بررسی اثر تنظیم‌کننده‌های رشد و انواع ریزنمونه بر پینه‌زایی و باززایی گونه کُنار *Ziziphus spina christti* (L.) Willd

The Effect of Plant Growth Regulators and Explant Types on Callus Induction and Regeneration of Christ's Thorn (*Ziziphus spina christti* (L.) Willd

الهه احمدی[۱*]، سیدمحمد حسینی‌نصر[۲] و حمید جلیلوند[۳]

تاریخ دریافت: ۹۲/۱۰/۰۶ تاریخ پذیرش: ۹۳/۰۳/۰۷

چکیده

کُنار یک گونه چوبی دارویی مهم با خواص درمانی فراوان می‌باشد که در طب سنتی ایران جایگاه بسیار ویژه‌ای دارد. امروزه استفاده از زیست‌فنآوری در اصلاح و تکثیر گونه کُنار مرسوم شده و لازم است تا مراحل ریخت‌زایی با استفاده از ریزنمونه و ترکیبات هورمونی بهینه، بهبود داده شود. این مطالعه جهت بررسی عکس‌العمل ریزنمونه‌های گره، ریشه، برگ و تأثیر ترکیبات مختلف هورمونی بر روی آنها از نظر پینه‌زایی و باززایی گونه کُنار در سال ۱۳۹۱ در آزمایشگاه بیوتکنولوژی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری انجام گرفت. برای پینه‌زایی، سه ریزنمونه از گیاه سترون روی محیط‌کشت MS حاوی هورمون‌های BAP، NAA، TDZ و 2,4-D (۰/۵، ۱/۰ و ۲/۰ میلی‌گرم در لیتر) کشت شدند. سپس پینه‌های تولید شده در محیط MS حاوی هورمون‌های BAP، TDZ و Kin (۱/۰، ۳/۰ و ۵/۰ میلی‌گرم در لیتر) قرار داده و برای ریشه‌دار کردن گیاهچه‌ها از محیط $\frac{1}{2}$ MS با هورمون‌های IBA و NAA (۰/۵، ۱ و ۲ میلی‌گرم در لیتر) استفاده شد. آزمایشات به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی در ۴ تکرار انجام شدند. نتایج نشان داد که مقدار پینه‌زایی برای ریزنمونه برگ نسبت به دو ریزنمونه دیگر، در محیط‌کشت حاوی 2,4- D با غلظت ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر (۰±۱۰) از همه بیشتر می‌باشد. در صورتی‌که میزان باززایی پینه با منشاء گره تحت تأثیر تیمارهای ۵/۰ میلی‌گرم در لیتر Kin (۱/۰۳± ۸/۸۴) و ۱/۰ میلی‌گرم در لیتر TDZ (۸/۹۵± ۱/۰۸) نسبت به دو نوع پینه حاصل از ریزنمونه برگ و ریشه از همه بیشتر بود (۹۵ درصد). مقدار ریشه‌زایی توسط هورمون IBA (۹۰/۶ درصد) در همه غلظت‌ها نسبت به هورمون NAA (۵۸ درصد) بیشتر است. با توجه به نتایج ذکر شده کنار نسبت به کشت درون‌شیشه‌ای و ریزافزایی واکنش خوبی نشان می‌دهد. از این نتایج می‌توان برای اهداف مختلف ازجمله تکثیر و تولید ماده مؤثره بیشتر در شرایط کشت درون‌شیشه‌ای استفاده نمود.

واژه‌های کلیدی: اکسین، باززایی، پینه‌زایی، کُنار، محیط‌کشت

۱. کارشناس‌ارشد جنگل‌داری گروه جنگلداری دانشکده منابع طبیعی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، مازندران
۲. استادیار گروه جنگل‌داری دانشکده منابع طبیعی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، مازندران
۳. دانشیار گروه جنگل‌داری دانشکده منابع طبیعی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، مازندران
*: نویسنده مسوول Email: Ahmadi_silva@yahoo.com

مقدمه

گونه کُنار با نام علمی *Ziziphus spina christti* (L.) Willd متعلق به خانواده *Rhamnaceae* یکی از گونه‌های بومی و از نظر ذخایر ژنتیکی جزء گونه‌های با ارزش ایران محسوب می‌شود *صادقی و فرار* (Sadeghi and Farar, 2002). عصاره این گونه به‌عنوان یک داروی هومئوپتیک محلی در نواحی آسیای میانه، آفریقای جنوبی و آمریکای شمالی استفاده می‌شود *احمد* و همکاران (Ahmad *et al.*, 2010). میوه همه گونه‌ها مصرف خوراکی، ارزش تغذیه‌ای فراوان و قابلیت تجاری بالایی دارند *سادهرسان و حسین* (Sudhersan and Hussain, 2003) 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 است *سهیل* و همکاران (Sohail *et al*., 2009)؛ اما بذر این گونه به دلیل دارا بودن پوسته بسیار سخت چوبی، دارای خفتگی می‌باشد *عصاره و سردابی* (Assareh and Sardabi, 2005) و برای جوانه‌زنی نیاز به تیمارهای مخصوص شکستن خفتگی بذر دارد. جوانه‌زنی بذور این گونه بدون تیمارهای رفع خفتگی اگر دمای خاک، در محدوده ۲۴ تا ۲۷ درجه سانتی‌گراد باشد، بسیار پایین و حدود ۳۰ درصد می‌باشد (*سهیل* و همکاران، 2009). همچنین بسیاری از بذرهای این گونه به‌وسیله 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 منتخب را از طریق غیرجنسی تکثیر نمود *چیترا و آناندر کومار* (Chitra and Anander Kumar, 2006).

