ISSN: 2476-6917; Modares Journal of Biotechnology. 2018;9(4):495-500

Optimization of Direct Regeneration Method in Ziziphus jujuba Mill

ARTICLE INFO

Article Type
Original Research

Authors
Hashemzadeh Z.[1] *MSc*,
Jafarkhani Kermani M.*[2] *PhD*
Hamidoghli Y.[1] *PhD*

How to cite this article
Hashemzadeh Z, Jafarkhani Kermani M, Hamidoghli Y. Optimization of Direct Regeneration Method in Ziziphus jujuba Mill. Modares Journal of Biotechnology. 2018 ;9(4):495-500.

ABSTRACT

Aims The mass propagation and breeding new varieties of *Ziziphus jujuba* Mill as a valuable fruit tree and herb, which is well adapted to dry and semi-arid climate, is very important. The aim of the present research was to optimize direct regeneration method in *Ziziphus jujuba* Mill.
Materials & Methods In this experimental study, the explants consisted of leaf cut into 3 parts, leaf cut from 4 sides, and full leaf of in *vitro* and compared in Murashige and Skoog and woody plant media with different concentrations of Thidiazuron (TDZ; 0, 5, 10, 15, and 20µM) and Naphthalene acetic acid (NAA, 0 and 1µM). The effect of 2 and 4 weeks of darkness on regeneration rate was investigated. The experiments were conducted in factorial based on a completely randomized design. The mean of statistical data was compared using Duncan's multiple range test. SAS 9.3.1 software was used and the difference was considered significant at 1% probability level.
Findings The 2 weeks of darkness treatment with the mean of 1.38 was better than the 4 weeks of darkness treatment. The Maximum number of shoots (2.27) was obtained in leaf cut into 3 parts. The maximum percent of regeneration (75.0%) and highest number of regenerated shoots (4.83) were obtained in the MS medium containing 10µM TDZ and 1µM NAA.
Conclusion Regeneration rates in *Ziziphus jujuba* Mill is affected by the type of explant, culture media and plant growth regulators. Maximum rate of regeneration is observed in leaf cut into 3 parts and cultured on MS medium containing 1µM NAA and 10µM TDZ. Plantlets are rooted and successfully acclimatized at "*in vivo*" conditions.

Keywords Regeneration; Leaf ; Growth Regulator; *Ziziphus jujube*; Tissue Culture

CITATION LINKS

[1] Macropropagation and micropropagation of *Ziziphus spina-christi* [2] Ziziphus jujube the neglected fruit [3] Ziziphus mauritiana Lam, culture and use in Kapsiki (North Cameroon) [4] Rapid in vitro Multiplication and ex vitro Rooting of Zizyphus mauritiana [5] In vitro culture of leaves and plantlet regeneration of Ziziphus jujube [6] In vitro clonal propagation of a multipurpose tree, Ziziphus spina-christi (L.) desf [7] In vitro shoot multiplication of Ziziphus spina-christi by shoot tip culture [8] Clonal propagation of Ziziphus spina-christi by shoot tip culture: I. improved inorganic and organic media constituents for in vitro shoot multiplication [9] Factors influencing efficiency of shoot regeneration in Ziziphus jujuba Mill. 'Huizao' [10] Anatomical observations of adventitious bud regeneration from leaf explants of Ziziphus jujube Mill. 'Huizao' [11] Effciency of direct and indirect shoot organogenesis in different genotypes of Rosa hybrida [12] Transformation of roses with genes for antifungal proteins to reduce their susceptibility to fungal diseases [13] Isolation and characterization of four somatic embryogenesis receptor-like kinase (RhSERK) genes from miniature potted rose (Rosa hybrida cv. Linda) [14] Enhancement of in vitro organogentic capacity of rose by preculture of donor shoots on the medium with thidiazuron [15] Adventitious shoot formation on excised leaves of in vitro grown shoots of apple cultivars [16] Adventitious shoot regeneration from leaf tissue of three pear (Pyrus sp.) cultivars in vitro [17] Thidiazuron stimulation of apple shoot proliferation in vitro [18] Micropropagation of white flowering eastern redbud (Cercis canadensis var. alba L.) [19] An efficient adventitious shoot regeneration system for Zhanhua winter jujube (Zizyphus jujuba Mill.) using leaf explants [20] High-frequency plant regeneration through adventitious shoot formation in castor (Ricinus communis L.) [21] Shoot regeneration from petunia leaf discs as a function of explants size, configuration and benzyladenine exposure

[1]Horticulture Department, Agriculture Faculty, Guilan University, Guilan, Iran
[2]Tissue & Cell Culture Department, Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran (ABRII), Agricultural Research, Education & Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran

***Correspondence**
Address: Tissue & Cell Culture Department, Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran (ABRII), Agricultural Research, Education & Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran
Phone: +98 (26) 32703536
Fax: +98 (21) 32704539
m.j.kermani@abrii.ac.ir

Article History
Received: July 23, 2016
Accepted: February 21, 2018
ePublished: December 21, 2018

Copyright© 2018, TMU Press. This open-access article is published under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License which permits Share (copy and redistribute the material in any medium or format) and Adapt (remix, transform, and build upon the material) under the Attribution-NonCommercial terms.

