DOI: http://dx.doi.org/10.22092/ijrfpbgr.2012.6626

دو فصلنامهٔ علمی-پژوهشی تحقیقات ژنتیک و اصلاح گیاهان مرتعی و جنگلی ایران
جلد ۲۰، شمارهٔ ۱، صفحهٔ ۱۲۳-۱۱۱ (۱۳۹۰)

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

الهه احمدی[1*]، سید محمد حسینی‌نصر[2]، حمید جلیلوند[3] و حامد صالحیان آقبلاغ[4]

۱*- نویسنده مسئول مکاتبات، کارشناس‌ارشد جنگلداری، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری
پست‌الکترونیک: ahmadi_silva@yahoo.com
۲- استادیار، گروه جنگلداری دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری
۳- دانشیار، گروه جنگلداری دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری
٤- کارشناس‌ارشد بیوتکنولوژی، دانشکده علوم زراعی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری

تاریخ دریافت: ۱۳۹۰/۱۲/۰۳ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۱/۰٤/۱۱

چکیده

با توجه به دگرگُشنی گونه کُنار، لازم است برخی از پایه‌های نخبه را از طریق غیرجنسی و تکنیک کشت بافت تکثیر نمود. در این مطالعه قابلیت کالوس‌زایی و باززایی ریزنمونه برگ گونه کُنار مورد ارزیابی قرار گرفت. ریزنمونه‌های برگ بدست آمده از نهال تولید شده در شرایط درون شیشه‌ای، روی محیط کشت MS حاوی هورمون‌های 2,4-D، NAA، TDZ و BAP در سه سطح (۰/۵، ۱ و ۲ میلی‌گرم در لیتر) کشت شدند. به منظور باززایی، محیط پایه‌ی MS با سطوح مختلف از هورمون‌های BAP، TDZ و Kin (۱/۰، ۳/۰ و ۵/۰ میلی‌گرم‌درلیتر) و برای ریشه‌دار کردن گیاهچه‌ها از محیط پایه‌ی MS ۱/۲ با سطوح مختلف از هورمون-های IBA و NAA با سطوح (۰/۵، ۱ و ۲ میلی‌گرم درلیتر) استفاده شد. نتایج نشان داد که در محیط کشت حاوی 2, 4-D و TDZ با غلظت ۰/۵ و ۱ میلی‌گرم در لیتر (*x*=۱۰) بالاترین میانگین کالوس‌زایی بدست آمد. تیمارهای Kin با غلظت ۵/۰ و TDZ با غلظت ۱/۰ میلی‌گرم در لیتر به‌ترتیب با میانگین عددی ۸/۸٤ و ۸/۹۵ دارای بالاترین میانگین شاخه‌زایی بودند، امّا شاخه‌های تولید شده توسط TDZ، بی‌شکل و غیرعادی بودند، در حالی که در تیمار هورمونی Kin، شاخه‌های مستقیم و نرمالی تولید شدند. البتّه مقدار ریشه‌زایی توسط هورمون IBA نسبت به هورمون NAA در همه غلظت‌ها بیشتر است، امّا هورمون IBA در غلظت ۱/۰ میلی‌گرم در لیتر از سایر غلظت‌ها در هر دو هورمون در تولید ریشه مؤثرتر است.

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

مقدمه

گونه کُنار با نام علمی *Ziziphus spina christti* (L.) Willd متعلق به خانواده *Rhamnaceae* یکی از گونه‌های بومی ایران و به‌عنوان ذخایر ژنتیکی از گونه‌های با ارزش ایران محسوب می‌شود (Sadeghi & Farar, 2002). عصاره این گونه به‌عنوان یک داروی هومئوپتیک محلی در نواحی آسیای میانه، آفریقای جنوبی و آمریکای شمالی استفاده می‌شود (Aea *et al.*, 1998). میوه‌ی همه گونه‌ها