در این راستا روش‌های کشت بافت گیاهی برای ریزازدیادی گیاه از جایگاه بسیار مهمی برخوردار شده‌اند. روش کشت بافت به‌عنوان بخشی از علم زیست فناوری، یک روش بنیادی در تکثیر و اصلاح نژاد گیاهان مهم زراعی، باغی، دارویی و تحقیقات پایه محسوب می‌شود. یکی از مزایای این روش، تکثیر تعداد زیاد گیاه در یک بازده زمانی کوتاه و همچنین تولید مواد دارویی در اندام‌های خاص در مقیاس انبوه می‌باشد. کشت بافت درختان، نسبت به گیاهان علفی، کمتر توسعه‌یافته است و این تفاوت به‌دلیل مشکل بودن ریزازدیادی گیاهان چندساله در مقایسه با گیاهان علفی است که تحت تأثیر عوامل زیادی قرار می‌گیرد. مقالات اندکی در خصوص ریزازدیادی این گونه ارائه شده است. در این راستا اندام‌زایی مستقیم از ریزنمونه‌های بالغ در گونه‌های وحشی آن متداول‌ترین روش باززایی آن است (عصاره، ۱۳۸۱). طبق تحقیقات انجام شده، تکثیر گونه کنار، از طریق کشت بافت در شرایط درون‌شیشه‌ای با استفاده از ریزنمونه‌های مختلف صورت گرفته است (*سادهرسان و حسین*، 2003؛ *چیترا و آناندر کومار*، 2006؛ *عصاره و سردابی*، 2005). مشکلات مختلفی از جمله، محدودیت‌های ناشی از دخالت ترکیبات فنلی در مراحل کشت بافت این گیاه موجب شده است که گزارشی از باززایی گیاهچه به‌واسطه پینه (باززایی غیرمستقیم) وجود نداشته باشد. بهینه‌سازی فرآیند کشت بافت و باززایی کُنار با واسطه‌گری کشت پینه، 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. لذا هدف از این مطالعه، تعیین قابلیت کشت و برآورد میزان سازگاری این گونه با شرایط کشت درون‌شیشه‌ای و همچنین تعیین تنظیم‌کننده-های رشدی مناسب در غلظت‌های مناسب و بهترین ریزنمونه جهت پینه‌دهی و ارزیابی پتانسیل باززایی و ریشه‌زایی این گونه در شرایط درون‌شیشه می‌باشد. انتخاب ریزنمونه با توجه به تنوع بافت سه قسمت ریشه ساقه و برگ و انتخاب تنوع غلظت‌ها با توجه به تحقیقات سایر محققین بر روی گونه‌های مختلف صورت گرفت *احمد* و همکاران؛ *ین* و همکاران؛ *مینگول* و همکاران؛ *تیان* و همکاران (Yan *et al*., 2009; Mungole *et al*., 2009; Tian *et al*., 2010).

مواد و روش‌ها

بذرهای گونه‌ی مورد مطالعه از سازمان جنگل‌ها و مراتع استان خوزستان تهیه شد. بذور ابتدا به‌مدت ۱۰ دقیقه در محلول ۰/۱ درصد کلریدجیوه، استریل سطحی شده و سپس دو بار با آب مقطر استریل شستشو داده شدند. سپس بذرها در اتانول ۷۰ درصد به‌مدت ۴۰ ثانیه غوطه‌ور گردیدند. در نهایت مجدداً با آب مقطر استریل به‌خوبی شستشو داده شدند. بذرهای استریل شده به‌منظور تولید گیاهچه استریل در لوله‌های آزمایش حاوی محیط‌کشت MS بدون هورمون کشت شده و در ژرمیناتور قرار داده شدند. پس از رشد گیاهچه‌ها، ریزنمونه‌های برگ، ریشه و گره این نهال‌ها به‌منظور ایجاد پینه انتخاب شدند. به‌منظور جداسازی ریزنمونه گره، قطعات ساقه‌ای که دارای بخش گره بودند را به‌صورت مورب از قسمت

زیر گره از گیاهچه جدا کرده و قطعات ساقه جدا شده به طول ۱ سانتی‌متر به‌طور عمودی در محیط‌کشت قرار داده شدند. به‌منظور تهیه ریزنمونه برگ، برگ را به دو قسمت (دور از محور دمبرگ و نزدیک محور دمبرگ) تقسیم کرده و در جهت نزدیک به محور در محیط‌کشت قرار گرفتند. قسمت ریشه گیاهچه را نیز به قطعات ۱ سانتی‌متری تقسیم کرده و در محیط‌کشت قرار داده شد. ریزنمونه‌های جدا شده روی محیط‌کشت MS حاوی غلظت‌های (۰/۵، ۱ و ۲ میلی‌گرم در لیتر) هورمون‌های 2,4-D، NAA، TDZ و BAP کشت شدند. کشت‌ها در انکوباتور در دمای ۱±۲۶ درجه سانتی‌گراد در شرایط تاریکی نگهداری شدند. نمونه‌ها هر هفته مورد بازبینی قرار گرفته و تعداد ریزنمونه‌هایی که پینه تولید کردند، شمارش شده و درصد پینه‌زایی برای هر تیمار به‌طور جداگانه محاسبه گردید. دو هفته پس از واکشت، پینه‌های رویان‌زا برای باززایی گیاه، به محیط باززایی انتقال داده شدند. پینه‌های سبز، زرد روشن و ترد و شکننده، رویان‌زا و در مقابل پینه‌های صاف، آبدار و شیری رنگ به‌عنوان غیررویان‌زا تلقی شدند (*چیترا و آناندر کومار*، 2006). محیط‌کشت 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) استفاده شد. بعد از انتقال پینه‌ها به محیط باززایی، نمونه‌ها تحت تیمار ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی در دمای ۱±۲۵ درجه‌ی سانتی‌گراد قرار گرفتند و درصد باززایی و تعداد شاخه تولید شده توسط هر پینه اندازه‌گیری شد *چن و چانگ* (Chen and Chang, 2000). گیاهان حاصل از باززایی بدون در نظر گرفتن منشاء پینه، آنهایی که سالم و نرمال بودند جهت ریشه‌زایی به محیط‌کشت پایه‌ی 1/2MS (محیط MS که غلظت کلیه‌ی مواد تشکیل‌دهنده آن به نصف کاهش یافته است)، دارای هورمون‌های IBA و NAA با سطوح ۰/۵، ۱ و ۲ میلی‌گرم در لیتر منتقل گردیدند و در این مرحله درصد ریشه‌زایی و تعداد ریشه تولید شده محاسبه شد. گیاهان ریشه‌دار شده از لوله‌ی آزمایش خارج شده و پس از کشت در خاک استریل به محیط سازگارسازی انتقال داده شدند *دلال و رای* و همکاران (Dalal and Rai *et al*., 2004). آزمایشات کالوس‌زایی و باززایی به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی انجام شدند. در مرحله پینه‌زایی، ۵ تکرار و در هر تکرار ۴ ریزنمونه کشت شد و در مراحل باززایی و ریشه‌زایی، ۴ تکرار و در هر تکرار ۴ پینه کشت شد.