Archive

www.SID.ir

بهینه‌سازی روش باززایی مستقیم در عناب

زهرا هاشم‌زاده MSc
گروه باغبانی، دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه گیلان، گیلان، ایران
مریم جعفرخانی‌کرمانی* PhD
بخش کشت بافت و سلول پژوهشگاه بیوتکنولوژی کشاورزی ایران، سازمان تحقیقات آموزش و ترویج وزارت جهاد کشاورزی، کرج، ایران
یوسف حمیدأقلی PhD
گروه باغبانی، دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه گیلان، گیلان، ایران

چکیده
اهداف: تولید انبوه و بهنژادی عناب (*Ziziphus jujuba* Mill) به‌عنوان یک درخت میوه و گیاه دارویی باارزش و سازگار با مناطق خشک و نیمه‌خشک اهمیت خاصی دارد. هدف پژوهش حاضر بهینه‌سازی روش باززایی مستقیم در عناب بود.
مواد و روش‌ها: در پژوهش تجربی حاضر ریزنمونه‌ها شامل برگ برش‌خورده به سه قسمت، برگ برش‌خورده از چهارطرف و برگ کامل از گیاهان درون شیشه بودند و در محیط‌های کشت موراشیگ و اسکوگ (MS)، اختصاصی گیاهان چوبی (WPM) با غلظت‌های متفاوت تیدیازرون (TDZ؛ صفر، ۵، ۱۰، ۱۵ و ۲۰میکرومولار) و نفتالین‌استیک‌اسید (NAA؛ صفر و یک‌میکرومولار) مقایسه شدند. تاثیر تیمارهای ۲ و ۴ هفته تاریکی بر میزان باززایی بررسی شد. آزمایش‌ها به‌صورت فاکتوریل و در قالب طرح کاملاً تصادفی صورت گرفت. میانگین داده‌های آماری با استفاده آزمون چنددامنه‌ای دانکن مقایسه شد. نرم‌افزار SAS 9.3.1 به کار رفت و تفاوت در سطح احتمال ۱% معنی‌دار در نظر گرفته شد.
یافته‌ها: تیمار دو هفته تاریکی با میانگین ۱/۳۸ مناسب‌تر از ۴ هفته بود. بیشترین میزان باززایی (۲/۲۷) در ریزنمونه برگ برش‌خورده به سه قسمت حاصل شد. بیشترین درصد باززایی (۷۵/۰%) و بیشترین تعداد شوت‌های باززاشده (۴/۸۳) در تیمار محیط کشت MS شامل تنظیم‌کننده‌های رشد یک‌میکرومولار NAA و ۱۰میکرومولار TDZ حاصل شد.
نتیجه‌گیری: میزان بازیابی عناب تحت تاثیر نوع ریزنمونه، محیط کشت و تنظیم‌کننده‌های رشد گیاه است. حداکثر باززایی در برگ برش‌خورده به سه‌قسمت و در محیط MS حاوی یک‌میکرومولار NAA و ۱۰میکرومولار TDZ حاصل می‌شود. گیاهچه‌های حاصله ریشه‌دار و با موفقیت در محیط "*برون‌شیشه*" سازگار می‌شوند.
کلیدواژه‌ها: باززایی، برگ، تنظیم‌کننده رشد، عناب، کشت بافت

تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۰۵/۰۲
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۱۲/۰۲
*نویسنده مسئول: m.j.kermani@abrii.ac.ir

مقدمه

شرایط خشک و سخت حاکم بر بیشتر زیست‌بوم‌های ایران و محدودبودن گونه‌های بومی و سازگار در این مناطق، اهمیت و ارزش گیاهان قانع، مقاوم و پرطراوت را بیشتر نمایان می‌سازد. گونه‌های گیاهی خانواده عناب (رامناسه) و جنس کُنار (زیزیفوس) از زمره همین گیاهان هستند[1].

عناب (*Ziziphus jujuba* Mill) در چین نقش مهمی به‌عنوان یک درخت میوه دارد و میوه‌های طعم‌دار و بسیار بزرگی تولید می‌کند که خرمای چینی نام دارند. در اواخر دهه ۱۹۵۰ عناب به‌عنوان یکی از کهن‌ترین محصولات درختی میوه طبقه‌بندی شد[2]. عناب از درختان مقاومی است که قابلیت رشد و تولید در زمین‌های کم‌آب و شور را دارد، توجه بیشتر به آن ضمن بالابردن ظرفیت تولید محصولات کشاورزی، در حفاظت از خاک نیز موثر است. تطابق و سازگاری این محصول با محیط و علاقه زیاد مردم به این گیاه موجب شده اغلب باغ‌های احداثی در استان خراسان جنوبی در سال‌های اخیر به این محصول اختصاص داده شود و این عوامل موجب اهمیت اقتصادی- اجتماعی آن شده است، همچنین عناب به‌دلیل تنوع فراوان یکی از ذخایر توارثی گیاهی ارزشمند ایران محسوب می‌شود و به‌دلیل سازگاری بالای آن به شرایط سخت محیطی به‌ویژه در مناطق کوهستانی به‌عنوان یکی از اجزای پوشش سبز طبیعی، نقش مهمی در تعدیل آب و هوای منطقه، جلوگیری از فرسایش خاک و ایجاد روان‌آب سطحی دارد. این عوامل موجب اهمیت زیست‌محیطی این گیاه نیز شده است[3].

