Archive of SID

Iranian Journal of Field Crop Science
Vol 51, No 4, Winter 2021 (111-120)
DOI: 10.22059/ijfcs.2020.301447.654714

علوم گیاهان زراعی ایران
دورهٔ ۵۱، شمارهٔ ۴، زمستان ۱۳۹۹ (ص ۱۲۰-۱۱۱)

بررسی اثر ریزنمونه و غلظت تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی بر کال‌زایی در گیاه *Stipagrostis pennata*

معصومه اسدی آقبلاقی[۱]، فرزاد شریف زاده*[۲]، منصور امیدی[۳]

۱و۲و۳- به‌ترتیب دانشجوی دکتری، دانشیار و استاد، گروه زراعت و اصلاح نباتات، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران

(تاریخ دریافت:۱۳۹۹/۲/۳ - تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۶/۲۶)

چکیده

گیاه *Stipagrostis pennata* برای تقویت پوشش گیاهی مناطق کویری و همچنین تثبیت شن‌های روان کاشته می‌شود و به‌دلیل مشکل تولید بذر در این گیاه، این پژوهش با هدف القا کالوس در این گیاه انجام گرفت. تیمارهای آزمایش شامل دو نوع ریزنمونه (گره ساقه و بذر)، چهار سطح توفوردی کلروفنوکسی استیک اسید (2,4-D) با غلظت‌های یک، دو، سه و چهار میلی‌گرم در لیتر و پنج سطح بنزیل آمینوپورین (BAP) با غلظت‌های صفر، ۰/۰۵، ۰/۱، ۰/۲ و ۰/٤ میلی‌گرم در لیتر بودند که در محیط کشت پایه موراشینگ و اسکوگ اعمال شدند. این پژوهش به‌صورت فاکتوریل و بر پایه طرح کاملاً تصادفی در سه تکرار انجام شد. ریزنمونه بذر در تیمارهای سه میلی‌گرم در لیتر توفوردی به همراه ۰/٤ و ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر بنزیل-آمینوپورین، بیش‌ترین درصد القا کالوس (صد در صد) را نشان داد، درحالی‌که بالاترین درصد القا کالوس، در ریزنمونه گره ساقه (٦۰ درصد) در تیمار سه میلی‌گرم در لیتر توفوردی به همراه ۰/٤ میلی‌گرم در لیتر بنزیل‌آمینوپورین به‌دست آمد. در مورد صفات سطح و وزن تر کالوس برای هر دو ریزنمونه و حجم کالوس در ریزنمونه بذر نیز تیمار سه میلی‌گرم در لیتر توفوردی به همراه ۰/٤ میلی‌گرم در لیتر بنزیل‌آمینوپورین، به‌عنوان تیمار بهینه شناخته شد. ریزنمونه گره ساقه در تیمار دو میلی‌گرم در لیتر توفوردی به همراه ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر بنزیل‌آمینوپورین، بیش‌ترین حجم کالوس را تولید کرد. به‌طورکلی می‌توان ریزنمونه بذر در ترکیب هورمونی غلظت‌های سه میلی‌گرم بر لیتر توفوردی به همراه ۰/٤ میلی‌گرم در لیتر بنزیل-آمینوپورین را به‌عنوان پروتکل بهینه‌سازی شده معرفی کرد.

واژه‌های کلیدی: اکسین، پینه‌زایی، سیتوکینین، کشت بافت، گیاه سبد.

Effect of explants and concentrations of plant growth regulators on callus induction in *Stipagrostis pennata*

Masoumeh Asadi Aghbolaghi[1], Farzad Sharifzadeh[1*], Mansoor Omidi[1]

1. Department of Agronomy and Plant Breeding, College of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran, Iran.

(Received: April 22, 2020- Accepted: September 16, 2020)

ABSTRACT

Stipagrostis pennata is one of the most important desert species to cover desert areas as well as to bind the sand which unfortunately cannot produce the best quality seed for its survival. This research was conducted to callus induction and experimental treatments included two types of explants (stem and seed), four various concentrations of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) consists of 1, 2, 3 and 4 mg /L and five levels of 6-benzylaminopurine (BAP) consists of 0, 0.05, 0.1, 0.2 and 0.4 mg /L were applied to the Murashing and Skoog basal media. This study was conducted as a factorial experiment based on completely randomized design with three replications. Results showed a significant interaction effect among explants, auxin and cytokinin on the traits related to callus induction. Seed explant showed the maximum of callus induction percentage (100%) in medium containing 3 mg/l 2,4-D with both 0.4 or 0.2 mg/l of BAP. The highest percentage of callus induction in stem node explant (60%) was obtained in 3 mg/l 2,4-D with 0.4 mg/l BAP treatment. For the surface and fresh weight of callus in both explants and the volume of callus in seed explant, 3 mg/l 2,4-D with 0.4 mg/l BAP was recognized as the best treatments. Stem node explant in the of 2 mg/l 2,4-D with 0.1 mg/l BAP treatment showed the highest volume of callus. In general, the use of seed explant in mg/l 2,4-D and 0.4 mg/l BAP treatment can be introduced as an optimized protocol.

Keywords: Bread Auxin,callus induction, cytokinin, *Stipagrostis pennata*, tissue Culture.