به‌دلیل اینکه داده‌ها به‌صورت درصد بوده و از توزیع نرمال برخوردار نبودند، از تبدیل داده‌ی $\mathrm{ArcSin}\sqrt{x+0.5}$ برای نرمال‌کردن داده‌ها استفاده شد *ال- واصل* (Al-Wasel, 2000) و مقایسه میانگین تیمارهای مورد آزمایش براساس آزمون چنددامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ۵ درصد ا استفاده از نرم‌افزار SPSS سخه‌ی ۱۶ انجام پذیرفت.

نتایج

بعد از گذشت ۶ الی ۸ روز از کشت ریزنمونه‌ها بر روی محیط‌کشت حاوی هورمون، ریزنمونه‌ها شروع به تورم کرده و پینه تولید کردند. پینه‌های تولید شده به‌وسیله 2,4-D در غلظت ۳ و ۱ میلی‌گرم پینه‌های سفیدرنگ، آبدار و با ساختار سست بودند در صورتی‌که پینه‌های تولید شده به‌وسیله TDZ در همه‌ی غلظت‌ها، پینه‌های سبز رنگ با ساختار کروی و متورم و سفت بودند. در این تحقیق مشاهده شد که ریزنمونه‌ی برگی روی محیط‌کشت MS حاوی هورمون NAA در غلظت ۱ میلی‌گرم در لیتر، ریشه‌های مویی تولید کردند (بخش ۲ شکل ۷). ضمناً در اکثر ریزنمونه‌های گره در محیط‌کشت حاوی هورمون BAP در غلظت ۱ میلی‌گرم شاخه‌زایی مستقیم صورت گرفت (بخش ۳ شکل ۷). بعد از گذشت ۲۰ روز از کشت، تقریباً همه ریزنمونه‌های کشت شده، پینه تولید کردند. تأثیر محیط‌کشت حاوی ترکیبات هورمونی متفاوت و نوع ریزنمونه، بر تولید پینه در جدول ۱ نشان داده شده است. نتایج حاصل از تجزیه واریانس، نشان می‌دهد که اثر نوع ریزنمونه و ترکیب هورمونی و برهمکنش آنها معنی‌دار شده ($P<۰/۰۱$) است (جدول ۱).

برهمکنش محیط‌کشت و نوع ریزنمونه درتولید پینه

جدول مقایسه میانگین (جدول ۲)، نشان‌داد که محیط‌کشت‌های حاوی 2,4-D و TDZ در غلظت های ۰/۵ و ۱ میلی‌گرم در لیتر تأثیر زیادی بر ریزنمونه برگ گذاشته و محیط‌کشت حاوی هورمون NAA در غلظت‌های ۱ و ۲ میلی‌گرم در لیتر بر روی ریزنمونه گره تأثیر بیشتری داشت زیرا که بالاترین درصد پینه‌زایی ریزنمونه‌ها، با میانگین ۰±۱۰، در این ترکیبات به‌دست آمد. ریزنمونه ریشه در محیط‌کشت حاوی هورمون 2,4-D و TDZ با غلظت ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر با میانگین عددی ۰±۱۰ بیشترین مقدار پینه‌زایی را نشان داد. ترکیبات هورمونی و ریزنمونه‌های ذکر شده، به‌دلیل توانایی بالا در تشکیل پینه در مقایسه میانگین داده‌ها در کلاس اول قرار گرفتند.

جدول ۱: تجزیه واریانس تأثیر نوع ریزنمونه و ترکیبات هورمونی مختلف و برهمکنش آنها بر روی درصد پینه‌زایی
Table 1: Variance analysis of the effect of the various treatments factors and interaction on callus induction

میانگین مربعات Mean Square	درجه آزادی df	منابع تغییرات Source of variation
26.443**	2	ریزنمونه Explants
62.996**	11	تیمار هورمونی Hormonal treatments
13.251**	22	ریزنمونه × تیمار هورمونی Hormonal treatments×Explants
2.407	144	خطای آزمایش Error experiment

**: معنی‌دار در سطح احتمال ۱٪ **: Significant in probability level of 1%

جدول ۲: مقایسه میانگین برهمکنش بین نوع ریزنمونه و محیط‌کشت‌های مختلف از نظر صفت پینه‌زایی
Table 2: comparison of mean of the interaction between the various treatments and explant Type on callus induction

	درصد تشکیل پینه (mean± 1SE) Callus induction percentage			
	ریزنمونه Explants	ریشه Root	برگ Leaf	گره Node
تیمار هورمونی Hormonal treatments	2,4-D 0.5	10 ± 0^{a}	10 ± 0^{a}	10 ± 0^{a}
	2,4-D 1	8.8 ± 0.5^{ab}	10 ± 0^{a}	9.4 ± 0.3^{ab}
	2,4-D 2	7.7 ± 0.3^{abc}	9.4 ± 0.3^{ab}	8.6 ± 0.4^{ab}
	NAA 0.5	7.7 ± 0.3^{abc}	7.7 ± 0.3^{abc}	9.8 ± 0.2^{ab}
	NAA 1	8.8 ± 0.5^{ab}	8 ± 0.3^{ab}	10 ± 0^{a}
	NAA 2	7.7 ± 0.3^{abc}	8.2 ± 0.8^{ab}	10 ± 0^{a}
	TDZ 0.5	10 ± 0^{a}	10 ± 0^{a}	9.4 ± 0.3^{ab}
	TDZ 1	8 ± 0.3^{ab}	10 ± 0^{a}	8.2 ± 0.8^{ab}
	TDZ 2	9.1 ± 0.5^{ab}	9.1 ± 0.3^{ab}	10 ± 0^{a}
	BAP 0.5	4.2 ± 1.7^{d}	7.7 ± 0.3^{abc}	4.5 ± 1.8^{d}
	BAP 1	5.6 ± 1.4^{cd}	7.7 ± 0.3^{bc}	0^{e}
	BAP 2	4.8 ± 2.1^{d}	7.7 ± 0.3^{bc}	1 ± 1^{e}