درخت عناب در ایجاد و توسعه فضای سبز و باغ‌ها در شرایط محیطی متفاوت با کاربرد چندمنظوره کاشته می‌شود. علاوه بر سرسبزی و شاخ و برگ زیبای درخت، چوب آن نیز به‌دلیل داشتن نقش زیبا و صیقل‌پذیربودن در صنایع چوب کاربرد دارد[2]. عناب به‌عنوان یک گیاه دارویی ارزشمند در طب سنتی جایگاه ویژه‌ای دارد و از اندام‌های مختلف آن مانند میوه، بذر، برگ، پوست و ریشه در صنایع غذایی و دارویی به‌صورت تازه و خشک استفاده می‌شود. میوه آن به‌عنوان تصفیه‌کننده خون، آرام‌کننده اعصاب، مقوی معده، ملین، ضدسرفه و مدر به کار می‌رود[2]. خانواده عناب متشکل از ۴۹ جنس و در حدود ۹۰۰ گونه است. تعداد کروموزوم‌های هاپلوئید در جنس کُنار ۱۲ عدد (۲n=2x=۲۴) است. در ایران ۵ جنس و ۱۱ گونه آن در مناطق خلیجی عمان، زاگرسی و خزری می‌رویند. گونه عناب بومی آسیای جنوب شرقی، آسیای میانه و قفقاز است و در حقیقت درختی است که تقریباً در نقاطی از دنیا که با کمبود آب و شرایط خاکی نامناسب همراه باشد، رشد می‌کند. پراکنش عناب در ایران به‌طور عمده در استان‌های خراسان (مشهد، کلات نادری، قائن، بیرجند، دره‌گز و دشت بیاض)، گلستان (گرگان کاشته شده، کلاله خودرو)، مازندران (ساری و بهشهر کاشته شده، دهنه لاریم خودرو)، گیلان (رشت کاشته شده)، فارس (شیراز کاشته شده، نودان خودرو)، اصفهان، مرکزی، یزد، لرستان، کرمان، همدان و تهران است[2].

در سال‌های اخیر فنون کشت بافت گیاهی به یک ابزار قدرتمند برای تکثیر بسیاری از گونه‌های گیاهی تبدیل شده است. تولید انبوه گیاهان با ساختار ژنتیکی یکسان و عاری از بیماری از مزایای مهم کشت بافت در گیاهان محسوب می‌شود، اما مهم‌ترین مزیت آن کاربرد در برنامه‌های بهنژادی است. در مورد کشت بافت، ریز ازدیادی عناب و گونه‌های نزدیک به آن تحقیقات نسبتاً محدودی در ایران و جهان انجام شده است[4, 5].

از تحقیقات مشابه می‌توان به گزارش‌هایی اشاره کرد که روی تکثیر درون‌شیشه‌ای درختان کُنار انجام شده است[6-8]. *فنگ* و همکاران[9] در بررسی فاکتورهای موثر بر باززایی عناب رقم Huizao (یک رقم عناب چینی) نشان دادند که در باززایی این گیاه ترکیب تیدیازورون (TDZ) و نفتالین‌استیک‌اسید (NAA) همراه با ۲/۹۴میکرومولار نیترات‌نقره لازم است.

هدف پژوهش حاضر بررسی اثر نوع ریزنمونه، محیط کشت و مدت‌زمان تاریکی در القای باززایی مستقیم از برگ گیاه عناب در شرایط "*در شیشه*" بود.

مواد و روش‌ها

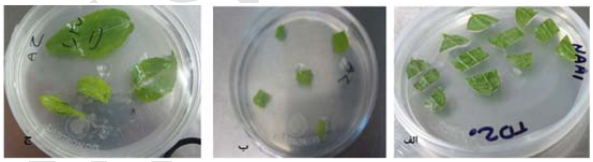
مطالعه تجربی حاضر در آزمایشگاه کشت بافت و سلول پژوهشگاه بیوتکنولوژی کشاورزی کرج طی ۱۸ ماه انجام شد. ریزنمونه‌های برگ از سرشاخه‌های جوان باغات بیرجند جمع‌آوری شدند و پس از گذران مراحل گندزدایی در تیمارهای زیر (همگی دارای ۳% ساکارز و ۶/۵% آگار)کشت و به فیتوترون با ۱۶ساعت روشنایی و ۸ساعت تاریکی منتقل شدند.