مصرف خوراکی دارند و ارزش تغذیه‌ای فراوان داشته و قابلیت تجاری بالایی دارند (Sudhersan & Hussain, 2003). مشخصات ویژه این گیاه نظیر منظرسازی و زیبایی آفرینی، مقاومت به خشکی و شوری، تداوم حیات و سرزندگی در بدترین شرایط آب و هوایی اقلیم‌های بیابانی و نیمه‌بیابانی و داشتن سایر ویژگی‌های اعجازآور، درخت کُنار را به‌عنوان یکی از معجزات الهی در آفرینش مطرح کرده است (Assareh & Sabaghzadeh, 2001). از مهمترین مسائل در احیای این گونه ازدیاد آن می‌باشد. تکثیر عادی این گیاه از طریق بذر است که روش بسیار مفید و قابل توصیه برای تولید نهال در امر توسعه و کشت این گیاه می‌باشد (Sohail *et al.*, 2009). اما بذر این گونه به دلیل دارا بودن پوسته بسیار سخت چوبی دارای خفتگی می‌باشد (Al-Sulaiman & Barakat, 2010) و برای جوانه‌زنی نیاز به تیمارهای مخصوص خواب شکنی دارد. جوانه‌زنی بذرهای این گونه بدون تیمارهای رفع خفتگی (اگر شرایط بهینه دمای خاک (در محدوده ۲٤ و ۲۷ درجه سانتی‌گراد) فراهم باشد)، بسیار پایین و حدود ۳۰ می‌باشد (Sohail *et al.*, 2009). همچنین بسیاری از بذرهای این گونه به وسیله حشرات آسیب می‌بینند و در نتیجه تعداد بذرهای زنده قابل دسترس برای جوانه‌زنی کاهش می‌یابد. با این حال و با توجه به دگرگُشنی شدید این گیاه و تفرق صفات در نسل‌های بعدی لازم است برای حفظ برخی از صفات اقتصادی و بهره‌گیری از آنها در امر باغبانی، جنگل‌کاری، برخی از پایه‌های نخبه را از طریق غیرجنسی تکثیر نمود (Assareh & Sardabi, 2005). در این راستا روش‌های کشت بافت گیاهی برای ریزازدیادی گیاه از جایگاه بسیار مهمی برخوردار شده‌اند. تکنیک کشت بافت به‌عنوان بخشی از علم بیوتکنولوژی، یک روش بنیادی در تکثیر و اصلاح نژاد گیاهان با اهمیت زراعی، تجاری، باغبانی، دارویی و تحقیقات پایه محسوب می‌شود. یکی از مزایای این تکنیک، تکثیر تعداد زیاد گیاه در یک بازده زمانی کوتاه و همچنین تولید مواد دارویی از اندام‌های خاص در مقیاس انبوه می‌باشد. ولی کشت بافت درختان، توسعه کمتری نسبت به گیاهان علفی یافته است و این تفاوت به دلیل مشکل بودن ریزازدیادی گیاهان چندساله در مقایسه با گیاهان علفی است که تحت تأثیر عوامل زیادی است. مقالات اندکی در خصوص ریزازدیادی این گونه ارائه شده است که اندام‌زایی مستقیم از ریزنمونه‌های بالغ در گونه‌های وحشی در طبیعت متداول‌ترین روش باززایی آن است. طبق تحقیقات گذشته، تکثیر گونه کنار، از طریق کشت بافت در شرایط درون شیشه‌ای با استفاده از ریزنمونه‌های مختلف انجام شده است (Al-Sulaiman & Barakat, 2010; Assareh & Sardabi, 2005; Sudhersan & Hussain, 2003). مشکلات مختلفی ازجمله محدودیت‌های ناشی از دخالت ترکیبات فنولی در مراحل کشت بافت این گیاه موجب شده است که هیچ گزارشی از باززایی گونه کُنار از طریق کالوس وجود نداشته باشد. بهینه‌سازی فرایند کشت بافت و باززایی کُنار با تثبیت و واسطه‌گری کشت کالوس، راهگشای انجام تحقیقات بنیادی و کاربردی در زمینه‌های مختلفی نظیر اصلاح گیاه از طریق تنوع سوماکلونال خواهد بود که خود نیز به‌عنوان زمینه‌ساز انجام پروژه‌های مرتبط با دست‌ورزی در سطوح عالی‌تر مهندسی ژنتیک همچون تراریختی و مهندسی مسیرهای بیوسنتز انواع متابولیت‌ها، مورد توجه قرار خواهد گرفت. بنابراین هدف از طراحی این مطالعه، تعیین قابلیت کشت و برآورد میزان سازگاری این گونه با شرایط کشت درون شیشه‌ای و همچنین تعیین تنظیم‌کننده‌های رشدی مناسب جهت کالوس‌دهی و

ارزیابی پتانسیل باززایی این گونه در شرایط کشت بافت می‌باشد.

مواد و روشها

بذرهای گونه‌ی مورد مطالعه از سازمان جنگل‌ها و مراتع استان خوزستان تهیه شد. بذرها ابتدا به مدت ۱۰ دقیقه در محلول ۰/۱٪ کلرید جیوه، استریل سطحی شده و بعد دو بار با آب مقطر استریل شستشو داده شد. سپس بذرها در اتانول ۷۰٪ به مدت ٤۰ ثانیه غوطه‌ور گردید. در نهایت مجدداً با آب مقطر استریل به خوبی شستشو داده شدند. بذرهای استریل شده به منظور تولید نهال استریل در لوله‌های آزمایش حاوی محیط کشت MS بدون هورمون کشت شده و در ژرمیناتور نگهداری شدند. پس از رشد گیاهچه‌ها، به منظور القاء کالوس از ریز نمونه‌های برگی، برگها که از وسط به دو قسمت (دور از محور دمبرگ و نزدیک محور دمبرگ) تقسیم و روی محیط کشت MS حاوی غلظت‌های مختلف (۰/۵، ۱ و ۲ میلی‌گرم در لیتر) هورمون‌های 2,4-D، NAA، TDZ و BAP کشت شدند. کشت‌ها در انکوباتور در دمای ۱±۲٦ درجه سانتی‌گراد در شرایط تاریکی نگهداری شدند. نمونه‌ها هر هفته مورد باز بینی قرار گرفته و تعداد ریزنمونه‌هایی که کالوس تولید کردند، شمارش شده و درصد کالوس‌زایی برای هر تیمار به طور جداگانه محاسبه گردید. دو هفته پس از واکشت، کالوس‌های جنین‌زا برای باززایی گیاه، به محیط باززایی انتقال داده شدند. کالوس‌های سبز، زرد روشن، گره‌دار و ترد و شکننده جنین‌زا و در مقابل کالوس‌های صاف، آبدار و شیری رنگ به‌عنوان غیرجنین‌زا تلقی شدند (Chitra & Kumar, 2006). محیط کشت استفاده شده برای باززایی، از محیط‌کشت پایه‌ی MS با سطوح مختلف هورمون‌های BAP، TDZ و Kin (۱/۰، ۳/۰ و ۵/۰ میلی‌گرم در لیتر) در ترکیب با NAA (۰/۵ میلی‌گرم در لیتر) استفاده شد. بعد از انتقال کالوس‌ها به محیط باززایی، ابتدا نمونه‌ها به مدت ۱ هفته در شرایط تاریکی و دمای ۱ ± ۲٦ درجه‌ی سانتی‌گراد تیمار گردیدند. بعد از این مدت نمونه‌ها در تیمار ۱٦ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی در دمای ۱ ± ۲۵ درجه‌ی سانتی‌گراد قرار گرفتند (Xiaojia *et al.*, 2006). گیاهان حاصل از باززایی، جهت ریشه‌زایی به محیط‌کشت پایه‌ی MS ۱/۲(محیط MS که غلظت کلیه‌ی مواد تشکیل‌دهنده آن به نصف کاهش یافته است)، با سطوح مختلف از هورمون‌های IBA و NAA با سطوح (۰/۵، ۱ و ۲ میلی‌گرم درلیتر) منتقل گردیدند. گیاهان ریشه‌دار شده از لوله‌ی آزمایش خارج شده و پس از کشت در خاک استریل به محیط سازگارسازی انتقال داده شدند (Arefi *et al.*, 2003). درصد کالوس‌زایی و باززایی و ریشه‌زایی در قالب طرح کاملاً تصادفی در چهار تکرار محاسبه گردید. فاکتور مورد بررسی در مرحله کالوس‌زایی و ریشه‌زایی، ترکیبات مختلف هورمونها بررسی شد. در مرحله ریشه‌زایی دو فاکتور غلظت و هورمون مورد بررسی قرار گرفت. درصد کالوس‌زایی با استفاده از فرمول ۱ و درصد باززایی با استفاده از فرمول ۲ و درصد ریشه‌زایی با استفاده از فرمول ۳ محاسبه گردید.