در هر ستون حروف مشترک نشان‌دهنده این است که در سطح احتمال ۵٪ اختلاف معنی‌دار وجود ندارد
Common letters in each column indicate no significant difference at the 5% level

البته مشاهده شد که با افزایش غلظت هورمون 2,4-D مقدار پینه‌زایی در هر سه ریزنمونه کاهش پیدا کرده است؛ که نشان‌دهنده این است که غلظت‌های پایین این هورمون در پینه‌زایی تأثیر بیشتری دارند. در صورتی‌که با افزایش غلظت هورمون NAA مقدار پینه‌زایی افزایش پیدا کرد و تأثیر این هورمون را در پینه‌زایی در غلظت‌های بالا نشان می‌دهد. در هورمون TDZ استفاده شده، تفاوت غلظت در مقدار پینه‌زایی اختلاف معنی‌داری را ($P<۰/۰۱$) نشان نداد. کمترین مقدار پینه‌زایی در ریزنمونه گره و ریشه، تحت تأثیر محیط‌کشت حاوی هورمون BAP به‌دست آمد. به‌طوری‌که ریزنمونه گره در محیط‌کشت حاوی BAP با غلظت‌های ۱ و ۲ میلی‌گرم در لیتر هیچ پینه‌ایی تشکیل نداد و تشکیل شاخه‌های نابه‌جا در این ریزنمونه، در غلظت‌های ذکر شده مشاهده شد (جدول ۲ و بخش ۳ شکل ۷). همان‌طور که مشاهده می‌شود، مقدار پینه‌زایی برای ریزنمونه‌ی برگی نسبت به دو ریزنمونه‌ی دیگر از همه بیشتر بود که نشان‌دهنده توانایی بالای این ریزنمونه در القاء پینه می‌باشد.

باززایی شاخساره از پینه

در این مطالعه مشاهده شد که هورمون TDZ در هر سه سطح غلظت مورد استفاده، شاخساره تولید کرد اما این شاخساره‌ها، به هم فشرده و بی‌شکل بوده و حالت غیرعادی داشتند (بخش ۴ شکل ۷). بیشترین میزان باززایی پینه‌ها در حضور هورمون Kin در هر سه غلظت صورت گرفت و شاخه‌های تولید شده

توسط این هورمون شاخه‌های نرمال و خوبی بودند (بخش ۵ شکل ۷). پینه‌های کشت شده در محیط‌کشت حاوی هورمون BAP با غلظت‌های ۱ و ۳ میلی‌گرم در لیتر در تولید و باززایی شاخساره پاسخ خوبی نشان داد، اما این هورمون در غلظت‌های بالا، شاخه‌های نرمالی تولید نکرده و شاخه‌های تولید شده حالت طبیعی شاخه را ندارند (بخش ۶ شکل ۷). تأثیر تیمارهای مختلف و منشاء پینه‌های استفاده شده بعد از گذشت ۴ ماه در جدول ۳ نشان داده شده است. تجزیه واریانس اثر تیمارهای هورمونی مختلف روی پینه‌های با منشاء متفاوت بر باززایی نشان داد که اثر ساده‌ی تیمار هورمونی و منشاء پینه بر میزان شاخه‌زایی، معنی‌دار (P< ۰/۰۱) گردید، درحالی‌که برهمکنش تیمار هورمونی در منشاء پینه معنی‌دار (P< ۰/۰۱) نبود. همچنین اثر ساده‌ی تیمارهای مختلف هورمونی و پینه با منشاء متفاوت در تعداد شاخه تولید شده از هر پینه معنی‌دار (P<۰/۰۱) گردید و برهمکنش تیمار در منشاء پینه معنی‌دار نگردید.

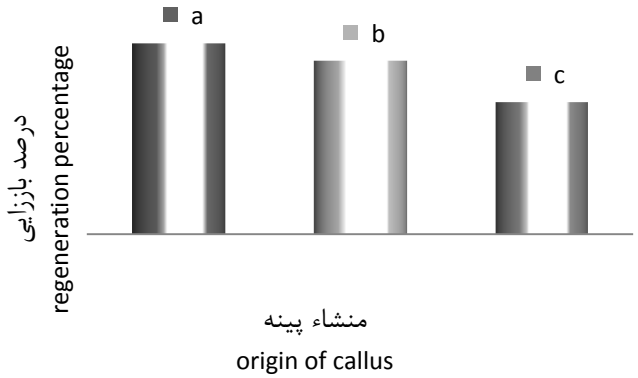
جدول ۳: تجزیه واریانس تأثیر منشاء پینه و تیمار و برهمکنش آن‌ها بر روی درصد باززایی پینه و تعداد شاخه تولید شده از هر پینه
Table 3: Variance analysis of the effect of the callus origin and various treatments factors and interaction on regeneration percentage per callus and the number of shoots produced per callus

منبع تغییرات Source of variation	درجه آزادی df	درصد شاخه‌زایی میانگین مربعات Mean Square	تعداد شاخه تولید شده از هر پینه درجه آزادی df	تعداد شاخه تولید شده از هر پینه میانگین مربعات Mean Square
منشاء پینه origin of callus	2	63.989**	2	13.933**
ترکیبات هورمونی various treatments	8	22.679**	8	3.521**
پینه × ترکیبات هورمونی callus× Hormonal treatment	16	2.135ns	16	0.528ns
خطای آزمایش Error experiment	81	3.075	81	0.471