بررسی اثر محیط کشت پایه و غلظت‌های مختلف تنظیم‌کننده‌های

Archive of SID
www.SID.ir

رشد بر باززایی مستقیم گیاه عناب: به‌منظور تعیین بهترین محیط کشت و تیمار هورمونی برای باززایی مستقیم، ریزنمونه‌های برگ در محیط کشت پایه اختصاصی گیاهان چوبی (WPM) و محیط کشت پایه موراشیگ و اسکوگ (MS) همراه با ترکیبی از غلظت‌های NAA (صفر، یک‌میکرومولار)، TDZ (صفر، ۵، ۱۰، ۱۵، ۲۰میکرومولار)، ۳۰گرم در لیتر ساکارز و ۶/۵گرم در لیتر آگار قرار گرفتند. پس از اعمال تیمار تاریکی، ریزنمونه‌ها به شرایط نوری ۱۶ساعت روشنایی و ۸ساعت تاریکی فیتوترون منتقل و نود روز پس از کشت (هفته دوازدهم) تعداد شاخه‌های باززاشده در هر دو محیط کشت WPM و MS بررسی شدند.

بررسی اثر مدت‌زمان تاریکی و نوع ریزنمونه در باززایی مستقیم گیاه عناب: پس از تعیین بهترین تیمار هورمونی در آزمایش قبل، ریزنمونه‌های برگ شامل برگ سه‌قسمت‌شده با برش‌های عرضی (نوک، وسط و پایین)، قطعات برگ از چهار طرف برش‌خورده و برگ کامل با سه برش عرضی روی رگبرگ اصلی که همه از سطح پشتی به‌طور مورب زخمی شده بودند (شکل ۱). محیط کشت MS دارای یک‌میکرومولار NAA، ۱۰میکرومولار TDZ، ۳۰گرم در لیتر ساکارز و ۶/۵گرم در لیتر آگار در تیمار دو و چهار هفته تاریکی قرار گرفتند. ۹۰ روز پس از کشت تعداد شاخه‌های باززاشده از هر ریزنمونه بررسی شد.



شکل ۱) نوع ریزنمونه‌های استفاده‌شده؛ الف) برگ سه‌قسمت‌شده با برش‌های عرضی، ب) قطعات برگ از چهار طرف برش‌خورده، ج) برگ کامل با سه برش عرضی روی رگبرگ اصلی

محیط ریشه‌زایی و سازگاری: شاخساره‌های باززاشده به محیط ریشه‌زایی که قبلاً در پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی ایران بهینه شده بود، منتقل شدند. محیط ریشه‌زایی دارای محیط پایه MS با ۸میکرومولار IBA و یک‌میکرومولار NAA بود. زمانی که ریشه‌ها در محیط کشت گسترش یافتند، ریشه گیاهچه‌ها در زیر آب روان شسته شد تا بقایای محیط کشت از اطراف ریشه‌ها پاک شود. سپس گیاهچه‌ها به‌آرامی، در مخلوط پیت: پرلیت: رس، به نسبت ۱:۱:۱ کاشته شدند و به‌مدت دو هفته درپوش پلاستیکی روشن روی آنها قرار گرفت تا گیاهچه‌ها به‌تدریج به شرایط برون شیشه سازگار شوند.

در هر تیمار ۲۰ ریزنمونه بررسی و تعداد شوت‌های باززاشده و درصد باززایی از هر ریزنمونه پس از ۱۲ هفته یادداشت شدند.

آزمایش‌ها به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح پایه کاملاً تصادفی انجام شد.

میانگین داده‌های آماری با استفاده آزمون چنددامنه‌ای دانکن مقایسه شد. نرم‌افزار SAS 9.3.1 به کار رفت و تفاوت در سطح احتمال ۱% معنی‌دار در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

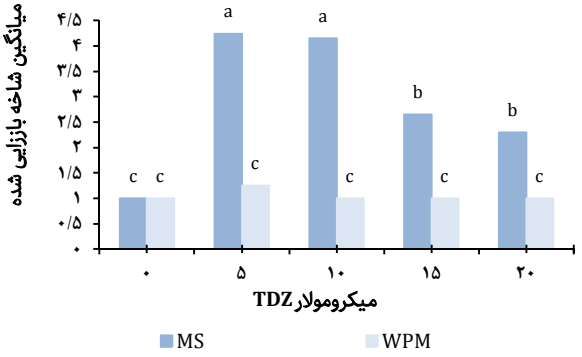
توده‌های کالوسی روی برگ‌ها و در ناحیه رگبرگ‌ها مشاهده و شاخه‌های نابجا در کنار توده‌های کالوسی ایجاد شدند (شکل ۲- الف). عموماً شاخه‌های نابجا به‌طور مستقیم از بافت برگی به‌ویژه در ناحیه رگبرگ‌ها مشاهده شد (شکل ۲- ب).

