تعویق بیشتر آن، موجب از دست رفتن قابلیت کالوس‌زایی شد.

در ریزنمونه ساقه، کالوس‌زایی تقریبا یک هفته بعد از کشت در محیط MS حاوی ۲ میلی‌گرم در لیتر BAP و ۱ میلی‌گرم در لیتر NAA اتفاق افتاد. به عبارت دیگر، سرعت

www.SID.ir

Archive of SID

کالوس‌زایی در ریزنمونه برگ بیشتر از ساقه بود. تمام نمونه‌هایی که سریع‌تر کالوس‌زایی نمودند دارای رنگ نسبتا سبز روشن بودند ولی دیگر نمونه‌هایی که دیرتر کالوس‌زایی کرده بودند، کمی تیره بود. بافت تمام کالوس‌ها سفت و ترد بودند.

جدول ۲- اثرات محیط کشت‌های مختلف بر روی القای کالوس از ریزنمونه‌های برگ و ساقه *Z. carpinifolia*

محیط کشت	ریزنمونه	زمان ظهور اولین کالوس (روز)	رنگ کالوس	بافت کالوس
۱*	برگ	۴-۵	سبز روشن	سفت و ترد
	ساقه	۷	سبز روشن	سفت و ترد
۲**	برگ	۶-۸	سبز روشن	سفت و ترد
	ساقه	۹-۱۰	سبز تیره	سفت و ترد
۳***	برگ	۸-۱۱	سبز تیره	سفت و ترد
	ساقه	۱۰-۱۲	سبز تیره	سفت و ترد

*MS+BAP (2 mg/l)+NAA (1 mg/l); **MS+2, 4-D (1 mg/l)+Kn (2 mg/l); ***WPM+BAP (1 mg/l)+NAA (1 mg/l)

نتایج تجزیه واریانس کالوس‌زایی ریزنمونه‌های برگ و ساقه درخت آزاد از ۵ پایه درختی متفاوت نشان داد که متغیرهای محیط کشت و ریزنمونه در سطح یک درصد و ژنوتیپ در سطح ۵ درصد معنی‌دار بودند. اما هیچ یک از اثرات متقابل آنها تفاوت معنی‌داری با یکدیگر نداشتند ($p>0.05$).

بر اساس نتایج حاصل (جدول ۳)، محیط کشت MS حاوی ۲ میلی‌گرم در لیتر BAP و ۱ میلی‌گرم در لیتر NAA بالاترین درصد کالوس‌زایی (۹۴/۳ درصد) و محیط کشت WPM به همراه BAP (1 mg/l) و NAA (1 mg/l) کمترین درصد کالوس‌زایی (۶۰/۳ درصد) را نشان داد ($p\leq$۰/۰۱). درصد کالوس‌زایی ریزنمونه برگ (۸۲/۲ درصد) بیشتر از ساقه (۷۲/۹ درصد) بود.

جدول ۳- میانگین درصد کال‌زایی ریزنمونه برگ و ساقه در محیط کشت‌های MS و WPM با تیمارهای هورمونی

متغیر	انواع متغیر	درصد کالوس‌زایی
محیط کشت	MS+BAP (2 mg/l)+NAA (1 mg/l)	۹۴/۳ a
	MS+2, 4-D (1 mg/l)+Kn (2 mg/l)	۷۸ b
	WPM+BAP (1 mg/l)+NAA (1 mg/l)	۶۰/۳ c
ریزنمونه	برگ	۸۲/۲ a
	ساقه	۷۲/۹ b

با توجه به اینکه نرخ رشد کالوس‌ها در محیط کشت MS حاوی ۲ میلی‌گرم در لیتر BAP و ۱ میلی‌گرم در لیتر NAA بیشتر بود (جدول ۳)، این محیط کشت برای تکثیر کالوس (Proliferation) انتخاب شد.