$$\text{درصد کالوس‌زایی} = \frac{\text{تعداد کالوس‌های تولید شده}}{\text{تعداد برگ کشت شده}} \times ۱۰۰ \qquad \text{(فرمول ۱)}$$

$$\text{درصد باززایی} = \frac{\text{تعداد کالوس‌های باززایی شده}}{\text{تعداد کالوس‌های انتقال داده شده}} \times ۱۰۰ \qquad \text{(فرمول ۲)}$$

$$\text{درصد ریشه‌زایی} = \frac{\text{تعداد شاخه‌های ریشه‌دار شده}}{\text{تعداد شاخه‌های انتقال داده شده}} \times ۱۰۰ \qquad \text{(فرمول ۳)}$$

به دلیل اینکه داده‌ها به صورت درصد بوده و از توزیع نرمال برخوردار نبودند، از تبدیل داده‌ی ArcSin $\sqrt{x+0.5}$ برای نرمال کردن داده‌ها استفاده شد (Bagheri *et al.*, 2008) و میانگین‌ها در سطح احتمال ۵ درصد مقایسه گردید. تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار آماری SPSS نسخه‌ی ۱٦ انجام شد.

نتایج

کالوس‌زایی: بعد از گذشت ٦ روز از کشت ریزنمونه‌ها بر روی محیط کشت حاوی هورمون، ریزنمونه‌ها شروع به تورم و تولید کالوس کردند. کالوس‌های تولید شده به وسیله 2,4-D کالوس‌های سفید رنگ آبدار بودند، در صورتی‌که کالوس‌های تولید شده به وسیله TDZ کالوس‌های سبز رنگ با ساختار کروی سفت بودند. در این تحقیق مشاهده شد که برخی از ریزنمونه‌ها که بر روی محیط کشت MS حاوی هورمون NAA بود، ریشه‌های مویی تولید کرد. تأثیر ترکیبات هورمونی متفاوت بر تولید کالوس در جدول ۱ نشان داده شده است. نتایج حاصل از تجزیه واریانس بین مقادیر درصد تشکیل کالوس در تیمارهای هورمونی نشان می‌دهد که اثر تیمارهای متفاوت بر میزان کالوس‌زایی، معنی‌دار (۰/۰۱ >P) شده است. شکل ٤ تغییرات مورفولوژیکی کالوس‌های تولید شده از ریزنمونه برگ را نشان می‌دهد.

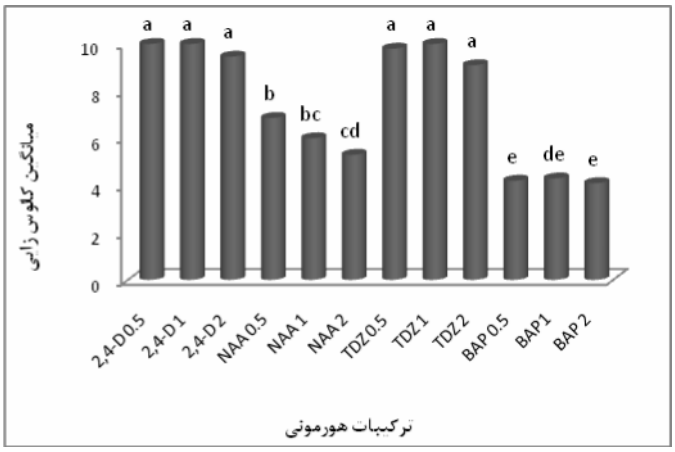
جدول ۱- تجزیه واریانس تأثیر ترکیبات هورمونی مختلف بر کالوس‌زایی