بهترین تولید شاخساره در محیط MS با ترکیب ۵ و ۱۰میکرومولار TDZ با میانگین‌های ۴/۲ و ۴/۱۵ حاصل شدند. در حالی که بیشترین درصد باززایی ۶۶/۶۷% در محیط MS دارای ۱۰میکرومولار TDZ به دست آمد، محیط MS ترکیب‌شده با ۵میکرومولار TDZ با ۵۵/۵۶% باززایی در رتبه بعدی قرار گرفت (نمودارهای ۱ و ۲).

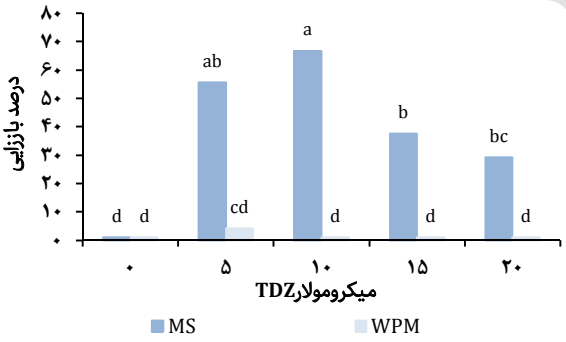
محیط‌های کشت حاوی غلظت‌های ۱۰ و ۵میکرومولار تنظیم‌کننده رشد TDZ بهترین نتیجه را حاصل کردند (نمودارهای ۱ و ۲).

دو هفته تاریکی با میانگین ۱/۳۸ باززایی بهتری نسبت به تیمار چهار هفته تاریکی با میانگین ۰/۸۹ داشت. درصد باززایی دو هفته تاریکی (۴۲/۲۵%) بیشتر از چهار هفته (۲۴/۴۱%) بود (نمودار ۳).

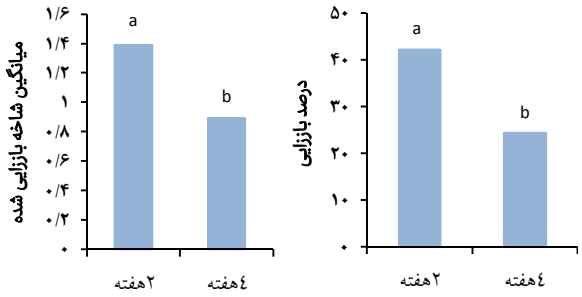
ریزنمونه‌های برگ برش‌خورده به سه قسمت (ریزنمونه ۱) بیشترین درصد باززایی (۵۳%) و بیشترین میانگین تعداد شوت نابجا (۲/۲۷) را ایجاد کردند (نمودار ۴).



نمودار ۱) مقایسه میانگین اثر متقابل محیط و تنظیم‌کننده رشد TDZ بر تعداد شاخه باززایی‌شده عناب (حروف متفاوت برای هر تیمار نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۱% براساس آزمون دانکن است)

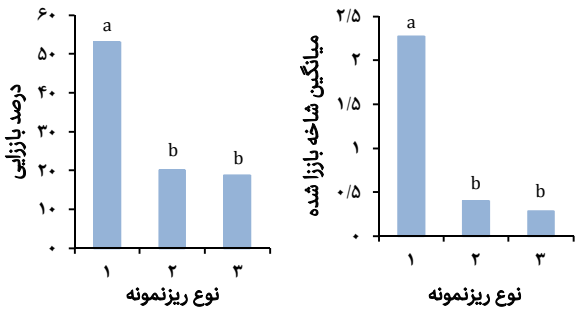


نمودار ۲) مقایسه میانگین اثر متقابل محیط و تنظیم‌کننده رشد TDZ بر درصد باززایی عناب (حروف برای هر تیمار نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۱% براساس آزمون دانکن است)



نمودار ۳) مقایسه میانگین اثر تاریکی بر تعداد شاخه باززاشده و درصد باززایی مستقیم عناب (حروف متفاوت برای هر تیمار نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۱% براساس آزمون دانکن است)

www.SID.ir



نمودار ۴) مقایسه میانگین اثر نوع ریزنمونه، ۱: برگ سه‌قسمت‌شده با برش‌های عرضی، ۲: قطعات برگ از چهار طرف برش‌خورده، ۳: برگ کامل با سه برش عرضی روی رگبرگ اصلی بر تعداد شاخه باززاشده و درصد باززایی مستقیم عناب (حروف برای هرنوع ریزنمونه نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۰/۰۵% براساس آزمون دانکن)

سطح برش‌خورده در دو نوع ریزنمونه و تعداد شاخه‌های نابجا نیز بیشتر بود (شکل ۲- ب).