* Corresponding author E-mail: sharifz@ut.ac.ir

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

گیاه *Stipagrostis pennata* متعلق به جنس Stipagrostis ، طایفه Aristideae و تیره Poaceae، گونه‌ای علفی، چندساله، دارای ساقه‌های زیرزمینی رونده، ماسه‌دوست، خوش‌خوراک و مقاوم به خشکی است که در زبان فارسی به آن سبد یا بسط گفته می‌شود و در شرایط سخت محیطی ماسه‌زارها و با وجود طوفان‌های سهمگین، گرمای شدید و کمبود رطوبت، امکان رشد و نمو، زادآوری و تجدید حیات را دارد (Biroodian, 2001). طول ریشه‌های توزیع شده این گیاه را به‌طور متوسط سه تا هفت متر برآورد نموده‌اند (Batooli, 2003). از طرفی، وجود برگ‌های باریک و کشیده با ظاهری خشن، از اتلاف آب جلوگیری می‌کند. با توجه به این ویژگی‌های بارز، این گیاه از گیاهان مهم مرتعی برای توسعه و اصلاح مراتع خشک معرفی شده است (Moghimi, 2005). گیاه سبد جزو گیاهان مهم پوششی مراتع می‌باشد که به‌دلیل خصوصیات رویشی، نقش بالا در تثبیت شن‌های روان و حفاظت خاک از فرسایش دارد. همچنین از گیاهچه‌های گیاهان دیگر در برابر چرا حفاظت می‌کند و رطوبت مورد نیاز این گیاهان را تأمین می‌کند. علوفه تولیدی این گیاه، دارای حجم زیاد و بسیار خوش‌خوراک است که در مناطق حاشیه کویر، توسط انواع دام به‌خصوص شتر مورد استفاده قرار می‌گیرد (Tian *et al*., 2019). گیاه سبد، به‌دلیل وجود اندام‌های هوایی طویل قابل ملاحظه، در برابر طوفان شن و فرسایش بادی، مقاومت خوبی از خود نشان می‌دهد و وجود غلافی از شن‌دانه در اطراف سیستم ریشه، همچون عایقی از تماس مستقیم نور و حرارت به ریشه‌ها جلوگیری می‌کند و بردباری گیاه را در برابر شرایط گرما و خشکی افزایش می‌دهد؛ بنابراین گونه سبد به‌عنوان یکی از گونه‌های شن‌دوست در تپه‌های ماسه‌ای معرفی شده است (Amirabadi-zadeh & Borhan, 1993). با وجود این ویژگی‌های مطلوب، پتانسیل تولید بذر در این گیاه پایین است و بذرهای تولیدی نیز فاقد توان جوانه‌زنی و شانس بقا در این مناطق می‌باشند (Tian *et al*., 2019). بنابراین با توجه به اهمیت این گونه، بررسی امکان تکثیر غیرجنسی و استفاده از تکنیک کشت بافت برای احیاء و تولید انبوه آن حائز اهمیت می‌باشد.

تکنیک کشت بافت، یکی از روش‌های مطلوب در تکثیر سریع گیاهان سالم و یکنواخت و نیز تولید گیاهان مقاوم است که امروزه کاربردهای فراوان دارد. تکثیر با استفاده از این تکنیک، در راستای تولید انبوده گیاهان با کیفیت، بسیار متداول است که روش‌های مختلفی برای آن استفاده می‌شوند؛ از جمله این روش‌ها می‌توان به تکثیر با استفاده از کال‌زایی اشاره نمود (keyhanfar, 2014). بافت کالوس، کاربردهای مختلفی در ازدیاد گیاه دارد. از مهم‌ترین این کاربردها، استفاده کالوس برای تکثیر گیاه از دو طریق عمده اندام‌زایی و جنین‌زایی می‌باشد (Kayser & Quax, 2006). طبق تحقیقی، نوع ریزنمونه بر میزان کال‌زایی تاثیر معنی‌داری دارد (Gholami and Tarinejad, 2018). همچنین میزان کالوس‌زایی در سیب‌زمینی به‌طور معنی‌داری تحت تاثیر نوع ریزنمونه و میزان هورمون قرار گرفت (Amerian, 2018). بررسی امکان کال‌زایی در گیاه بریش (*Hyparrhenia hirta* L.)، گویای تاثیر نوع ریزنمونه و ترکیب هورمونی بر صفات کال‌زایی بود (Salimi, 2010).

با توجه به ابداع روش‌های باززایی غیرمستقیم به‌واسطه کال‌زایی، بر آن شدیم که در مسیر تعیین بهترین روش تکثیر غیرجنسی این گیاه و ارایه آن به مراجع زیربط، اقدامی در جهت احیای اراضی بیابانی انجام دهیم. هدف از این تحقیق، شناسایی مناسب‌ترین ریزنمونه و تیمار هورمونی در راستای القاء کالوس در گیاه سبد می‌باشد.

مواد و روش‌ها

این آزمایش در سال ۱۳۹۸ در آزمایشگاه کشت بافت گروه زراعت و اصلاح نباتات پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران انجام شد. گیاهان مورد مطالعه از منطقه کرخه استان خوزستان جمع‌آوری و به گلخانه منتقل شدند. در این آزمایش، از دو نوع ریزنمونه شامل گره ساقه (اندازه تقریبی یک سانتی‌متر) و بذر استفاده شد. ریزنمونه‌ها از گیاهان جدا شدند و در سریع‌ترین

www.SID.ir

Archive of SID

زمان ممکن در ظرف دربسته به آزمایشگاه منتقل شدند. جهت ضدعفونی آن‌ها، ابتدا در اتانول ۷۰ درصد به مدت یک دقیقه قرار گرفتند و پس از آبکشی با آب مقطر استریل، ۱۰ دقیقه در محلول هیپوکلریت سدیم دو درصد (حاوی پنج درصد کلر فعال) غوطه‌ور شدند. در انتها، سه بار با آب مقطر استریل آب‌کشی شدند و به مدت ۳۰ دقیقه در زیر هود استریل خشک شدند.

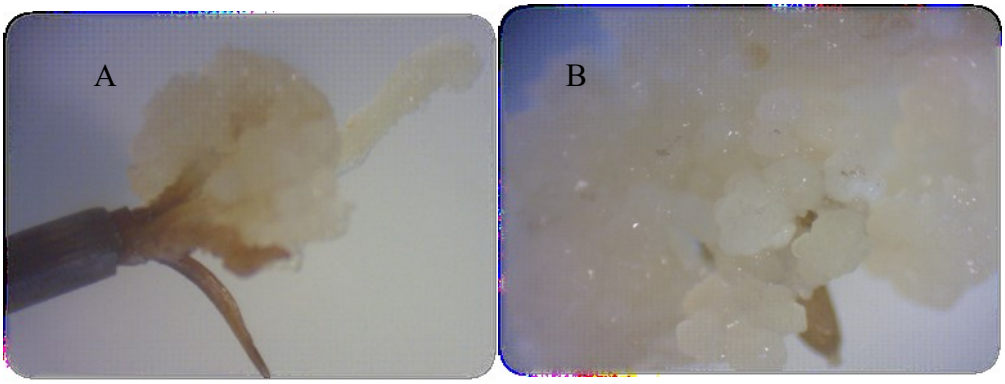
تیمارهای هورمونی شامل چهار سطح (یک، دو، سه و چهار میلی‌گرم در لیتر) هورمون اکسین ۲و۴ – دی کلروفنوکسی استیک اسید (2,4-D) و پنج سطح سیتوکنین بنزیل‌آمینوپورین (BAP) (صفر، ۰/۰۵، ۰/۱، ۰/۲ و ۰/۴ میلی‌گرم در لیتر) بودند. کلیه تیمارهای هورمونی به محیط کشت پایه اماس (Murashige and Skoog, 1962) دارای سه درصد ساکارز و ۰/۷ درصد آگار با pH ۵/۶ - ۵/۸ اضافه شدند و در اتوکلاو با دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد و فشار ۱/۲ بار به مدت ۲۰ دقیقه ضدعفونی شدند. به منظور القای کال‌زایی، ریزنمونه‌ها به پتری‌دیش‌های حاوی محیط کشت منتقل شدند و در انکوباتور در شرایط تاریکی با دمای ۲۵±۲ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند.