منابع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات	مقدارF
ترکیبات هورمونی	۱۱	٦/۱۷٤	۱۲/٥٤۲**
خطای آزمایش	٤۸	۰/٤۹۲	
ضریب تغییرات		۱۱/۳	

**و *: معنی‌دار در سطح احتمال ۱٪ و ٥٪ ns: عدم معنی‌داری

نتایج مقایسه میانگین نشان داد که از میان تیمارهای به کار برده شده، محیط کشت حاوی 2, 4-D و TDZ با غلظت ۰/٥ و ۱ میلی‌گرم در لیتر با میانگین عددی ۱۰ دارای بالاترین میانگین کالوس‌زایی می‌باشد. در مقابل محیط کشت‌های حاوی BAP در هر سه سطح کمترین مقدار کالوس‌زایی را به خود اختصاص دادند. از میان

سایر تیمارها، محیط کشت‌های حاوی TDZ و 2,4-D در غلظت ۲ میلی‌گرم در لیتر با میانگین کالوس‌زایی ۹/۸۲ دارای بیشترین مقادیر بعد از 4-D ,2 و TDZ با غلظت‌های ذکر شده بودند. در هورمون NAA نیز با افزایش غلظت کالوس‌زایی کاهش یافت و تشکیل کالوس با این هورمون در حد میانه قرار داشت (شکل ۱).



شکل ۱- مقایسه میانگین کالوس‌زایی در ترکیبات هورمونی مختلف

باززایی: کالوس‌های تولید شده از ریزنمونه‌های مختلف بعد از چندین بار واکشت به منظور تکثیر، به محیط کشت‌های باززایی حاوی سطوح مختلف هورمون انتقال داده شدند. تأثیر تیمارهای مختلف و منشأ کالوس‌های استفاده شده بعد از گذشت ٤ ماه در جدول ۲ نشان داده شده است. تجزیه واریانس اثر تیمارهای هورمونی بر باززایی نشان داد که اثر تیمار بر میزان شاخه-زایی، معنی‌دار *(P< ۰/۰۱)* گردید.

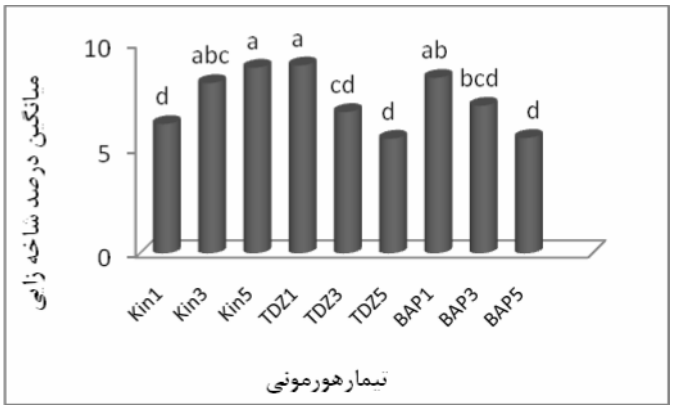
جدول ۲- تجزیه واریانس تأثیر ترکیبات هورمونی مختلف بر کالوس‌زایی

منابع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات	مقدارF
تیمارهای هورمونی	۸	۲۲/٦۷۹	۵/٤٦۰**
خطای آزمایش	۹۹	۰/٤۹۲	
ضریب تغییرات		۱۱/۳	

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

نتایج مقایسه میانگین نشان داد که از میان تیمارهای هورمونی به‌کار رفته، تیمارهای Kin با غلظت ۵/۰ میلی-گرم در لیتر و TDZ با غلظت ۱/۰ میلی‌گرم در لیتر به‌ترتیب با میانگین عددی ۸/۸٤ و ۸/۹۵ دارای بالاترین میانگین شاخه‌زایی بودند، اما همان طور که در بخش قبلی توضیح داده شد شاخه‌های تولید شده در تیمار هورمونی TDZ، بی‌شکل و غیرعادی بودند؛ کدر حالی که در تیمار هورمونی Kin، شاخه‌های مستقیم و نرمالی تولید شدند.

در مقابل در تیمارهـای ۱/۰ میلـی‌گـرم در لیتـر Kin، ۵/۰ میلی‌گرم در لیتـر TDZ و ۵/۰ میلـی‌گـرم در لیتـر BAP ، کمترین مقدار شاخه‌زایی اتفاق افتاد. بعـد از TDZ و Kin ۱/۰ و ۵/۰ میلی‌گرم در لیتر که در بالا ذکـر شـد، از میـان سایر تیمارهـا، تیمـار ۳/۰ میلـی‌گـرم در لیتـر Kin و ۱/۰ میلی‌گرم در لیتر BAP، به ترتیب با میـانگین شـاخه‌زایـی ۸/۱۱ و ۸/۳۸ دارای بیشترین مقادیر شاخه‌زایی بوده است. وضعیت سایر تیمارها نیز در شکل ۲ ارائه گردیـده اسـت. از یافته‌های به‌دست آمده می‌توان به این نتیجه رسـید کـه غلظت‌های بالای هورمـون Kin و غلظـت‌هـای پـایین دو هورمون TDZ و BAP در میزان شاخه‌زایـی تـأثیر مثبـت دارند.