شاخساره‌های باززاشده ابتدا پرآوری (شکل ۳- الف) و سپس به محیط بهینه ریشه‌زایی منتقل شدند. در محیط مذکور ۱۰۰% گیاهچه‌ها ریشه‌دار شدند (شکل ۳- ب). همچنین گیاهچه‌ها به‌طور موفقیت‌آمیزی در مرحله سازگاری با شرایط "*برون‌شیشه*" سازگار شدند (شکل ۳- ج).

الف ب

شکل ۲) شاخه‌های باززاشده روی سطوح برش‌خورده؛ الف) سطح برش کمتر در ریزنمونه، ب) سطح برش بیشتر در ریزنمونه

شکل ۳) گیاهچه‌های عناب؛ الف) مرحله پرآوری، ب) مرحله ریشه‌زایی، ج) مرحله سازگاری

بحث

هدف پژوهش حاضر بررسی اثر نوع ریزنمونه، محیط کشت و مدت‌زمان تاریکی در القای باززایی مستقیم از برگ گیاه عناب در شرایط "*در شیشه*" بود.

در پژوهش حاضر توده‌های کالوسی روی برگ‌ها و در ناحیه رگبرگ‌ها مشاهده و شاخه‌های نابجا در کنار توده‌های کالوسی ایجاد شدند. عموماً شاخه‌های نابجا به‌طور مستقیم از بافت برگی به‌ویژه در ناحیه رگبرگ‌ها مشاهده شدند. این مشاهدات با مشاهدات هیستولوژیکی *ما* و همکاران[10] مطابقت داشت. براساس مقایسه میانگین آزمون دانکن بهترین تولید شاخساره در محیط MS با ترکیب ۵ و ۱۰میکرومولار TDZ حاصل شد. در حالی که بیشترین درصد باززایی ۶۶/۶۷% در محیط MS با ۱۰میکرومولار TDZ به دست آمد و محیط MS ترکیب‌شده با ۵میکرومولار TDZ با ۵۵/۵۶% باززایی در رتبه بعدی قرار گرفت.

از آنجایی که عناصر غذایی در گیاهان نقش‌های متعدد و مهمی بر عهده دارند نیاز به این عناصر در کشت بافت عناب و تاثیر آنها در توسعه و تقسیم سلولی امری بدیهی است، به‌طور مثال آنها به‌عنوان کوآنزیم عمل می‌کنند، در فعال‌کردن بسیاری از آنزیم‌های مهم نقش دارند، همچنین در ساختمان اسیدهای آمینه، کلروفیل، مواد آلی، اسیدهای نوکلئیک و بسیاری مواد مهم دیگر به کار می‌روند. نتایج حاصل از پژوهش حاضر با گزارش‌های *فنگ* و همکاران[9] که محیط WPM را برای باززایی عناب مناسب می‌دانستند، مغایرت داشت. این یافته می‌تواند ناشی از تفاوت در نیاز ارقام مختلف به عناصر موجود در محیط‌های کشت متفاوت باشد زیرا محیط کشت گیاهی در بسیاری از گیاهان بسیار به ژنوتیپ وابسته است. وابستگی ژنوتیپی توسط بسیاری از محققان از جمله *پورحسینی* و همکاران[11] نشان داده شده است.

نتیجه دیگر از پژوهش حاضر این بود که محیط‌های کشت دارای غلظت‌های ۱۰ و ۵میکرومولار تنظیم‌کننده رشد TDZ بهترین نتیجه را دادند. تیدیازورون یک تنظیم‌کننده سنتزی از گروه سیتوکنین‌ها متعلق به دسته فنیل‌اوره‌ها است که امروزه به‌عنوان یک تنظیم‌کننده رشد در زمینه باززایی در عرصه جهان نمود کرده است و توانسته به‌گونه‌ای بسیار موفق در زمینه باززایی مستقیم حتی در بافت‌های بسیار تمایزیافته عمل کند[11-13].

کاچارسکا و *اولیکوسکا*[14] نشان دادند که مولکول‌های TDZ قادر به افزایش قابلیت فاکتورهای درون‌زاد و برون‌زاد در بافت‌های گیاهی هستند که در فرآیند تمایزیابی و تمایززدایی سلول‌ها نقش دارند. این عمل چندوجهی می‌تواند نتایج و قابلیت اندام‌زایی ریزنمونه‌ها را تغییر دهد. همچنین تنظیم‌کننده رشد TDZ به‌عنوان محرک در باززایی سیب، گلابی و عناب معرفی شده است[9, 15, 16]. مقدار مصرف این تنظیم‌کننده رشد برای مطالعات باززایی بسیار مهم است به‌طوری که غلظت پایین آن شاخه‌های جانبی را برای رشد تحریک می‌کند در حالی که غلظت بالای آن سبب تولید شاخه‌های نابجا می‌شود[17, 18].

طبق نتایج حاصل از مقایسه میانگین در پژوهش حاضر دو هفته تاریکی، باززایی بهتری نسبت به تیمار چهار هفته تاریکی داشت، همچنین درصد باززایی دو هفته تاریکی بیشتر از چهار هفته بود.