یک هفته پس از کشت ریزنمونه‌ها، تشکیل کالوس آغاز شدد. کالوس‌های تشکیل شده، سفیدرنگ، شفاف و دارای بافت نرم بودند. پس از سپری شدن حدود یک ماه، تعداد ریزنمونه‌هایی که تولید کالوس کردند، شمارش شدند و درصد کال‌زایی به‌صورت نسبت تعداد ریزنمونه‌هایی که کالوس در آن‌ها القا شده به تعداد کل ریزنمونه‌ها، برای هر تیمار محاسبه شد. بررسی ابعاد کالوس‌ها با استفاده از اندازه‌گیری سطح (با واحد میلی‌متر مربع) و حجم (با واحد میلی‌متر مکعب) آن‌ها صورت گرفت. به‌دلیل نامنظم بودن شکل کالوس، سطح کالوس با استفاده از کاغذ میلی‌متری و با ضرب کردن بزرگ‌ترین طول در بزرگ‌ترین عرض کالوس به‌دست آمد (Pirouzi, 2018). همچنین حاصل ضرب بزرگ‌ترین ارتفاع در سطح کالوس، به‌عنوان حجم آن در نظر گرفته شد (Pirouzi, 2018). وزن تر کالوس‌ها (با واحد گرم) نیز با استفاده از ترازوی دیجیتال با دقت ده هزارم در زیر هود استریل، اندازه‌گیری شد.

این تحقیق به‌صورت فاکتوریل و در قالب طرح کاملا تصادفی با سه تکرار انجام شد که برای هر تکرار، سه پتری‌دیش و برای هر پتری‌دیش پنج ریزنمونه در نظر گرفته شد. بررسی آماری داده‌ها با استفاده از نرم افزار SAS 9.2 انجام شد. تیمارها به کمک روش Proc glm و بر اساس آزمون چند دامنه‌ای دانکن در پنج درصد گروه‌بندی شدند و نمودارها با استفاده از نرم افزار Excel ۲۰۱۶ رسم شدند.

نتایج و بحث

پس از گذشت یک هفته از اعمال تیمارها، القا کالوس در آن‌ها مشاهده شد که در ابتدا، کالوس‌ها سفید و خمیری بودند، اما پس از گذشت یک ماه، به کالوس‌های کرم‌رنگ و شکری تبدیل شدند (شکل ۱).



شکل ۱- القا کالوس در ریزنمونه ساقه (A) و بذر (B) در گیاه سبد.

Figure 1. Callus induction in seed (A) and stem node (B) explants in *Stipagrostis pennata*.

نتایج تجزیه واریانس نشان داد که اثر متقابل غلظت‌های مختلف هورمون توفوردی، بنزیل‌آمینوپورین و نوع ریزنمونه بر روی صفات درصد کال‌زایی، سطح، حجم و وزن تر کالوس، در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار

www.SID.ir

Archive of SID

بود (جدول ۱).

جدول ۱- تجزیه واریانس اثر غلظت‌های مختلف هورمون توفوردی، بنزیل‌آمینوپورین و ریزنمونه‌های مختلف بر صفات کال‌زایی در گیاه سبد.

Table 1. Variance analysis of the effect of different concentrations of 2,4-dichlorophenoxy (2,4-D), 6-Benzylaminopurine (BAP) and different explants on the callus induction characteristics of *Stipagrostis pennata*.

S.O.V	df	Mean squares			
		callus induction percentage	callus surface	callus volume	callus fresh weight
BAP	4	**875.4	**2116.9	**27963.1	0.104**
2,4-D	3	*133.4	**1145.5	**4739.1	0.363**
P	1	**136822	**329.9	**17828.3	2.63**
BAP × 2,4-D	12	**556.7	**642.5	**5225.4	0.04**
BAP × P	4	324.9**	**985.1	**5638.6	0.03**
2,4-D × P	3	*80.4	**386.7	**3020.9	0.13**
BAP × 2,4-D × P	12	**520.5	**406.3	**2621.9	0.05**
Error	80	27.6	8.9	60.7	0.002
CV(%)	-	9.2	11.1	9.5	11.7

BAP: بنزیل‌آمینوپورین، 2,4-D: توفوردی، P: ریزنمونه؛ ** و *: به‌ترتیب معنی‌دار در سطح احتمال یک و پنج درصد.

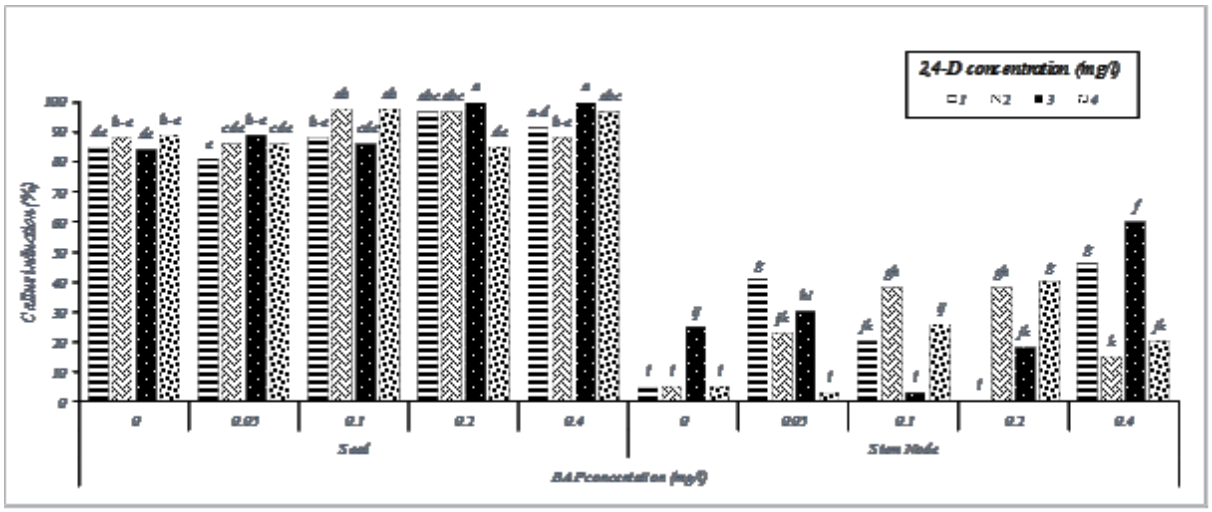
BAP: 6-Benzylaminopurine, 2,4-D: 2, 4-dichlorophenoxy, P: explant; ** and *: Significant at 1% and 5% of probability levels, respectively.