شکل ۲- مقایسه میانگین شاخه‌زایی در تیمارهای هورمونی مختلف

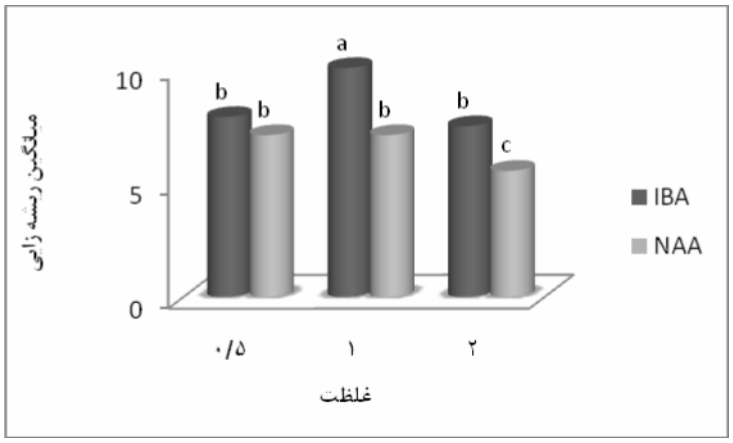
ریشه‌زایی: در این مطالعه مشاهده شد که زغـال فعـال در ریشه‌زایی تأثیر مثبـت دارد، بـه طوریکـه در بعضـی از محیط کشت‌های بدون زغال فعال، انتهای شاخه‌ها توده‌ی کالوس تشکیل شد. تأثیر غلظت‌های مختلف دو هورمـون NAA و IBA بر ریشه‌زایی گیاهچه‌ها در جـدول ۳ نشـان داده شده است. تجزیه واریانس اثر غلظت هورمـون‌هـای مختلف بر ریشه‌زایی گیاهچه‌های تولید شده نشان داد کـه اثر ساده‌ی غلظت و هورمون بر روی درصـد ریشـه‌زایـی معنی‌دار گردید (P< ۰/۰۱)، در حالی که اثر متقابل غلظت و هورمـون بـر درصـد ریشـه‌زایـی در سـطح (P< ۰/۰۵) معنی‌دار گردید. ریشه‌زایی گیاهچه‌ها در محیط‌کشت‌هـای مختلف در شکل ٤-۷ و ۸ نشان داده شده است.

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

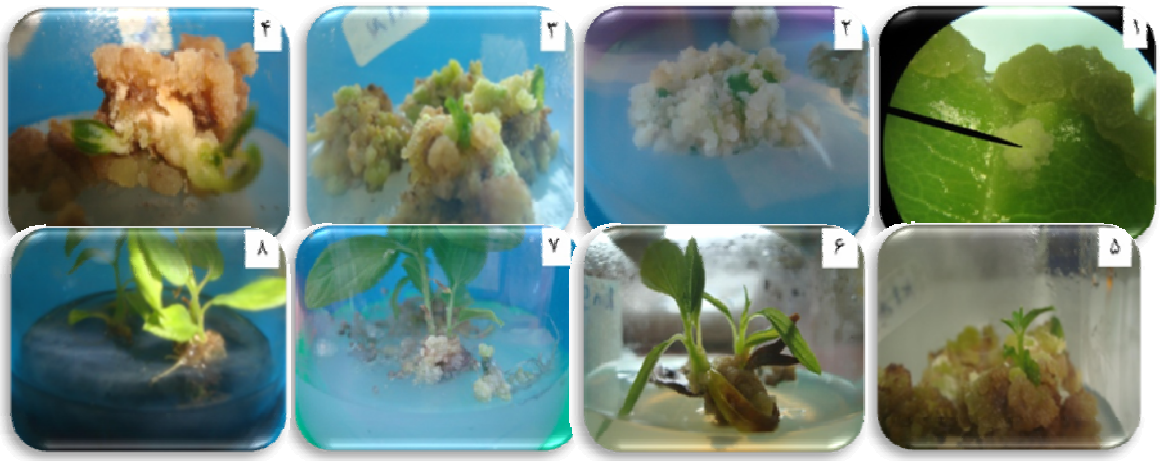
منابع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات	مقدارF
غلظت هورمون	۲	۸/۳٤۹	۱۹/٦۷۷**
هورمون	۱	۲۱/٤۷۰	۵۰/۵۹۹**
هورمون × غلظت هورمون	۲	۲/۲۸٤	۵/۳۸*

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

نتایج حاصل از مقایسه میانگین درصد ریشه‌زایی گیاهچه‌ها به روش دانکن در شکل۳ نشان داده شده است. همان‌طور که مشاهده شد، مقدار ریشه‌زایی توسط هورمون IBA نسبت به هورمون NAA در همه غلظت‌ها بیشتر است. همچنین در شکل ۳ نشان داده شده که هورمون IBA در غلظت ۱/۰ میلی‌گرم در لیتر از سایر غلظت‌ها در هر دو هورمون در تولید ریشه مؤثرتر است. در غلظت‌های بالاتر (۲ میلی‌گرم در لیتر) و پایین‌تر (۰/۵ میلی‌گرم در لیتر) این هورمون ریشه‌زایی کاهش یافت. پس می‌توان به این نتیجه رسید که غلظت‌های ۰/۵ تا ۲/۰ میلی‌گرم در لیتر هورمون IBA غلظت ایده‌آل به منظور ریشه‌زایی می‌باشد. در هورمون NAA غلظت‌های ۰/۵ و ۱/۰ میلی‌گرم در لیتر اثر مشابه نشان دادند و غلظت ۲/۰ میلی‌گرم در لیتر تأثیر کمی بر تولید ریشه در گیاهچه‌ها داشت (شکل ۳).