گو و *ژنگ*[19] در پژوهش خود با مقایسه چهار دوره تاریکی گزارش کردند که بیشترین درصد ریزنمونه‌های باززاشده و همچنین حداکثر تعداد شوت‌های باززاشده در هر ریزنمونه در تیمارهای تاریکی ۲۰روزه بود.

Archive of SID
www.SID.ir

در پژوهش *فنگ* و همکاران[9] در عناب مشخص شد که در مقایسه تیمارهای تاریکی صفر، ۱۰، ۲۰ و ۳۰ روز، تاریکی ۱۰ روز با میانگین باززایی ۲/۳۵ و ۸۱% بهترین تیمار بود که با نتایج پژوهش حاضر مطابقت دارد.

در مطالعه‌ای گزارش شد که تیمارهای تاریکی ممکن است تخریب اندوژنز یا اگزوژنز تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی را به تاخیر بیندازد که آن نیز به نوبه خود موجب القای باززایی گیاهان در شرایط "*درشیشه*" می‌شود[20].

در پژوهش حاضر نتایج حاصل از مقایسه میانگین نشان داد ریزنمونه‌های برگ برش‌خورده به سه قسمت (ریزنمونه ۱) بیشترین درصد باززایی و میانگین تعداد شوت نابجا را ایجاد کرد. این نتیجه می‌تواند به‌علت افزایش سطوح برش و در نتیجه افزایش سطح تماس با محیط در ریزنمونه یک نسبت به ریزنمونه برگ کامل (ریزنمونه ۳) و همچنین بیشتربودن حجم ماده کشتی در آن نسبت به برگ برش‌خورده از چهار طرف (ریزنمونه ۲) باشد. به نظر می‌رسد تولید شاخه‌های نابجا با میزان سطح لبه‌های برش مرتبط است و با افزایش سطوح برش‌خورده تعداد شاخه‌های باززاشده افزایش می‌یابد.

بک و *کمپر*[21] در آزمایشی با بررسی تاثیر اندازه برگ در باززایی گیاه اطلسی نشان دادند که بین سطح و لبه‌های برش همبستگی مثبت وجود دارد، پس با افزایش سطح و افزایش لبه‌های برش مقدار باززایی بیشتر می‌شود. آنها همچنین بیان کردند که حجم توده ریزنمونه نیز می‌تواند به‌عنوان یک عامل مهم در تعداد شوت نابجا باشد. نتایج حاصل از این پژوهش با نتایج به‌دست‌آمده در آزمایش *بک* و *کمپر* مطابقت دارد.

در انجام پژوهش حاضر محدودیتی وجود نداشت.

با توجه به بهینه‌سازی و تعیین پروتوکل باززایی عناب در این پژوهش، ادامه تحقیقات در زمینه به‌کارگیری این پروتوکل به‌منظور استفاده در برنامه‌های به‌نژادی آتی برای افزایش عملکرد و افزایش میزان متابولیت‌های ثانویه پیشنهاد می‌شود.

نتیجه‌گیری

بیشترین درصد باززایی و بیشترین تعداد شوت نابجا در تیمار یک‌میکرومولار NAA با ۱۰میکرومولار TDZ در محیط کشت MS است. بیشترین میزان باززایی در ریزنمونه برگ برش‌خورده به سه قسمت است. علت این امر را می‌توان به برهم‌کنش سطح تنظیم‌کننده‌های درونی و بیرونی و همچنین بیشترین سطح لبه برش‌خورده در این نوع ریزنمونه دانست. مدت‌زمان تیمار تاریکی برای القای باززایی عناب مهم است، بیشترین میزان باززایی در تیمارهای دو هفته تاریکی است. در محیط مذکور ۱۰۰% گیاهچه‌ها ریشه‌دار و به‌طور موفقیت‌آمیزی در مرحله سازگاری با شرایط "*برون‌شیشه*" سازگار می‌شوند.

تشکر و قدردانی: نویسندگان مقاله از پژوهشگاه بیوتکنولوژی کشاورزی برای دراختیارقراردادن امکانات آزمایشگاهی و منابع مالی تشکر و قدردانی می‌نمایند.

تاییدیه‌اخلاقی: موردی از سوی نویسندگان یافت نشد.

تعارض منافع: نویسندگان اعلام می‌دارند هیچ‌گونه تعارض منافعی وجود ندارد.

سهم نویسندگان: زهرا هاشم‌زاده (نویسنده اول)، نگارنده مقدمه/پژوهشگر اصلی/تحلیلگر آماری (۴۰%)؛ مریم جعفرخانی کرمانی (نویسنده دوم)، نگارنده مقدمه/روش‌شناس/پژوهشگر کمکی/تحلیلگر آماری/نگارنده بحث (۵۰%)؛ یوسف حمیداُقلی (نویسنده سوم)، پژوهشگر کمکی (۱۰%)

منابع مالی: پژوهش حاضر تحت حمایت مالی پژوهشگاه بیوتکنولوژی کشاورزی در قالب طرح مصوب ۹۱۵۷-۰۵-۰۵-۰۱۴ انجام شد.