القای کالوس‌های جنینی: در هر دو نوع ریزنمونه مورد بررسی، با توجه به رنگ، بافت و زمان آغاز کالوس‌زایی، دو نوع کالوس مشاهده شد. کالوس نوع اول، نرم، آبدار و به رنگ سبز متمایل به زرد و کالوس نوع دوم، سفت، سبز رنگ و دارای بافت گره‌دار با رشد کم بود. در هر دو نوع کالوس شروع کالوس‌زایی از حاشیه و قسمت‌های در تماس با محیط کشت به‌ویژه در قسمت‌های بریده شده، طی چهار هفته بود (شکل ۱).

www.SID.ir

Archive of SID

شکل ۱- انواع کالوس ایجاد شده از ریزنمونه برگ و ساقه: الف: نوع اول (نرم، آبدار و به‌رنگ سبز متمایل به زرد) و ب: نوع دوم (سفت، سبز رنگ و دارای بافت گره‌دار)

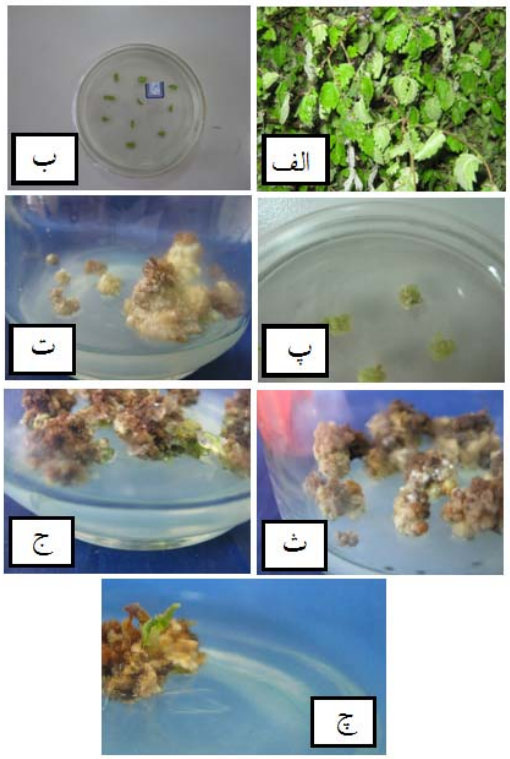
القای جوانه‌های نابجا: در کالوس‌های سبز و ترد، پریموردیوم (Primordium) در یک یا دو هفته تشکیل شد و طی دو تا سه هفته جوانه‌های نابجا رشد کردند. بر اساس نتایج تجزیه واریانس، فقط تأثیر محیط کشت بر روی جوانه‌زنی کالوس‌ها معنی‌دار بود ($p<0.01$)، اما ریزنمونه و اثرات متقابل ریزنمونه و محیط کشت معنی‌دار نبودند ($p>0.05$). درصد جوانه زنی کالوس‌ها در محیط کشت I (۷/۹۷ درصد) نسبت به محیط‌های کشت II و III به‌ترتیب با ۲/۲۲ درصد و ۱/۸۶ درصد جوانه زنی، به‌طور معنی داری بیشتر بود (جدول ۴). به‌طور کلی، میانگین تعداد جوانه در هر کالوس بین صفر تا ۰/۱۳ در هر کالوس بود.

جدول ۴- میانگین درصد جوانه‌زنی کالوس‌ها در محیط کشت‌های مختلف

محیط کشت	درصد جوانه‌زنی کالوس‌ها
*۱	۷/۹۷ a
**۲	۲/۲۲ b
***۳	۱/۸۶ b

*MS+ GA_3 (0.05 mg/l); **MS+ BAP (1 mg/l)+ NAA (1 mg/l)+ KN (0.5 mg/l); ***MS+ BAP (1 mg/l)+ NAA (1 mg/l)+ KN (0.5 mg/l)

ریشه‌دهی: به‌منظور ریشه‌زایی، کالوس‌هایی که اندام زایی کرده بودند به محیط کشت با تنظیم کننده‌های رشد (2) IBA (mg/l)+NAA (2 mg/l) منتقل شدند. از این طریق کالوس‌هایی که اندام‌زایی کرده بودند، ریشه‌دار شدند (شکل ۲).