**: معنی‌دار در سطح احتمال ۱٪ ns: عدم معنی‌داری **: Significant in probability level of 1%; ns: not significant

تأثیر منشاء پینه بر درصد باززایی شاخساره و تعداد شاخه های تولید شده از هر پینه

نتایج حاصل از مقایسه میانگین ریزنمونه برای درصد باززایی به روش دانکن (شکل ۱) نشان داد که میزان باززایی پینه با منشاء گره، با میانگین ۸۰/۳٪ نسبت به دو نوع پینه دیگر از همه بیشتر می‌باشد که نشان‌دهنده‌ی توانایی بالای پینه این ریزنمونه در باززایی می‌باشد. همچنین در شکل ۱ نشان داده شده که میانگین عددی درصد شاخه‌زایی پینه با منشاء ریشه با شاخه زایی پینه با منشاء گره تفاوت چندانی ندارند اما مقدار عددی درصد باززایی ریشه کمتر از پینه تشکیل یافته از ریزنمونه گره می‌باشد؛ اما این دو نوع پینه دارای تفاوت معنی‌داری با پینه با منشاء برگ هستند و اختلاف آن در درصد شاخه‌زایی پینه‌های گره و ریشه معنی‌دار (P<۰/۰۱) است. با توجه به اینکه در این مرحله از آزمایش ۴ تکرار و در هر تکرار ۴ پینه کشت شد پس از شمارش پینه‌های باززایی شده در ریزنمونه برگ ۶۰ عدد، در ریزنمونه ریشه ۸۸ عدد و در ریزنمونه گره ۱۰۶ عدد پینه باززایی شده به‌دست آمد؛ بنابراین می‌توان به این نتیجه رسید که پینه تولید شده از ریزنمونه برگ توانایی مناسب به‌منظور باززایی و تولید شاخه را ندارد. درصورتی‌که ریزنمونه برگ نسبت به دو ریزنمونه ریشه و گره در مرحله اول آزمایش دارای توانایی بالایی در تولید پینه از خود نشان داد (جدول ۲).

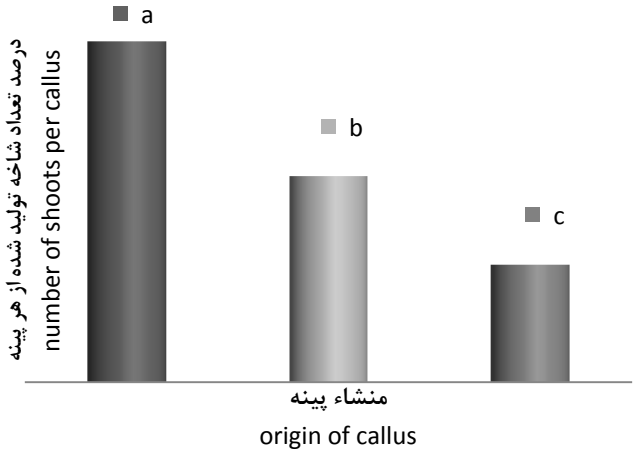


شکل ۱: مقایسه میانگین ریزنمونه‌های منشاء پینه از نظر میانگین باززایی (وجود حرف مشترک بین دو عدد، نشانه نداشتن اختلاف معنی دار آن دو عدد با یکدیگر در سطح ۵٪ احتمال خطا در آزمون دانکن می‌باشد)

Fig. 1: Comparison of means various origin of callus explants in means of regeneration (Values with the same letter are not significantly different at probability level of 5% Duncan test)

نتایج حاصل از مقایسه میانگین ریزنمونه برای تعداد شاخه تولید شده از هر پینه با منشاء متفاوت مطابق نتایجی که در پارامتر درصد باززایی از پینه به‌دست آمد، تعداد شاخه تولید شده از پینه‌های با منشاء گره با میانگین ۵/۸، نسبت به دو نوع پینه دیگر بیشتر بود که نشان‌دهنده توانایی بالای پینه این ریزنمونه در باززایی و تولید شاخه می‌باشد.

با توجه به نتایج درصد شاخه‌زایی ریزنمونه‌ها و تعداد شاخه تولید شده توسط پینه‌های با منشاء متفاوت (شکل ۱ و ۲)، پینه با منشاء برگ از لحاظ قدرت باززایی با میانگین ۵/۷ و تکثیر و تولید شاخه با میانگین ۲/۱ توانایی مناسب ندارد.



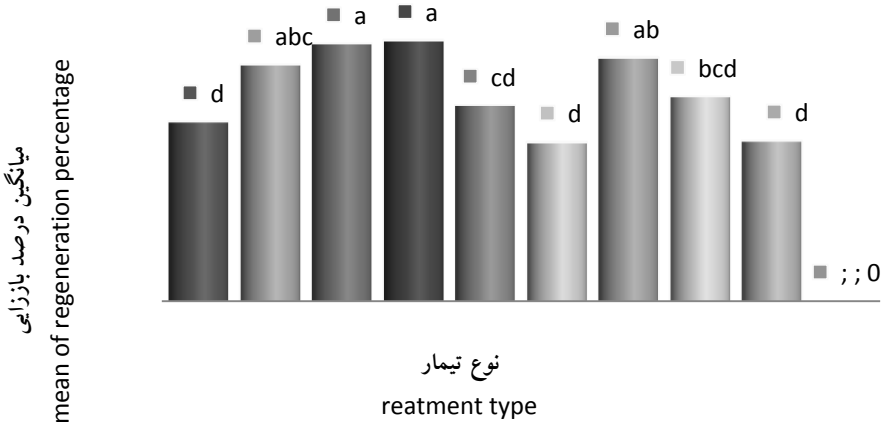
شکل ۲: مقایسه میانگین ریزنمونه‌های منشا پینه از نظر تعداد شاخه‌ی تولید شده از هر پینه (وجود حرف مشترک بین دو عدد، نشانه نداشتن اختلاف معنی‌دار آن دو عدد با یکدیگر در سطح ۵٪ احتمال خطا در آزمون دانکن می‌باشد)

Fig. 2: Comparison of means various origin of callus explants in number of shoots per callus (Values with the same letter are not significantly different at probability level of 5% Duncan test)