منابع

1-Assareh MH, Sardabi H. Macropropagation and micropropagation of Ziziphus spina-christi. Pesquisa Agropecuária Brasileira. 2005;40(5):459-65.

2- Ghouth K. Ziziphus jujube the neglected fruit. Mashhad: Saeedi Manesh; 2009. [Persian]

3- Depommier D. Ziziphus mauritiana Lam, culture and use in Kapsiki (North Cameroon). Bois & Forêts des Tropiques existe depuis. 1988;218(4):57-62. [French]

4- Abass NH. Rapid in vitro Multiplication and ex vitro Rooting of Zizyphus mauritiana. J Appl Sci Res. 2010;6(1):63-9.

5- Chen ZL, Yan ZL, Xue H, Feng XD, Chen GL, Cao JY. In vitro culture of leaves and plantlet regeneration of Ziziphus jujube, Zhanhua Dongzao. Plant Physiol Commun. 2002;38(6):584.

6- Sudhersan C, Hussain J. In vitro clonal propagation of a multipurpose tree, Ziziphus spina-christi (L.) desf. Turk J Bot. 2003;27:167-71.

7- Al-Sulaiman MA, Barakat MN. In vitro shoot multiplication of Ziziphus spina-christi by shoot tip culture. Afr J Biotechnol. 2010;9(6):850-7.

8- Al-Sulaiman MA. Clonal propagation of Ziziphus spina-christi by shoot tip culture: I. improved inorganic and organic media constituents for in vitro shoot multiplication. J King Abdulaziz Univ Meteorol Environ Arid Land Agric Sci. 2010;21(2):3-17.

9- Feng JC, Yu XM, Shang XL, Li JD, Wu YX. Factors influencing efficiency of shoot regeneration in Ziziphus jujuba Mill. 'Huizao'. Plant Cell Tissue Organ Cult. 2010;101(1):111-7.

10- Ma C, Ye X, Chen Y, Feng J, Shang X, Li J, et al. Anatomical observations of adventitious bud regeneration from leaf explants of Ziziphus jujube Mill. 'Huizao'. Hortic Environ Biotechnol. 2012;53(4):316-9.

11- Pourhosseini L, Jafarkhani Kermani M, Habashi AA, Khalighi A. Effciency of direct and indirect shoot organogenesis in different genotypes of Rosa hybrida. Plant Cell Tissue Organ Cult. 2013;112(1):101-8.

12- Dohm A, Ludwig C, Schilling D, Debener T. Transformation of roses with genes for antifungal proteins to reduce their susceptibility to fungal diseases, Int Soc Hortic Sci Acta Hortic. 2002;572:105-11.

13- Zakizadeh H, Stummann BM, Lütken H, Müller R. Isolation and characterization of four somatic embryogenesis receptor-like kinase (RhSERK) genes from miniature potted rose (Rosa hybrida cv. Linda). Plant Cell Tissue Organ Cult. 2010;101(3):331-8.

14- Kucharska D, Orlikowska T. Enhancement of in vitro organogentic capacity of rose by preculture of donor shoots on the medium with thidiazuron. Acta Physiol Plant. 2009;31(3):495-500.

15- Fasolo F, Zimmerman RH, Fordham I. Adventitious shoot formation on excised leaves of in vitro grown shoots of apple cultivars. Plant Cell Tissue Organ Cult. 1989;16(2):75-87.

16- Chevreau E, Skirvin R, Abu-Qaoud HA, Korban SS, Sullivan JG. Adventitious shoot regeneration from leaf

Archive of SID
www.SID.ir

tissue of three pear (Pyrus sp.) cultivars in vitro. Plant Cell Rep. 1989;7(8):688-91.
17- Van Nieuwkerk JP. Thidiazuron stimulation of apple shoot proliferation in vitro. Hortic Sci. 1986;21(3):516-18.
18- Yusnita S, Geneve RL, Kester ST. Micropropagation of white flowering eastern redbud (Cercis canadensis var. alba L.). J Environ Hortic. 1990;8(4):177-9.
19- Gu XF, Zhang JR. An efficient adventitious shoot regeneration system for Zhanhua winter jujube (Zizyphus jujuba Mill.) using leaf explants. Plant Cell Rep. 2005;23(12):775-9.
20- Ahn YJ, Vang L, McKeon TA, Chen GQ. High-frequency plant regeneration through adventitious shoot formation in castor (Ricinus communis L.). Vitro Cell Dev Biol Plant. 2007;43(1):9-15.
21- Beck MJ, Camper ND. Shoot regeneration from petunia leaf discs as a function of explants size, configuration and benzyladenine exposure. Plant Cell Tissue Organ Cult. 1991;26(2):101-6.

Archive of SID

www.SID.ir