شکل ۲- باززایی ریزنمونه برگ *Z. carpinifolia* در شرایط درون شیشه: الف) برگ‌های تازه رشد کرده، ب) کشت برگ بر روی محیط کشت به‌منظور کالوس‌زایی، پ) کالوس‌زایی از ریزنمونه برگ، ت) تشکیل کالوس‌های جنین‌زا از ریزنمونه برگ، ث) شروع جوانه‌زنی از کالوس‌های جنین‌زا، ج) بزرگ شدن جوانه بر روی محیط کشت باززایی، چ) ریشه‌زایی و تولید گیاهچه از کالوس برگ

www.SID.ir

Archive of SID

بحث

کشت بافت درخت آزاد و باززایی گیاهچه: این بررسی به منظور حصول کالوس و تولید گیاهان عاری از آلودگی و همچنین باززایی درخت جنگلی آزاد (*Z. carpinifolia*) انجام شد.

براساس نتایج حاصل، هر دو نوع ریزنمونه و تمامی محیط کشت‌های مورد بررسی قادر به کالوس‌زایی بودند ولی شروع و سرعت کالوس‌زایی در هر یک متفاوت بود. کالوس‌زایی از قسمت‌هایی از محیط که در معرض محیط کشت بودند و به‌ویژه قسمت‌های حاشیه برش یافته بیشتر بود. این موضوع بخوبی نشان داد که زخمی شدن بافت در قسمت حاشیه‌ها باعث فعال شدن بیشتر کالوس‌زایی در مقایسه با دیگر قسمت‌های بافت شد. سرعت کالوس‌زایی در ریزنمونه برگ بالاتر از ساقه بود.

در این بررسی، محیط کشت MS حاوی ۲ میلی‌گرم در لیتر BAP و ۱ میلی‌گرم در لیتر NAA به عنوان بهترین محیط کشت برای القای کالوس در ریز نمونه ها تعیین شد. در بررسی Wu و همکاران (۲۰۰۶) محیط کشت WMP در ترکیب با BAP و NAA با ۵۹/۱ درصد کالزایی به عنوان بهترین محیط کشت در القای کالوس معرفی شد (۳۱). در این تحقیق نیز این ترکیب محیط کشت بر روی ریزنمونه ساقه و برگ *Z. carpinifolia* نتیجه تقریبا مشابهی (۶۰/۳ درصد بدون توجه به نوع ریزنمونه) داشت ولی محیط کشت MS به همراه BAP و NAA توانست کالزایی بالاتری (۹۴/۳ درصد) را ایجاد کند. در این پژوهش، از بین دو محیط کشت پایه MS و WPM کارایی محیط کشت MS برای کالزایی این گونه بالاتر از WPM بود. به طور کلی، متداول‌ترین محیط کشتی که برای گونه‌های درختی سخت چوب به‌کار می‌رود، محیط کشت موراشی و اسکوگ (۱۹۶۲) (۲۵) و یا نوع تغییر یافته آن است. عمدتا، غلظت نمک‌های عناصر میکرو و ماکرو نقش مهمی را در ریزازدیادی گیاهان چوبی بازی می‌کنند (۱). با توجه به اینکه مقدار نیتروژن در محیط کشت MS و WPM متفاوت است (به ترتیب ۶۰ و ۱۲ میلی مولار)، بنابراین کارایی بیشتر محیط کشت MS در تکثیر کالوس در مقایسه با محیط WPM می‌تواند به دلیل حضور مقدار نیتروژن بیشتر باشد (۶).

از دو نوع کالوس ایجاد شده، کالوس نوع اول، نرم، آبدار و سبزکمرنگ متمایل به زرد بود. ظاهرا این کالوس نوع اول، غیرجنینی بود و در طی زیرکشت‌های بعدی قهوه‌ای شد. Xu و همکاران (۲۰۰۵) نیز در تحقیق خود بر روی گونه‌ای انگور به این امر اشاره نمودند (۳۲). گاهی اوقات کالوس‌ها رنگ‌های قهوه‌ای و سیاه را نشان دادند که به‌دلیل تأخیر در زیرکشت مشاهده گردید که با نتایج Manjula و همکاران (۲۰۰۰) مطابقت دارد (۲۰).