شکل ۳- مقایسه میانگین ریشه‌زایی تحت تأثیر تیمارهای مختلف



شکل ٤- (۱) کالوس‌های سفت و سبز رنگ که در محل برش ریزنمونه برگ تولید شده، (۲) ریشه مویی تولید شده توسط ریزنمونه برگ کشت شده بر روی محیط کشت حاوی NAA، (۳) آغاز باززایی از کالوس‌ها و ایجاد شاخه‌های نابجا، (٤) باززایی کالوس ریشه بر روی محیط کشت 1 mg/l TDZ،(٥) شاخه‌زایی بر روی محیط‌کشت 5 mg/l Kin، (٦) شاخه‌های تولید شده بر روی محیط کشت 1 mg/l BAP، (۷) کشت گیاهچه بر روی محیط کشت MS فاقد زغال فعال و تشکیل کالوس در انتهای گیاهچه، (۸) آغاز ریشه‌زایی در گیاهچه‌ی کشت شده بر روی محیط‌کشت حاوی هورمون IBA

بحث

تولید کالوس با کیفیت خوب و بالا (کالوس‌های سبز رنگ با ساختار کروی و سفت) و باززایی مناسب گیاهان، یکی از مراحل اساسی در استفاده موفق از روش‌های مدرن در اصلاح ژنتیکی محصولات مطرح شده است (Khalafalla *et al.*, 2010). در تحقیق انجام شده مشخص شد که کشت برگ در سمت دور از محور دمبرگ بر روی محیط‌کشت باعث افزایش تولید کالوس می‌شود. افزایش تولید کالوس در سمت دور از محور، می‌تواند به ساختار اپیدرمی متفاوت در دو جهت دور از محور و نزدیک محور مرتبط باشد. سمت دور از محور دمبرگ دارای سطح ناصاف بوده که به‌طور مستقیم در برخورد با محیط‌کشت قرار می‌گیرد. این سطح ناصاف دارای کوتیکول نازک بوده و راحت‌تر و به طور مؤثرتری مواد غذایی و هورمون‌های رشد را از محیط‌کشت جذب می‌کند. مطالعات زیادی نشان دادند که برای تولید کالوس با هدف باززایی، ریزنمونه برگ مفید واقع شده است (Meiners *et al.*, 2007). از بین ٤ هورمون استفاده شده، سایتوکنینBAP و اکسین NAA واکنش خوبی به منظور تولید کالوس نشان ندادند. بر خلاف این دو هورمون، هورمونهای TDZ و 2,4-D تأثیر بسیار زیادی در تولید کالوس و شکل‌زایی (مورفوژنز) آن داشتند. هورمون TDZ شبه سایتوکنین موثر در کشت بافت گونه‌های چوبی می‌باشد (Kumar *et al.*, 2011). در همه‌ی غلظت‌های TDZ، افزایش تولید و تکثیر کالوس مشاهده شد و نتایج تمام غلظت‌ها تقریباً مشابه بود (شکل ۱). این نتیجه با یافته‌های Gomez-Leyva و همکاران (۲۰۰۸) که از هورمون TDZ برای تولید و تکثیر کالوس گونه *Arbutus unedo* و همچنین Sharma و همکاران (۲۰۱۱) بر روی گونه *Jatropha curcas* استفاده کردند مشابه بود. اکسین 2,4-D به تنهایی یا در ترکیب با سایتوکنین به طور گسترده در تولید و حفظ کالوس استفاده می‌شود (Castillo *et al.*, 2008) و در تحقیقات زیادی مشاهده شد که 2, 4-D بهترین و معمول‌ترین اکسین به منظور تولید کالوس در تک لپه‌ای‌ها و حتی در دولپه‌ای‌ها می‌باشد (Mamun *et al.*, 1996) و نتایج این مطالعه نیز با این یافته‌ها موافق بود. نتایج تحقیق حاضر نشان داد که با استفاده از 2, 4-D ۱۰۰٪ ریزنمونه‌ها کالوس تولید کردند (شکل ۱)، این نتایج با یافته‌های Mungole و همکاران (۲۰۰۹) مشابه بود. پایین‌ترین مقدار در تولید کالوس و همچنین درجه تشکیل کالوس در همه‌ی غلظت‌های سایتوکنین BAP مشاهده شد (شکل ۱). در حضور NAA کالوس‌های تشکیل شده، ریشه مویی تولید کردند. در تحقیقاتی که در گذشته صورت گرفته بیان شده که هورمون NAA اکسین بسیار مناسبی به منظور ریشه‌زایی می‌باشد، که در ازدیاد درون شیشه‌ای چندین گونه گیاهی این نکته به اثبات رسیده است (Maliti *et al.*, 2008). کالوس‌های کشت شده بر روی محیط‌کشت‌های حاوی غلظت‌ها و ترکیبات مختلف از هورمونها، پاسخ‌های مورفولوژیکی مختلفی نشان دادند و هر کالوس کشت شده بر روی محیط‌کشت‌های مختلف توان باززایی متفاوتی از خود نشان دادند (شکل ٤-٣،٤، ٥و٦). از جدول ۳ می‌توان فاکتور غلظت‌ها و ترکیبات مختلف هورمون‌های استفاده شده را در محیط کشت و تأثیرات معنی‌دار پاسخ‌های کالوس‌های باززایی شده را استخراج کرد. با استناد به مشاهدات و ثبت داده‌های مورد نیاز می‌توان به این نتیجه رسید که هورمون Kin هم در توان باززایی کالوس‌ها و تولید آنها و هم در تکثیر آنها از دو