بالاترین میزان درصد کال‌زایی (صد در صد) به ریزنمونه بذر و غلظت سه میلی‌گرم در لیتر هورمون توفوردی به همراه غلظت میلی‌گرم در لیتر ۰/۴ و ۰/۲ هورمون بنزیل‌آمینوپورین تعلق داشت. در تحقیقی بر روی کال-زایی در گیاه گندم، بالاترین درصد القا کالوس در محیط کشت حاوی یک میلی‌گرم بر لیتر توفوردی به‌دست آمد که از نظر غلظت بهینه توفوردی، با نتایج پژوهش پیش رو مطابقت ندارد (Hakam *et al*., 2015)، اما کاملا با نتایج تحقیقی در زمینه بررسی کال‌زایی در گیاه بریش هم‌خوانی دارد (Salimi, 2010). در پژوهش دیگری، بالاترین میزان القا کالوس در گیاه *Eleusine coracana* در محیط اماس حاوی غلظت ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر اکسین مشاهده شد (Kashyap *et al*., 2018). هم‌چنین کم‌ترین درصد کال‌زایی در ریزنمونه ساقه در تیمارهای بدون بنزیل‌آمینوپورین و غلظت‌های یک، دو و چهار میلی‌گرم در لیتر توفوردی (پنج درصد)، توفوردی سه میلی‌گرم در لیتر به همراه ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر بنزیل-آمینوپورین (سه درصد) و توفوردی چهار میلی‌گرم در لیتر به همراه ۰/۰۵ میلی‌گرم در لیتر بنزیل‌آمینوپورین (سه درصد) مشاهده شد و در تیمار یک میلی‌گرم در لیتر توفوردی در ترکیب با ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر بنزیل-آمینوپورین کال‌زایی صورت نگرفت (شکل ۲).

تیمار هورمونی سه میلی‌گرم در لیتر توفوردی به همراه ۰/۴ میلی‌گرم در لیتر بنزیل‌آمینوپورین در ریزنمونه بذر، بیش‌ترین میزان سطح کالوس (۶۵/۶ میلی‌متر مربع) را دارا بود که با همین ترکیب هورمونی در ریزنمونه گره ساقه (۶۱/۶ میلی‌متر مربع) تفاوت معنی-داری نداشت. از طرف دیگر، ریزنمونه گره ساقه در ترکیب‌های هورمونی سه میلی‌گرم توفوردی در لیتر و ۰/۱ میلی‌گرم بنزیل‌آمینوپورین در لیتر (چهار میلی‌متر مربع)، یک، دو و چهار میلی‌گرم توفوردی در لیتر بدون بنزیل‌آمینوپورین و چهار میلی‌گرم توفوردی در لیتر همراه با ۰/۰۵ میلی‌گرم بنزیل‌آمینوپورین در لیتر (سه میلی‌متر مربع)، کم‌ترین میزان سطح کالوس را نشان دادند (شکل ۳).

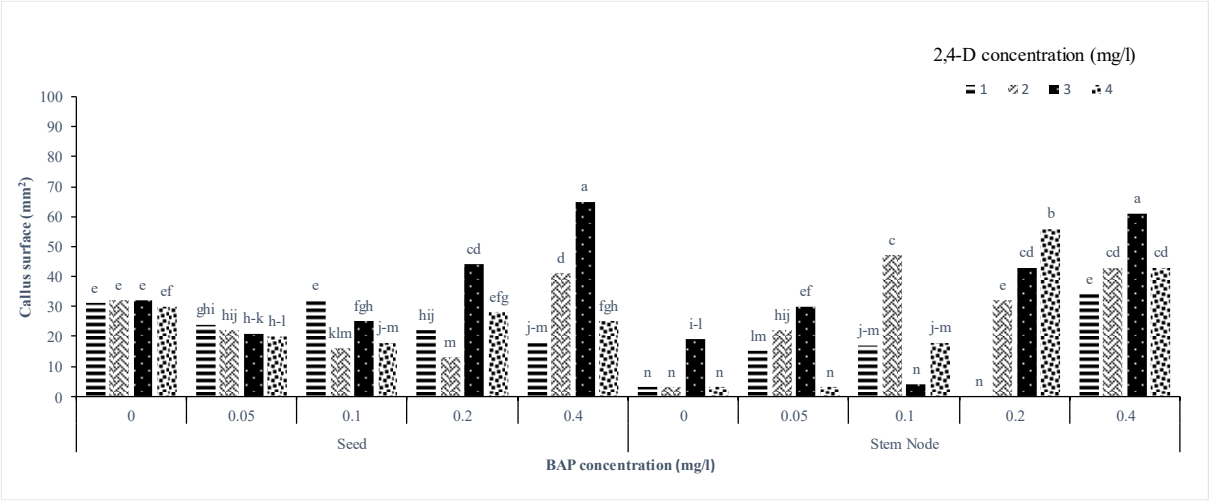
www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۲- مقایسه میانگین درصد القا کالوس در ریزنمونه‌های گره ساقه و بذر گیاه سبد، تحت تاثیر غلظت‌های مختلف 2,4-D و BAP. میانگین‌های دارای حروف مشابه، با یکدیگر تفاوت معنی‌دار ندارند (آزمون دانکن، $p<0.05$).

Figure2. Means comparison of callus induction percentage of stem node and seed explants of *Stipagrostis pennata* under different concentrations of 2,4-D and BAP. Means with the same letters are not significantly different (Duncan test, $p<0.05$).