تأثیر تیمارهای هورمونی بر درصد باززایی شاخساره و تعداد شاخه‌های تولید شده از هر پینه

نتایج مقایسه میانگین نشان داد که از میان تیمارهای هورمونی به‌کار رفته، تیمارهای Kin با غلظت ۵/۰ میلی‌گرم در لیتر و TDZ با غلظت ۱/۰ میلی‌گرم در لیتر به‌ترتیب ۱/۰۳± ۸/۸۴ و ۱/۰۸± ۸/۹۵ دارای بالاترین میانگین باززایی بودند اما همان‌طورکه در بخش قبلی توضیح داده شد، شاخساره‌های تولید شده در تیمار هورمونی TDZ، بی‌شکل و غیرعادی بودند

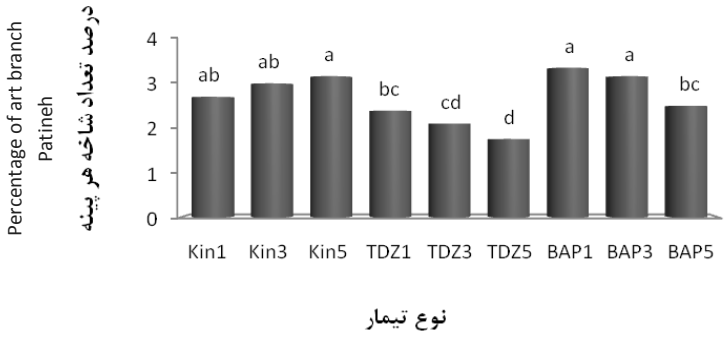
درحالی‌که در تیمار هورمونی Kin، شاخه‌های مستقیم و نرمالی تولید شدند. در مقابل در تیمارهای ۱/۰ میلی‌گرم در لیتر Kin، ۵/۰ میلی‌گرم در لیتر TDZ و ۵/۰ میلی گرم در لیتر BAP، کمترین مقدار باززایی اتفاق افتاد. وضعیت سایر تیمارها نیز در شکل ۳ ارائه گردیده است. از یافته‌های به‌دست آمده می‌توان به این نتیجه رسید که غلظت‌های بالای هورمون Kin و غلظت‌های پایین دو هورمون TDZ و BAP در میزان شاخه‌زایی تأثیر مثبت دارند.



شکل ۳: مقایسه میانگین سطوح مختلف Kin، TDZ و BAP از نظر درصد باززایی شاخساره از پینه (نوع تیمار: ۱، ۳ و ۵ TDZ هورمون TDZ در غلظت‌های ۱، ۳ و ۵ میلی‌گرم در لیتر؛ ۱، ۳ و ۵Kin هورمون Kin در غلظت‌های ۱، ۳ و ۵ میلی‌گرم در لیتر؛ BAP ۱، ۳ و ۵ هورمون BAP در غلظت‌های ۱، ۳ و ۵ میلی‌گرم در لیتر) (وجود حرف مشترک بین دو عدد، نشانه نداشتن اختلاف معنی‌دار آن دو عدد با یکدیگر در سطح ۵٪ احتمال خطا در آزمون دانکن می‌باشد)

Fig. 3: Comparison of mean various level treatments on means of shoot induction per callus (treatment type: TDZ 1, 3, 5 in 1, 3 , 5 mg.l hormone concentrations; Kin 1, 3, 5 in 1,3, 5 mg. l hormone concentrations; BAP 1, 3, 5 in 1,3, 5 mg.l hormone concentrations (Values with the same letter are not significantly different at probability level of 5% Duncan test)

نتایج مقایسه میانگین نشان داد که از میان تیمارهای به‌کار رفته، تیمارهای ۵/۰ میلی گرم در لیتر Kin با میانگین ۳/۱۶، تیمار ۱/۰ و ۳/۰ میلی‌گرم در لیتر BAP با میانگین ۳/۳۵ و ۳/۱۶ دارای بالاترین میانگین در تعداد شاخه تولید شده بوده است. این نکته قابل ذکر است که شاخه‌های تولید شده توسط این تیمارها، شاخه‌های مستقیم و نرمال بودند. در مقابل تیمارهای ۳/۰ و ۵/۰ میلی‌گرم در لیتر TDZ با میانگین ۲/۱ و ۱/۷۵، کمترین مقدار تعداد شاخه را به خود اختصاص دادند. وضعیت سایر تیمارها نیز در شکل ۴ ارائه گردیده است. از یافته‌های به‌دست آمده می‌توان به این نتیجه رسید که هورمون BAP و Kin تقریباً در تمام غلظت‌های استفاده شده، همانند تأثیر بر توانایی شاخه‌زایی پینه، در تکثیر شاخه از پینه نیز تأثیر مثبت داشته، اما در هورمون TDZ با وجود این‌که تأثیر زیادی بر باززایی از پینه نشان داد اما در هر سه غلظت تأثیر مناسبی در تکثیر شاخه از پینه و ایجاد شاخه‌های نرمال به خوبی عمل نکرد. با توجه به شکل ۴ و مشاهدات صورت گرفته دو هورمون Kin و BAP نسبت به TDZ در ایجاد شاخه‌های نرمال مؤثرتر هستند.



شکل ۴: میانگین سطوح مختلف Kin، TDZ و BAP از نظر تعداد شاخساره از هر پینه (نوع تیمار: TDZ 1, 3, 5 هورمون TDZ در غلظت های ۱، ۳ و ۵ میلی‌گرم در لیتر؛ Kin 1, 3, 5 هورمون Kin در غلظت‌های ۱، ۳ و ۵ میلی‌گرم در لیتر؛ BAP 1, 3, 5 هورمون BAP در غلظت‌های ۱، ۳ و ۵ میلی‌گرم در لیتر) (وجود حرف مشترک بین دو عدد، نشانه نداشتن اختلاف معنی‌دار آن دو عدد با یکدیگر در سطح ۵٪ احتمال خطا در آزمون دانکن می‌باشد)

Fig. 4: Comparison of various treatments on means of number of shoot per callus (Values with the same letter are not significantly different at probability level of 5% Duncan test)