هورمون دیگر مؤثرتر بود. هورمون TDZ در مقایسه با هورمون BAP توان باززایی بالاتر داشت، امّا در تکثیر و تولید شاخه به خوبی عمل نکرده و شاخه‌های تولید شده توسط این هورمون شاخه‌های نرمالی نبودند. درگزارشهای متعددی آورده شده که TDZ در تشکیل شاخه بعضی از گونه‌ها به‌ویژه گونه‌های چوبی مؤثر می‌باشد (Lu, 2002)، ازجمله گونه *Ziziphus jujube* (Feng *et al.*, 2010) و *Cotoneaster wilsonii* (Sivanesan *et al.*, 2010)، به‌طوری که نتیجه این مطالعه نیز با این یافته‌ها مشابه بود. TDZ محرک سنتز و انباشتگی بازهای پورین است. علاوه بر آن متابولیسم سایتوکنین را تغییر داده و موجب افزایش سطح سایتوکنین درونی به وسیله بازدارندگی عملکرد سیتوکنین اکسیداز خواهد شد (Murthy *et al.*, 1998). در مطالعه حاضر همانطور که بیان شد، توان باززایی کالوس‌ها در حضور هورمون TDZ بالا بود، امّا شاخه‌های تولید شده توسط این هورمون کوتاه و بی‌شکل بودند (شکل ٤- ٤). گزارش مشابه با این نتیجه، در تحقیق Al-Wasel و همکاران (۲۰۰۰) بر روی گونه *Acacia seyal* Del اعلام شد. هورمون BAP نقش کلیدی در باززایی شاخه در شرایط این ویترو ایفا می‌کند (Xu *et al.*, 2008). اضافه کردن BAP می‌تواند غالبیت انتهایی را به سمت جوانه جانبی هدایت کند، که این پدیده منجر به تقسیم سلولی در سلول‌های مریستمی در جوانه و افزایش تعداد شاخه شده و سرعت تقسیم سلولی در جوانه‌های جانبی را افزایش می‌دهد (Gomez-Leyva *et al.*, 2008). در این تحقیق همانطور که در بالا ذکر شد، براساس نتایج بدست آمده، مشخص شد که غلظت‌های پایین BAP تأثیر بیشتری در تولید شاخه دارد. این نتیجه با یافته‌های تحقیقی که توسط Al-Sulaiman و Barakat & (۲۰۱۰) بر روی ریزنمونه گره گونه کنار انجام دادند، مشابه است. در تحقیقی که توسط Ahmad و همکاران (۲۰۱۰) انجام شد، بیشترین باززایی و بیشترین تعداد شاخه در ریزنمونه برگ گونه *Ruta graveolens* L.، در ترکیب BAP با NAA بدست آمد. آنها در تحقیق خود بیان داشتند که غلظت‌های پایین NAA در ترکیب با BAP یک تأثیر سینرژیک بر روی افزایش واکنش‌های مورفوژنتیک شاخه می‌گذارد. در تحقیق حاضر هم نتیجه مشابه به‌دست آمد و ترکیب BAP با اکسین NAA تأثیر مثبتی بر شاخه‌زایی داشته است. غالبیت سایتوکنینBAP در توان باززایی و تولید و تکثیر شاخه (Rathore *et al.*, 2008) و همچنین از لحاظ بیولوژیکی، نسبت به سایتوکنین Kin در اغلب گونه‌های چوبی اعلام شده است. در صورتی‌که در تحقیق حاضر هورمون Kin از دو هورمون استفاده شده دیگر، واکنش بهتری نشان داد و هم در توان تولید و هم در تکثیر و تعداد شاخه‌زایی تأثیر بالاتری داشت. در این تحقیق با افزایش غلظت Kin، باززایی و توانایی در تولید و تکثیر شاخه، افزایش پیدا کرد. در تحقیقی Sanatombi و Sharma (۲۰۰۷) نیز در تحقیق خود بر روی گونه *Capsicum frutescens L* به همین نتیجه دست یافتند. بررسی تأثیر دو اکسین IBA و NAA در غلظت‌های متفاوت بر روی ریشه‌زایی شاخه‌های ایجاد شده نشان داد که مقادیر استفاده شده در دو هورمون تفاوت معنی‌دار ($P < ۰/۰۱$) با یکدیگر داشته، امّا تأثیر دو هورمون با هم اختلاف داشتند (جدول ۳). به طوریکه هورمون IBA در تولید ریشه از هورمون NAA مؤثرتر بود. هورمون IBA به طور گسترده به منظور ریشه‌زایی گیاهانی که به سختی ریشه‌دار شده و معمولاً در گونه‌های چوبی به‌کار برده می‌شود (Rathore *et al.*,