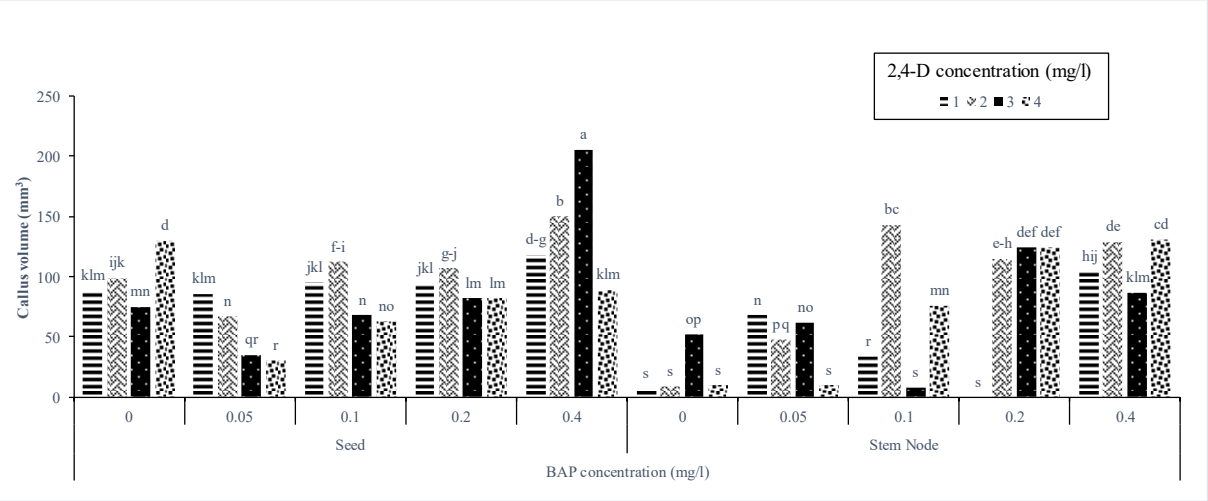
شکل ۳- مقایسه میانگین سطح کالوس حاصل از ریزنمونه‌های گره ساقه و بذر گیاه سبد، تحت تاثیر غلظت‌های مختلف 2,4-D و BAP. میانگین‌های دارای حروف مشابه، با یکدیگر تفاوت معنی‌دار ندارند (آزمون دانکن، $p<0.05$).

Figure 3. Means comparison of callus surface of *Stipagrostis pennata* stem node and seed explants under different concentrations of 2,4-D and BAP. Means with the same letters are not significantly different (Duncan test, $p<0.05$).

بیش‌ترین میزان حجم کالوس (۲۰۵ میلی‌متر مکعب) در تیمار سه میلی‌گرم توفوردی در لیتر به همراه ۰/۴ میلی‌گرم بنزیل‌آمینوپورین در لیتر در ریزنمونه بذر مشاهده شد و ریزنمونه گره در تیمارهای چهار میلی‌گرم توفوردی در لیتر بدون بنزیل‌آمینوپورین و نیز با ۰/۰۵ میلی‌گرم بنزیل‌آمینوپورین در لیتر (۱۰ میلی‌متر مکعب)، دو میلی‌گرم توفوردی در لیتر بدون بنزیل-آمینوپورین (نه میلی‌متر مکعب)، سه میلی‌گرم توفوردی در لیتر همراه با ۰/۱ میلی‌گرم بنزیل‌آمینوپورین در لیتر (هشت میلی‌متر مکعب) و یک میلی‌گرم توفوردی در لیتر بدون بنزیل‌آمینوپورین (هفت میلی‌متر مکعب)، دارای کم‌ترین میزان حجم کالوس بودند (شکل ۴).

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۴- مقایسه میانگین حجم کالوس حاصل از ریزنمونه‌های گره ساقه و بذر گیاه سبد تحت تاثیر غلظت‌های مختلف 2,4-D و BAP. میانگین‌های دارای حروف مشابه، با یکدیگر تفاوت معنی‌دار ندارند (آزمون دانکن، $p<0.05$).

Figure 4. Means comparison of callus volume of *Stipagrostis pennata* stem node and seed explants under different concentrations of 2,4-D and BAP. Means with the same letters are not significantly different (Duncan test, $p<0.05$).

کالوس‌های حاصل از ریزنمونه بذر در تیمار هورمونی سه میلی‌گرم توفوردی در لیتر به همراه ۰/۴ میلی‌گرم بنزیل‌آمینوپورین در لیتر، بیش‌ترین وزن تر (۰/۸۳ گرم) را نشان دادند و کم‌ترین میزان وزن تر (صفر) در ریزنمونه گره تحت تیمار ۰/۲ میلی‌گرم بنزیل-آمینوپورین در لیتر به‌همراه یک میلی‌گرم هورمون توفوردی در لیتر مشاهده شد که با تیمارهای یک میلی‌گرم توفوردی در لیتر بدون بنزیل‌آمینوپورین، دو میلی‌گرم توفوردی در لیتر بدون بنزیل‌آمینوپورین، سه میلی‌گرم توفوردی در لیتر به‌همراه ۰/۱ میلی‌گرم نزیل-آمینوپورین در لیتر بو چهار میلی‌گرم توفوردی در لیتر بدون بنزیل‌آمینوپورین و با ۰/۰۵ میلی‌گرم بنزیل-آمینوپورین در لیتر برای همین ریزنمونه، تفاوت معنی-داری نداشت (شکل ۵). نتایج پژوهشی با هدف کالوس-زائی و اندام‌زائی از جداکشت‌های مختلف گیاه علف مار (*Capparis spinosa* L.) تحت شرایط درون شیشه-اینشان داد که بهترین ترکیبات هورمونی برای کالوس-دهی از نظر میانگین وزن تر کالوس، محیط کشت موراشیگ و اسکوک حاوی ۰/۰۲ میلی‌گرم نفتالین استیک اسید بر لیتر و یک میلی‌گرم کینتین در لیتر بود (Sheikhi Hamouleh *et al*., 2019).