تأثیر تیمارهای هورمونی بر توانایی ریشه‌زایی گیاهچه‌ها و تعداد رشه تولید شده

تأثیر غلظت‌های مختلف دو هورمون NAA و IBA بر ریشه‌زایی گیاهچه‌ها در جدول ۴ نشان داده شده است. تجزیه واریانس اثر غلظت هورمون‌های مختلف بر ریشه‌زایی گیاهچه‌های تولید شده نشان داد که اثر ساده‌ی غلظت و هورمون بر روی درصد ریشه‌زایی (P<۰/۰۱) و برهمکنش غلظت و هورمون بر درصد ریشه‌زایی در سطح (P< ۰/۰۵) معنی‌دار گردید. درصورتی‌که اثر هورمون بر روی تعداد ریشه تولید شده در هر شاخه در سطح ۱ درصد احتمال خطا معنی‌دار گردید (P<۰/۰۱)، اما غلظت هورمون بر روی تعداد ریشه تولید شده تأثیر معنی‌دار نشان نداد، درحالی‌که برهمکنش نوع هورمون و غلظت بر تعداد ریشه تولید شده در سطح ۵ درصد احتمال خطا معنی‌دار گردید (P<۰/۰۵).

جدول ۴: تجزیه واریانس تأثیر نوع و غلظت هورمون روی درصد ریشه‌زایی و تعداد ریشه تولید شده در هر شاخه

Table 4: Variance analysis of the effect of the various hormone and concentration factors on root induction% and the number of roots produced per shoot

منابع تغییرات Source of variation	درصد ریشه‌زایی Rooting percentge		تعداد ریشه هر شاخه number of roots produced per shoot	
	درجه آزادی df	میانگین مربعات Mean Square	درجه آزادی df	میانگین مربعات Mean Square
غلظت هورمون Hormone concentration	2	8.349**	2	1.148ns
نوع هورمون(NAA, IBA) Hormone type (NAA, IBA)	1	21.470**	1	26.402 **
نوع هورمون(NAA, IBA) × غلظت هورمون Hormone concentration × hormone type (NAA, IBA)	2	2.284*	2	5.112*
خطای آزمایش Experiment error	18	0.424	18	0.547

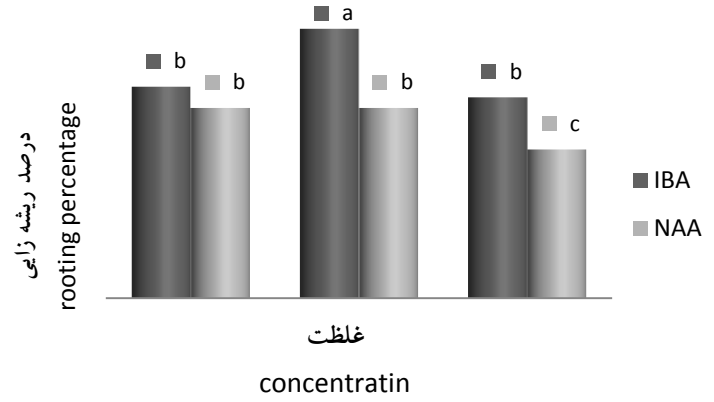
**: معنی‌دار در سطح ۱٪ *: معنی‌دار در سطح ۵٪

*, **: Significant in probability level of 5, 1%, respectively; ns: not significant

تأثیر تیمارهای هورمونی بر درصد ریشه‌زایی و تعداد ریشه تولید شده

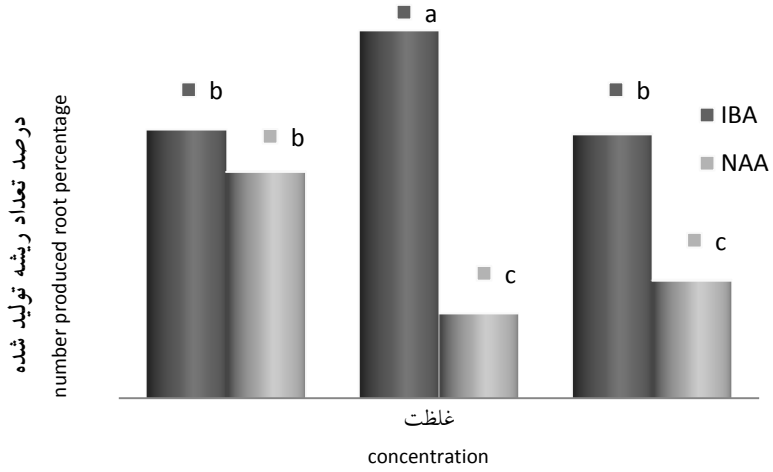
نتایج حاصل از مقایسه میانگین درصد ریشه‌زایی گیاهچه‌ها به روش دانکن در شکل ۵ نشان داده که مقدار ریشه‌زایی توسط هورمون IBA نسبت به هورمون NAA در همه غلظت‌ها بیشتر است. همچنین نشان داده شده که هورمون IBA در غلظت ۱/۰ میلی‌گرم در لیتر با میانگین ۷/۸۶ از سایر غلظت‌ها در هر دو هورمون در تولید ریشه مؤثرتر است. 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 ۵). مطابق نتایجی که در میزان ریشه‌زایی به‌دست آمد، در افزایش تعداد ریشه نیز هورمون IBA در غلظت ۱/۰ میلی‌گرم در لیتر با میانگین ۴/۸۷ نسبت به دو غلظت دیگر این هورمون تأثیر بیشتری از خود نشان داد اما در هورمون NAA و در غلظت مشابه با میانگین ۱/۱۲، کمترین تعداد ریشه تولید شد. همان‌طورکه در شکل ۶ نشان داده شده است هورمون NAA در غلظت ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر با میانگین ۳ نسبت به دو غلظت دیگر، تأثیر بیشتری در تولید ریشه داشت؛ بنابراین می‌توان به این نتیجه رسید که هورمون IBA هم به‌منظور القاء ریشه و هم تکثیر ریشه تأثیر بیشتری نسبت به هورمون NAA دارد. تعداد گیاهان ریشه‌دار شد توسط هورمون IBA، ۴۲ عدد و گیاهان ریشه‌دار شده توسط هورمون NAA، ۲۲ عدد که در مجموع ۶۴ عدد گیاهچه ریشه‌دار شده به‌دست آمد. بعد از تولید ریشه، همه گیاهچه‌های ریشه‌دارشده را به گلدان حاوی خاک برگ استریل شده انتقال داده شده و در یک اتاقک با شرایط کنترل شده‌ی نسبی نگهداری شدند. بعد از گذشت ۴ هفته میزان موفقیت در این مرحله تقریباً ۹۰ درصد بود و ۵۵ عدد نهال سالم ماندند (بخش ۸ شکل ۷). شکل ۷ مراحل تولید پینه از ریزنمونه‌های مختلف، شاخه‌زایی پینه‌ها و ریشه‌زایی گیاهچه‌ها را نشان می‌دهد.