کالوس‌های غیر جنین‌زا معمولا قادر به ایجاد کالوس‌های جنین دار نیستند که این ممکن است به مراحل رشدی آنها و بیان ژن در کالوس‌ها مرتبط باشد. در بسیاری از گونه‌های گیاهی نشان داده شده است که بین کالوس‌های جنین‌زا و غیر جنین‌زا، تفاوت‌هایی برحسب مورفولوژی، فیزیولوژی، متابولیسیم و الگوی بیان ژن وجود دارد (۶). جنین‌زایی در کالوس‌های گونه آزاد، بسیار پایین بود و بسیاری از کالوس‌ها غیرجنین‌زا باقی ماندند و جنین‌زا نشدند. Wu *et al.* و همکاران (۲۰۰۵) به نتایج مشابهی رسیدند (۳۱).

فاکتورهای بسیاری مانند نوع تنظیم کننده‌های رشد گیاهی و ریزنمونه در جنین‌زایی موفق کالوس‌ها دخیل هستند. هر چند جنین‌زایی در بسیاری از گیاهان از ریزنمونه‌های مختلفی مشاهده شده است (۳۰). اما در بسیاری از گونه‌های گیاهی نشان داده شده است که ژنوتیپ‌های فردی در یک گونه نیز ظرفیت‌های جنین‌زایی متفاوتی دارند. چنین تفاوت‌های ژنوتیپی در ظرفیت جنین‌زایی ممکن است بدلیل وجود تفاوت‌هایی در توانایی فعال‌سازی عناصر کلیدی در مسیرهای جنین‌زایی باشد (۲۲). Prange

www.SID.ir

Archive of SID

و همکاران در سال ۲۰۱۰، در بررسی بر روی باززایی گونه های مختلف سیکلامن از طریق جنین زایی با کالوس، کشت سوسپانسیون و پروتوپلاست به این نتیجه رسیدند که توانایی تشکیل کالوس جنین‌زا و باززایی از طریق جنین‌زایی سوماتیکی در هر گونه به شدت وابسته به ژنوتیپ است. آنان همچنین ذکر کردند که وابستگی شدید به ژنوتیپ یک عامل محدود کننده در باززایی درون شیشه ای است که برای حفظ ژرم پلاسم مورد استفاده قرار می‌گیرد (۲۶). Bradai و همکاران (۲۰۱۶) با بررسی جنین زایی سوماتیکی بر روی زیتون (*Olea europeae* L.) به این نتیجه رسیدند که زمینه ژنوتیپی تمامی مراحل فرایند جنین زایی ژنوتیپی را تحت تأثیر قرار می‌دهد (۵).

در القای جوانه‌های نابجا از کالوس‌های انتقال یافته به محیط کشت‌های جدید، در کالوس‌های سبز و ترد، پریموردیا در طی یک یا دو هفته تشکیل شدند و در طی دو تا سه هفته جوانه‌های نابجا رشد کردند. در این بررسی، درصد جوانه‌زنی در محیط کشت (I) (۷/۹۷ درصد) به طور معنی داری بیشتر از دو محیط کشت دیگر مورد بررسی بود. Haq (۲۰۰۵) نیز محیط کشت (I) را بهترین محیط کشت برای باززایی پنبه از طریق تکثیر کالوس معرفی نمود (۱۱). اگرچه Gopi & Ponmurugan (۲۰۰۶)، محیط کشت (II) را بهترین محیط کشت برای باززایی در *Ocimum basilicum* L. معرفی کردند اما در گونه آزاد بدلیل سخت باززا بودن محیط کشت مناسبی نبود (۹). Jain در سال (۲۰۰۲) محیط کشت (III) را بهترین محیط کشت برای باززایی در *Phlox paniculata* معرفی کرد (۱۴).