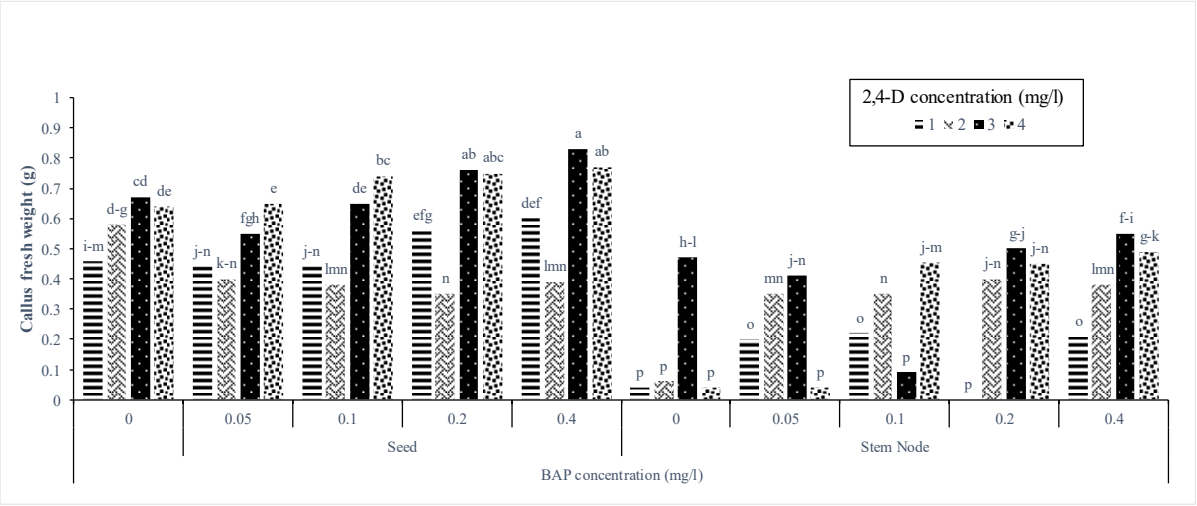
محدوده درصد کالوس‌زایی در ریزنمونه بذر، از ۸۱ درصد تا صد در صد و در ریزنمونه ساقه، از صفر تا ۶۰ درصد بود که نشان از برتربودن ریزنمونه بذر در راستای تولید کالوس می‌باشد (شکل ۲). همچنین محدوده حجمی کالوس‌های به‌دست آمده از ریزنمونه بذر (از ۳۰ تا ۲۰۵ میلی‌متر مکعب)، در سطح بالاتری از این محدوده در ریزنمونه گره ساقه (از صفر تا ۱۴۳ میلی‌متر مکعب) قرار داشت (شکل ۴). این موضوع در مورد صفت وزن تر کالوس (محدوده ریزنمونه بذر= از ۰/۳ تا ۰/۸ گرم و ریزنمونه گره ساقه= از صفر تا ۰/۵) هم صادق بود (شکل ۵).

تحقیقات متعددی، گویای تاثیرگذاری عوامل خارجی و داخلی بر نتایج حاصل از کشت بافت می‌باشد که از جمله این عوامل می‌توان به نوع ریزنمونه، ترکیبات محیط کشت و شرایط فیزیکی محیط اشاره کرد (Torres, 1989; Lal *et al*., 2016). مقایسات میانگین اثرات ریزنمونه، نوع و سطوح هورمونی بر صفات کال-زایی گیاه *Stipagrostis pennata* در پژوهش حاضر نشان داد که نوع ریزنمونه و نوع و غلظت تنظیم‌کننده-های رشدی به‌کار رفته، اثر معنی‌داری بر تولید کالوس داشت. بر اساس نتایج یک تحقیق، کالوس‌زایی در گندم

www.SID.ir

Archive of SID

به ژنوتیپ، نوع ریزنمونه و ترکیبات محیط کشت بستگی دارد (Gholami & Tarinejad, 2018). همچنین بررسی کال‌زایی در گیاه *Agropyron cristatum* نشان داد که حضور پیکلورام در محیط کشت، نقش به‌سزایی داشته است، به‌طوری‌که بیش‌ترین وزن تر کالوس، در غلظت هشت میلی‌گرم پیکلورام در لیتر تولید شد (Can *et al*., 2008). در مورد گیاه *Pennisetum purpureum* نیز توفوردی و بنزیل-آمینوپورین، اثر خود را نشان دادند، به‌طوری‌که حضور دو میلی‌گرم توفوردی در لیتر به همراه ۰/۵ میلی‌گرم بنزیل‌آمینوپورین در لیتر در محیط کشت نسبت به حضور تنها ۰/۵ میلی‌گرم توفوردی در لیتر، نقش موثرتری در تولید کالوس داشت (Umami *et al*., 2016).



شکل ۵- مقایسه میانگین وزن تر کالوس حاصل از ریزنمونه‌های گره ساقه و بذر گیاه سبد تحت تاثیر غلظت‌های مختلف 2,4-D و BAP. میانگین‌های دارای حروف مشابه، با یکدیگر تفاوت معنی‌دار ندارند (آزمون دانکن، $p<0.05$).

Figure 5. Means comparison of callus fresh weight of *Stipagrostis pennata* stem node and seed explants under different concentrations of 2,4-D and BAP. Means with the same letters are not significantly different (Duncan test, $p<0.05$).

طبق نتایج این تحقیق، استفاده از گره ساقه نتوانست مقدار کالوس مورد انتظار را فراهم کند که با نتایج تحقیقی بر روی Brachiaria مطابقت داشت (Cabral *et al*., 2011). اگرچه که استفاده از این سیستم برای *B. brizantha* توانست کالوس‌های جنین-زا تولید کند، اما آن‌ها نتوانستند به گیاه تبدیل شوند. همچنین گزارش شده است که استفاده از بافت‌های رویشی به‌عنوان ریزنمونه برای تولید کالوس در تک‌لپه-ای‌ها مشکل است و گیاهان محدودی تولید می‌کند (Chaudhury & Qu, 2000).

واکنش متفاوت ریزنمونه‌ها از لحاظ کالوس‌زایی به تغییرات غلظت تنظیم‌کننده‌های رشدی می‌تواند مربوط به فیزیولوژی گیاه منبع ریزنمونه‌ها (گیاه پایه) باشد که تاثیر عمیقی بر روی پاسخ‌دهی در شرایط درون شیشه-ای دارد. اگرچه گیاهان حاصل از تکثیر رویشی (کلون‌ها)، از لحاظ ژنتیکی کاملا شبیه گیاه مادری هستند، اما توده کلونی حاصل از یک گیاه مادری با توده کلونی حاصل از گیاه مادری دیگر متفاوت است (Merkle *et al*., 1990).