2007). در تحقیقات دیگری که بر روی همین گونه انجام شد، تأثیر هورمون IBA بر ریشه‌زایی نسبت به سایر اکسین‌ها بیشتر بود (Assareh & Sardabi, 2005; Al-Sulaiman & Barakat, 2010). نتایج نشان داد که غلظت ۱ میلی‌گرم در لیتر هورمون IBA در تولید ریشه تأثیر زیادی داشت، در صورتی‌که کمتر از این مقدار (۰/۵ میلی‌گرم در لیتر) و بیشتر از این مقدار (۲ میلی‌گرم در لیتر) کاهش تولید و تعداد ریشه را به همراه داشت. همینطور Khalafalla و همکاران (۲۰۱۰) در مطالعه خود دریافتند که غلظت ۱ میلی‌گرم در لیتر از هورمون IBA در افزایش تعداد ریشه و غلظت ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر آن بر افزایش طول ریشه مؤثر است. همچنین Singhi و Tiwari (2010) در تحقیق خود به اثر بازدارندگی IBA در غلظت‌های بالا (۲ میلی‌گرم به بالا) پی بردند. کاهش مقدار نمک‌های معدنی موجود در محیط‌کشت، مرحله انتقال به خاک و سازگاری ریشه را راحت‌تر می‌کند (Dalal & Rai, 2004). تأثیر کاهش نمک و ساکارز در مرحله ریشه‌زایی در گزارش متعددی بیان شده است (Nagori & Purohit, 2004). بر همین اساس در تحقیق حاضر نیز از محیط‌کشت MS ۱/۲ به منظور ریشه‌زایی استفاده شد و نتایج مطلوبی مشاهده بدست آمد.

نتیجه‌گیری کلی

در مرحله کالوس‌زایی از بین ٤ هورمون استفاده شده، TDZ در همه غلظتها و 2,4-D در غلظتهای پایین، مؤثرترین و بهترین هورمون برای تولید کالوس بودند. از سوی دیگر در مرحله باززایی از کالوسهای تولید شده بهترین نتیجه در باززایی توسط هورمون Kin مشاهده شد، زیراکه هورمون Kin در تمامی غلظتهای مورد استفاده، شاخه‌های نرمال و خوبی تولید کرد. در مرحله ریشه‌زایی نیز مؤثرترین اکسین در ریشه‌زایی، هم از نظر تولید و هم از نظر تعداد ریشه، IBA شناخته شد. با توجه به منابع موجود تحقیق حاضر، اولین گزارش دستورالعمل کامل به منظور تولید کالوس از ریزنمونه برگ گونه کُنار و باززایی و تولید نهال کامل از این گونه محسوب می‌شود. بافت کالوس عمدتاً به‌عنوان بافت هدف برای دستکاری ژنتیکی استفاده می‌شود و تشکیل کالوس برای باززایی بافت‌های تراریخت لازم است. در مرحله بعد سیستم باززایی از کالوس است که دستورالعمل تکثیر گیاه برای این گونه را به وجود می‌آورد. این دستورالعمل، نه تنها برای مطالعه و تحقیقات بیشتر بر روی این گونه از قبیل تغییر ژنتیکی از طریق آگروباکتریوم یا مطالعه ترکیب پروتوپلاست مفید است، بلکه برای نهالستانهای تجاری نیز کاربرد دارد. این نهالستان‌ها با استفاده از این دستورالعمل از گیاهان بدون ویروس استفاده می‌کنند که نیاز به آفت‌کش‌ها و عملیات کشاورزی را کاهش می‌دهد و باعث افزایش در کمیت و کیفیت محصول می‌شود.

سپاسگزاری

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

منابع مورد استفاده

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

– Xiaojia, G., Zhaohui. C., Yongjun, L. and Shiping, W., 2006. A tissue culture system for different germplasms of indica rice. Plant Cell Report, 25: 392-402.
– Xu, Z., Um, Y.C., Kim, C.H., Lu, G., Guo, D.P., Liu, H.L., Bah, A.A. and Mao, A., 2008. Effect of plant growth regulators, temperature and sucrose on shoot proliferation from the stemdisc of Chinese jiaotou (*Allium chinense*) and *in vitro* bulblet formation. Acta Physiologiae Plantarum, 40: 521–528.
propagation of pharmaceutically important *Clitoria ternatea* L., A valuable medicinal plant. Industrial Crops and Products, 32: 534–538.
– Sivanesan, I., Song, J.Y., Hwang, S.J. and Jeong, B.R., 2010. Micropropagation of *Cotoneaster wilsonii* Nakai, a rare endemic ornamental plant. Plant Cell Tissue Organ Culture. DOI 10.1007/s11240-010-9841-2.
– Sohail, M., Saied, A.S., Gebauer, J. and Buerkert, A., 2009. Effect of NaCl salinity on growth and mineral composition of *Ziziphus spina-christi* (L.) Willd. Journal Agriculture Rural Development Tropical and Subtropics, 110:107–114.
– Sudhersan, C. and Hussain, J., 2003. *In vitro* Clonal Propagation of a Multipurpose Tree, *Ziziphus spina Christi* (L.) Desf. Turkish Journal Botany, 27:167-171.

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

E. Ahmadi[1*], S.M. Hosseini Nasr[2], H. Jalilvand[3] and H. Salehian Aghblaq[4]

1* - Corresponding author, M.Sc., College of Natural Resources, Sari Agricultural Science and Natural Resources University, Sari ,I.R.Iran, Email: Ahmadi_silva@yahoo.com
2- Asist. Prof., College of Natural Resources, Sari Agricultural Science and Natural Resources University, Sari , I.R.Iran.
3- Assoc. Prof., College of Natural Resources, Sari Agricultural Science and Natural Resources University, Sari , I.R.Iran.
4- M.Sc., College of Crop Science, Sari Agricultural Science and Natural Resources University, Sari , I.R.Iran.

Received: 21.02.2012 Accepted: 01.07.2012

Abstract

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

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