به‌طورکلی، درصد جوانه‌زنی در این گونه آزاد بسیار پایین بود. در کالوس‌های مورد بررسی میانگین تعداد جوانه‌های تشکیل شده در هر کالوس بین صفر تا ۰/۱۳ در هر کالوس بود. بنابراین، باززایی این گونه درختی جنگلی بسیار مشکل است و ازجمله گیاهان سخت باززا می‌باشد.

مشکلات در ریشه‌زایی یکی از بزرگترین چالش‌ها در ریزازدیادی گونه‌های چوبی در شرایط درون شیشه‌ای است (۱۲، ۱۵). وجود اکسین در محیط کشت‌های ریشه‌زایی یکی از ملزومات برای آغاز ریشه‌دهی است (۱۹). بدون اکسین، جوانه‌ها سبز می‌مانند و طویل می‌شوند اما ریشه‌زایی اتفاق نمی‌افتد (۱۵، ۲۹). Jin و همکاران (۲۰۰۹) بیان کردند که IBA در تشدید ریشه‌زایی در طی کشت بافت درختان چوبی بسیار مؤثرتر از NAA است (۱۵). در این تحقیق، کالوس‌ها برای ریشه‌زایی، به محیط کشت MS با تیمار هورمونی ۲ میلی‌گرم در لیتر NAA و ۲ میلی‌گرم در لیتر IBA منتقل شدند. از این طریق کالوس‌هایی که اندام‌زایی کرده بودند، ریشه‌دار شدند. هاشمی آبادی و صداقت در بررسی خود ترکیب اکسین ۲ میلی لیتر بر لیتر IBA و ۲ میلی لیتر بر لیتر NAA را بهترین ترکیب برای ریشه دهی عنوان کردند که در این تحقیق نیز ترکیب مؤثری در ریشه دهی بود (۱۳). لازم به ذکر است که ترکیب NAA و IBA در بیشتر تیمارهای مورد استفاده در تحقیقات مختلف نتیجه مؤثرتری را در مقایسه با استفاده هریک از هورمون‌ها به تنهایی دارد (۱۳، ۲۷، ۲۳، ۴، ۱۷)، هرچند ژنوتیپ و عوامل محیطی دو عامل مهم و تأثیرگذار در کشت محسوب می‌شوند (۲۸). Yari و همکاران (۲۰۱۳) نیز در تحقیقات خود عنوان نمودند که اهمیت ژنوتیپ و تنظیم کننده های رشد، احتمالا بیانگر نقش ژنها و بیان متفاوت آنها در پاسخ به تیمارهای بکار رفته است (۳۳). به‌طورکلی، نتایج حاصل نشان داد که امکان باززایی گونه آزاد در شرایط درون شیشه‌ای با وجود سخت باززا بودن وجود داشت.

منابع

1. Andreu, P., Marìn, J. A. 2005. *In vitro* culture establishment and ultiplication of the Prunus rootstock ‘Adesoto 101’ (*P. insititia* L.) as affected by the type of propagation of the donor

www.SID.ir

Archive of SID

plant and by the culture medium composition. Sci. Hortic. 106: 258–267.

2. Arvin, M. G. 2002. Translation in Wooden Trees Tissue Culture, Bunga, J. M. And Aderkas, P.W. (Authors). Kerman. Shahid Bahonar University. 279 p.

3. Bagheri A, Ziarat-nia SM. Hosseini M. 2004. *In vitro* translation of trees, Bunga, J. M. And Aderkas, P.W. (Authors). Mashhad. Ferdowsi University of Mashhad. 248 p.

4. Blythe, E. K., Sibley, J. L., Ruter, J. M., Tilt, K. M. 2004. Cutting propagation of foliage crops using a foliar application of auxin," Scientia Hort. J. 103: 31-37.

5. Bradaï, F., Pliego-Alfaro, F., Sánchez-Romero, C. 2016. Long-term somatic embryogenesis in olive (Olea europaea L.): Influence on regeneration capability and quality of regenerated plants. Scientia Hort. J. 199: 23–31.