با وجود این‌که هر دو هورمون به‌کار رفته در این پژوهش (2.4-D و BAP) بر القاء کالوس تاثیر قابل توجهی داشتند، اما غلظت متوسط توفوردی توانست نقش مهمی ایفا کند که با نتایج تحقیقات در گذشته مطابقت داشت (Binte Mostafiz & Wagiran, 2018; Bi *et al*, 2007; Amerian, 2018). تحقیقات نشان داد که بدون حضور اکسین، کال‌زایی مشاهده نخواهد شد. همچنین گزارش شده است که بهترین نوع اکسین برای

www.SID.ir

Archive of SID

القای کال‌زایی در تک‌لپه‌ای‌ها، توفوردی می‌باشد (Iqbal *et al*., 2016)که غلظت آن علاوه بر القای کالوس، بر درصد کال‌زایی، بافت و رنگ کالوس نیز موثر است (Khalafalla *et al*., 2010). علاوه بر این نشان داده‌اند که غلظت متوسط اکسین به همراه غلظت بالای بنزیل‌آمینوپورین می‌تواند نقش مهمی در تشکیل کالوس داشته باشد (Bi *et al*., 2007).

در پژوهش حاضر، استفاده از ریزنمونه بذر و غلظت متوسط هورمون توفوردی در ترکیب با غلظت بالای هورمون بنزیل‌آمینوپورین، نتایج مطلوبی در صفات اندازه‌گیری‌شده نشان داد، به‌طوری‌که سه میلی‌گرم هورمون توفوردی در لیتر در ترکیب با ۰/۴ میلی‌گرم هورمون بنزیل‌آمینوپورین در لیتر در ریزنمونه بذر، بیش‌ترین درصد القا کالوس (صد در صد) را به‌همراه داشت به‌علاوه، کیفیت کالوس‌های به‌دست‌آمده از لحاظ سطح و حجم در هنگام استفاده از این ترکیب هورمونی نسبت به سایر تیمارها، نتایج بهتری را نشان دادند. نتایج حاصل از این پژوهش نشان داد که ترکیب هورمونی توفوردی و بنزیل‌آمینوپورین در محیط کشت، بر روی کال‌زایی و صفات مربوط به آن موثر می‌باشد، به‌طوری‌که حضور همزمان اکسین و سیتوکینین، در القای تقسیمات سلولی و تمایزات سلولی ضروری بود و تقسیمات سلولی، موجب تشکیل کالوس و تمایز سلولی، موجب اندام‌زایی شد. با افزایش غلظت توفوردی در محیط کشت، افزایش تقسیمات سلولی در سطح ریزنمونه و در نتیجه افزایش وزن تر و خشک کالوس مورد انتظار خواهد بود (Haque *et al*., 2003). تنوع در فراوانی تولید کالوس در پاسخ به سطوح مختلف هورمونی، می‌تواند به‌دلیل تمایز در بیان ژن‌های کنترل-کننده تولید کالوس باشد. با این وجود، ممکن است که در بعضی از سطوح هورمونی مورد استفاده، برخی از ژن های مسئول در سنتز کالوس، به‌طور کامل بیان نشوند (Mahmood *et al*., 2012).

طبق بررسی‌های صورت گرفته، تاکنون گزارشی مبنی بر استفاده از فن‌آوری کشت بافت در ریزازدیادی گیاه *Stipagrostis pennata* منتشر نشده است و این تحقیق، اولین تحقیق تولید کالوس در این گیاه می‌باشد.

نتیجه‌گیری کلی

یافته‌های این پژوهش می‌تواند به‌عنوان یک دستورالعمل در تولید کالوس در گیاه *Stipagrostis pennata* استفاده شود. طبق نتایج این پژوهش، بیش‌ترین درصد القای کالوس در ریزنمونه بذر، در تیمارهای سه میلی‌گرم توفوردی بر لیتر به همراه ۰/۴ و نیز ۰/۲ میلی‌گرم بنزیل‌آمینوپورین در لیتر و در ریزنمونه گره ساقه، در تیمار سه میلی‌گرم توفوردی بر لیتر به همراه ۰/۴ میلی‌گرم بنزیل‌آمینوپورین در لیتر به‌دست آمد. در مورد صفت سطح کالوس، هر دو ریزنمونه بالاترین میزان را در ترکیب هورمونی سه میلی‌گرم توفوردی بر لیتر به همراه ۰/۴ میلی‌گرم بنزیل‌آمینوپورین در لیتر نشان دادند. بیش‌ترین مقدار حجم کالوس در ریزنمونه بذر، در محیط کشت حاوی سه میلی‌گرم توفوردی بر لیتر به همراه ۰/۴ میلی‌گرم بنزیل‌آمینوپورین در لیتر و در ریزنمونه گره ساقه، در ترکیب هورمونی دو میلی‌گرم توفوردی بر لیتر به همراه ۰/۱ میلی‌گرم بنزیل‌آمینوپورین در لیتر به‌دست آمد. همچنین بالاترین مقدار صفت وزن تر کالوس، در هر دو ریزنمونه در تیمار سه میلی‌گرم توفوردی بر لیتر به همراه ۰/۴ میلی‌گرم بنزیل‌آمینوپورین در لیتر حاصل شد.

اگرچه در رقابت دو ریزنمونه برای کال‌زایی، بیش‌ترین مقدار این صفت در تیمار هورمونی سه میلی‌گرم توفوردی در لیتر همراه با ۰/۴ میلی‌گرم بنزیل-آمینوپورین در لیتربه دست آمد، اما از نظر درصد کالوس‌های تولیدشده، ریزنمونه بذر برتری داشت، چرا که حتی کم‌ترین میزان کال‌زایی در بذر (۸۱ درصد)، بر بیش‌ترین میزان این صفت در ریزنمونه گره ساقه (۶۰ درصد) برتری داشت؛ اما این موضوع در مورد سایر صفات، عمومیت نداشت و با تغییر ترکیب هورمونی موجود در محیط کشت، نوساناتی در کیفیت کالوس-های تولیدشده حاصل از هر دو ریزنمونه مشاهده شد.

در انتها می‌توان استفاده از ریزنمونه بذر در ترکیب هورمونی غلظت‌های سه میلی‌گرم توفوردی بر لیتر به همراه ۰/۴ میلی‌گرم بنزیل‌آمینوپورین در لیتر را به-عنوان پروتکل بهینه‌سازی شده معرفی کرد. از این نتایج

www.SID.ir

Archive of SID

می‌توان در راستای پژوهش‌های تکمیلی و نیز اهداف
اصلاحی در رسیدن به صفات مطلوب استفاده کرد.