6. Ciccotti, A. M, Bisognin, C., Battocletti, I., Salvadori, A., Herdemertens, M., Jarausch, W. 2008. Micropropagation of apple proliferation-resistant apomictic *Malus sieboldii* genotypes. Agronomy. Research. 6 (2): 445-458.

7. Cresswell, R., Nitsch, C. 1975. Organ culture of *Eucalyptus grandis* L. *Planta* 125: 87 –90.

8. Frey, L., Saranga, Y., Bjanik, J. 1992. Somatic embryogenesis in carnation. Hortscience. 27: 63-65.

9. Gopi, C., Ponmurugan, P. 2006. Somatic embryogenesis and plant regeneration from leaf callus of *Ocimum basilicum* L. J. Biotechnol.. 126 (2): 260-264.

10. Güner, A., Zielinski, J. 1998. *Zelkova carpinifolia*. In: IUCN 2013. IUCN Red List of Threatened Species.

11. Haq, I. 2005. Callus proliferation and somatic embryogenesis in cotton (*Gossypium hirsutum* L.). Afr. J. Biotechnol. 4 (2): 206-209.

12. Harada, H., Murai, Y. 1996. Micropropagation of *Prunus mume*. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 46: 265–267.

13. Hashemabadi, D., Sedaghat, H. 2007. Effect of Auxin (NAA and IBA) on rooting in camellia japonica," Agriculture Journal, Azad University of Mianeh Branches. 2(5): 33-42.

14. Jain. A,, Rout, G. R., Raina, S. N. 2002. Somatic embryogenesis and plant regeneration from callus cultures of *Phlox paniculata* Linn. Scientia Hort. J. 94 (1-2): 137-143.

15. Jin, X. L, Zhang, R. Q, Zhang, D. L, He, P., Cao, F. X. 2009. *In Vitro* plant regeneration of Zelkova carpinifolia, an endangered woody species in China, from leaf explants. J. Horticult. Sci. Biotechnol. 84 (4): 415-420.

16. Jin, X. L., He, P., Zhang, R. Q. 2006. Induction of calli from immature embryos of *Zelkova sinica* and regeneration of plantlets. Journal of Central South Forestry University, 26: 98-101.

17. Khoshkhoy, M. 2002. Methods and introduction of plant increment, 2ed Pub. Shiraz University. 522-526.

18. Lindfords, A., Kuusela, H., Hohtola, A., Kupila-Ahvenniemi, S. 1990. Molecular correlates of tissue browning and deterioration in scots pine calli. *Biol Plant*. 32:171-180.

19. Lu, S. F., Zhao, H. Y., Wei, J. H. 2001. Establishment of in vitro regeneration system of triploid Chinese white poplar. Acta Botanica Sinica. 43: 435–437.

20. Manjula, S., Job. A., Nair, G. M. 2000. Somatic embryogenesis from leaf derived callus of *Tylophora indica* (Burn. f.) Merrill. Indian J. Exp. Biol. 38: 1069-1072.

21. Mc Cwon, B. H. 1986a. Woody ornamentals, shade trees and conifers. In: RH Zimmerman, RJ Griesbach, F Hammerschlag, RH Lawson (eds) Tissue Culture as a Plant Production system for Horticultural Crops, Martinus Nijhoff Publishers, Dordrecht. 333-342.

22. Merkele, S. A., Parrott, W. and Flin, B. S. 1995. Morphogenic Aspect of Somatic Embryogenesis. In: Torpedoed in vitro Embryogenesis in Plant. Klauwer Academic Publishers, Dordrecht Bosta London. 155-203.

23. Moalemi, N., Chehrazi, M. 2005. Effect of auxin hormone on rooting in Thyme seedlings, in Proc. 3th Conferences of Agriculture Sciences.

24. Mozaffarian, W. 2004. Iran trees and shrubs. Publishing contemporary culture. 991 p.

25. Murashige, T., Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays of tobacco tissue cultures. Physiol. Plant.15: 437-497.

26. Prange, A. N. S., Bartsch, M., Serek, M., Winkelmann, T. 2010. Regeneration of different Cyclamen species via somatic embryogenesis from callus, suspension cultures and protoplasts. Scientia Hort. J. 125: 442–450.

27. Rahdari, P., Khosroabadi, M., Delfani, K., Hoseini, S. M. 2014. Effect of Different

www.SID.ir

Archive of SID

Concentration of Plant Hormones (IBA and NAA) on Rooting and Growth Factors in Root and Stem Cuttings of *Cordyline Terminalis*. Journal of Medical and Bioengineering 3(3): 190-194.

28. Shirdel-Moghanloo, H., Moini, A., Mousavi, A. 2011. Effects of Cultivar, Pretreatment and Embryo Induction Medium in Isolated Microspore Culture of Hexaploid Wheat (*Triticum aestivum* L.). Iranian Journal of Biology. 24 (6): 789-799.

29. Vieitez, A. M. Vieitez, M. L. 1980. Culture of chestnut shoots from buds in vitro. J. Hortic. Sci. 55: 83–84.

30. Williams, E. G., Maheswaran, G. 1986. Somatic embryogenesis: Factors influencing coordinated behavior of cell as an embryogenic group. Ann. Bot. 57: 443-462.

31. Wu, A. X., Jin, X. L., Xiong, F. 2006. Advances in tissue culture of rare endangered plants of China. Acta Bot. Boreali-Occidential Sinica. 26: 211–216.

32. Xu, X., Lu, J., Ren, Z., Wang, H., Leong, S. 2005. Callus induction and somatic embryogenesis in muscadine and seedless bunch grapes (Vitis) from immature ovule culture. Proc. Fla. State Hort. Soc. 118: 260-262.

33. Yari, F., Mousavi, A., Mostofi, Y., Seyedi, S.M., Zamani, Z., Limer, M. 2013. Effect of plant growth regulators along with iron-chelate on in vitro multiplication and root induction of three cut rose cultivars (*Rosa hybrida* L.). Iranian Journal of Biology. 26 (1): 99-110.

Investigating Callus Induction and Regeneration of *Zelkova carpinifolia* Forest Species *In vitro*

Ahmadi A.[1], Kavousi M.R.[2], Soltanloo H.[3], Salehi Jouzani G.R.[4] and Sattarian A.[5]

[1] Research Division of Natural Resources, Golestan Agriculture and Natural Resources Research and Education Center, AREEO, Gorgan, I.R. of Iran

[2] Dept. of Forest Pathology, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources (GUASNR), Gorgan, I.R. of Iran

[3] Dept. of Agronomy and Plant Biotechnology, Gorgan University of Agricultural Sciences & Natural Resources (GUASNR), Gorgan, I.R. of Iran

[4] Microbial Biotechnology Dept., Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran (ABRII), Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, I.R. of Iran

[5] Dept. of Biology, Faculty of Science, Gonbad Kavous University, Gonbad Kavous, I.R. of Iran

Abstract

Zelkova carpinifolia is one of the forest trees which is threatened by Dutch elm disease caused by *Ophiostoma novo-ulmi*. Forest reservoirs of this species are going to extinct, rapidly. This study was carried out in order to optimize callus induction and regeneration in *Z. carpinifolia* forest species. The research was carried out in completely randomized design with leaf and stem explants. The results of micro-propagation on Z. carpinifolia revealed that percentage of callus induction in leaf (82.2%)>Stem explants (72.9%). The optimum medium for callus induction (94.3) was observed on Murashige and Skoog (MS) supplemented with BAP (2 mg/L) and NAA (1 mg/L). Also, the maximum shoot regeneration response (7.97%) from callus was observed on MS medium supplemented with GA3 (0.05 mg/L). MS medium supplemented with IBA (2 mg/L) and NAA (2 mg/L) provided 70% rooting response which was then selected as optimum rhizo-genesis media.

Key words: *Zelkova carpinifolia*, Zelkova tree, Tissue culture, Calligenesis, Regeneration

www.SID.ir