REFERENCES

1. Amerian, M. (2018). The Effect of growing conditions explants and growth regulators on callus induction Potato Plant (*Solanum tuberosum* L.). *Journal of Plant Research (Iranian Journal of Biology)*, 31(4). (In Persian).
2. Amirabadi-Zadeh, H. & Borhan, M. H. (1993). A report on climate and deserts of Iran and Afghanistan. Journal of Pajouhesh & Sazandegi, 21, 32-27. (In Persian).
3. Batooli, H. (2003). *Ecological study of plant communities of Kashan Rige-Boland sandy dunes*. PhD. Thesis. Islamic Azad University, Science and Research Branch, Tehran. (In Persian).
4. Bi, R. M., Kou, M., Chen, L. G., Mao, S. R. & Wang, H. G. (2007). Plant regeneration through callus initiation from mature embryo of *Triticum*. *Journal of Plant Breeding*, 126(1), 9–12.
5. Binte Mostafiz, S. & Wagiran, A. (2018). Efficient callus induction and regeneration in selected indica rice. *Journal of Agronomy*, 8(5), 77.
6. Biroodian, N. (2001). *Principles of Desert Management*. Rashad Publications, Gorgan, 28. (In Persian).
7. Cabral, G. B., Carneiro, V. T. C., Lacerda, A. L., Valle, C. B. D., Martinelli, A. P. & Dusi, D. M. D. A. (2011). Somatic embryogenesis and organogenesis in apomictic and sexual Brachiaria brizantha. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 107(2), 271–282.
8. Can. E., Çeliktaş, N. & Hatipoğlu, R. (2008). Effect of auxin type and concentrations in different media on the callus induction and shoot formation of crested wheatgrass (*Agropyron cristatum* (L.) Gaertn). *Journal of Biotechnology and Biotechnological Equipment*, 22(3), 782–786.
9. Chaudhury, A. & Qu, R. (2000). Somatic embryogenesis and plant regeneration of turf-type bermudagrass: Effect of 6-benzyladenine in callus induction medium. *Journal of plant biotechnology*, 60(2), 113–120.
10. Gholami, A. A. & Tarinejad, A. (2018). Callus induction and regeneration of bread wheat cultivars from different explants. *Journal of Cell and Tissue (JCT)*, 9(1), 25-56. (In Persian).
11. Hakam, N., Udupa, S. M., Rabha, A., Ibriz, M. & Iraq, D. (2015). Efficient callus induction and plantlets regeneration in bread wheat using immature and mature embryos. *International Journal of Biotechnology Research*, 3(1), 1-9.
12. Haque, M. A., Nath, U. K., Ahmad, Q. N. & Alam, S. (2003). Effect of 2,4-D and BAP on *in vitro* regeneration of garlic. *Journal of Biological Sciences*, 2(12), 771–774.
13. Iqbal, A., Rizwan, A., Mukhtar, Z., Mansoor, S. & Asad, S. (2016). Establishment of an efficient and reproducible regeneration system for potato cultivars grown in pakistan. *Pakistan Journal of Botany*, 48(1), 258-290.
14. Kashyap, A., Penak, S. M., Saha, A. & Singh, B. R. (2018). *In vitro* plant development of Eleusine coracana via indirect organogenesis and somatic embryogenesis using mature seeds as explants. *Current Science*, 115(1), 91-98.
15. Kayser, O., & Quax, W. (2006). *Medicinal Plant Biotechnology*. Wiley-VCH.
16. keyhanfar, M. (2014). Callus induction in Burdock (*Arctium lappa* L.). *Journal of Cellular and Molecular Research. (Iranian Journal of Biology)*, 27(2), 252-259. (In Persian).
17. Khalafalla, M. M., Elaleem, K. G. A. & Modawi, R. S. (2010). Callus formation and organogenesis of potato (*Solanum tuberosum* L.) cultivar Almera. *Journal of Phytology,* 2(5), 40–46.
18. Lal, D., Sharma, A., Tak, K. R. & Ashok, T. H. (2016). Effect of growth regulators and chemical supplements on callus induction in japonica rice varieties through anther culture. *Research in Environment and Life Sciences*, 9(7), 903-906.
19. Mahmood, I., Razzaq, A., Khan, Z. U. D., Hafiz, I. A. & Kaleem, S. (2012). Evaluation of tissue culture responses of promising wheat (*Triticum aestivum* L.) cultivars and development of efficient regeneration system. *Pakistan Journal of Botany*, 44, 277-284.
20. Merkle, S. A., Parrott, W. A. & Williams, E. G. (1990). Applications of somatic embryogenesis and embryo cloning, In: Bhojwani S. S. (Ed.) *Plant Tissue Culture*: *Applications and Limitations. Developments in Crop Science*. E*lsevier Science Publishers*, The Netherlands. 19, 67–101.
21. Moghimi, J. (2005). *Introduction of some important rangeland species suitable for Iran rangeland development and improvement*. Arvan publications, Tehran. 579. (In Persian).
22. Murashige, T. & Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15(3), 473–497.

www.SID.ir

Archive of SID

23. Pirouzi, R. (2018). *Somatic embryogenesis and synthetic seed production of Astragalus meridionalis and Hyparrhenia hirta*. MSc. Thesis. Faculty of Agricultural Sciences and Engineering, University of Tehran, Iran.
24. Salimi, Z. (2010). *Investigation of the possibility of somatic embryogenesis and synthetic seed production of Hyparrhenia hirta*. MSc. Thesis. Faculty of Agricultural Sciences and Engineering, University of Tehran, Iran.
25. Sheikhi Hamouleh, M., Fahmideh, L., Bana-Kashani, F. & Soluki, M. (2019). Callus induction and organogenesis from different explant of *Caloparis spinosa L.* under the in vitro condition. *Journal of Plant Production Research (JOPPR)*, 26 (1), 88-75. (In Persian).
26. Tian, Y., Ma, X., Li, Y., Cheng, C., Ge, F. & An, D. (2019). Relationship between microbial diversity and nitrogenase activity of *Stipagrostis pennata* rhizosheath. *Journal of Cellular Biochemistry*, 120(8), 13501-13508.
27. Torres, K. T. (1989). *Tissue culture techniques for horticulture crop*.Van Nostrand Reinhold, New York.
28. Umami, N., Akashi, R., Gondo, T., Ishigaki, G. & Tanaka, H. (2016). Study on callus induction system of 4 genotype of Napiergrass (*Pennisetum purpureum*). *Animal production*, 18(3), 131-140.

www.SID.ir