شکل ۵: مقایسه میانگین سطوح مختلف IBA و NAA از نظر درصد ریشه‌زایی (وجود حرف مشترک بین دو عدد، نشانه نداشتن اختلاف معنی‌دار آن دو عدد با یکدیگر در سطح ۵٪ احتمال خطا در آزمون دانکن می باشد).

Fig. 5: Comparison of various treatments on means of root induction (Values with the same letter are not significantly different at probability level of 5% Duncan test).



شکل ۶: مقایسه میانگین سطوح مختلف IBA و NAA از نظر تعداد ریشه تولید شده (وجود حرف مشترک بین دو عدد، نشانه نداشتن اختلاف معنی‌دار آن دو عدد با یکدیگر در سطح ۵٪ احتمال خطا در آزمون دانکن می باشد)

Fig. 6: Comparison of various treatments on means of number of root per shoot (Values with the same letter are not significantly different at probability level of 5% Duncan test)

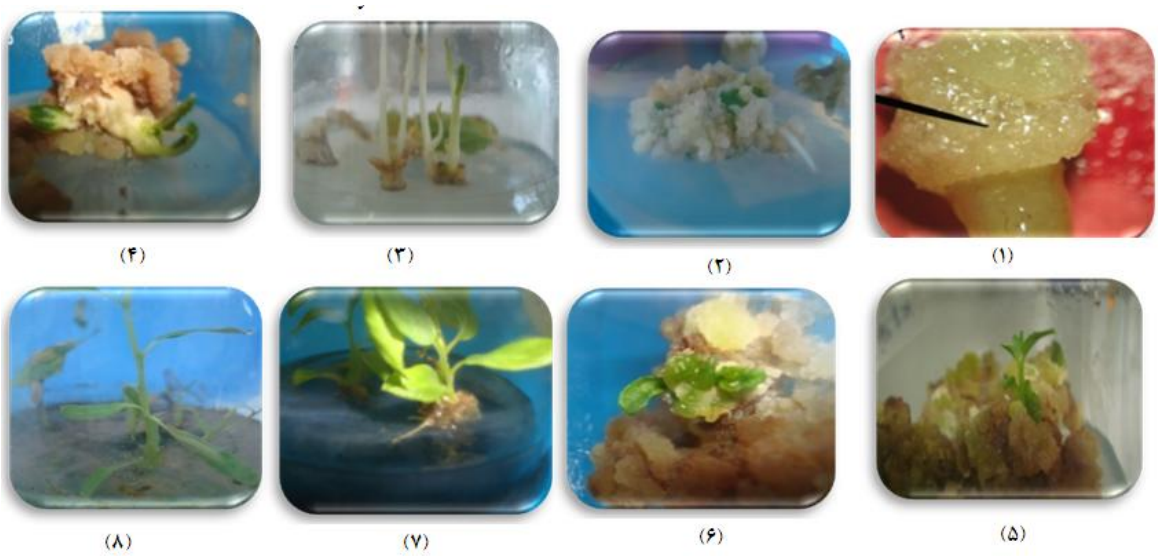
بحث

تولید پینه با کیفیت خوب (پینه‌های 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 *ژیوجیاَ* و همکاران (Xiaojia *et al*., 2006).

در این تحقیق به باززایی غیرمستقیم از طریق ایجاد پینه از ریزنمونه‌های ریشه، برگ و گره به‌دست آمده از گیاهچه استریل پرداخته و دستورالعمل ایجاد پینه و باززایی پینه‌های ایجاد شده به‌دست آمد.

سرعت بالا در تولید پینه از ریزنمونه برگ، منجر به کثرت پینه‌های مشتق شده از برگ نسبت به دیگر ریزنمونه‌ها می‌شود؛ بنابراین می‌توان گفت که برگ‌ها بهترین ریزنمونه برای تمایز بافت پینه در کُنار می‌باشند. یکی از دلایل افزایش مقدار پینه در ریزنمونه برگ در مقایسه با ریزنمونه گره و ریشه می‌تواند بزرگ‌تر بودن سطح زخم ایجاد شده در هنگام کشت باشد، زیرا اندازه ریزنمونه برگ از دو ریزنمونه دیگر بزرگ‌تر بوده و بنابراین زخم ایجاد شده نیز بیشتر می‌باشد. لذا افزایش سطح زخم منجر به جذب عناصر غذایی و تنظیم‌کننده‌های رشد شده است *ال سلیمان و برکت* (Al-Sulaiman and Barakat, 2010). مطالعات متعدد نشان دادند که برای تولید پینه با هدف باززایی، ریزنمونه برگ مفید واقع شده است. به‌عنوان مثال مطالعات روی باززایی گونه‌های برگ گونه *Acacia mangium* و *Vaccinium macrocarpon* نشان داد که برگ بهترین ریزنمونه به‌منظور تولید پینه بیشتر می‌باشد *کیو* و همکاران؛ *مینرس* و همکاران (Qu *et al*., 2000; Meiners *et al*., 2007).

در این مطالعه، روی ریزنمونه گره از تقاطع انشعاب شده از ساقه، شاخه‌های نابه‌جا تولید شد (بخش ۳ شکل ۷). بخش‌های گره‌دار ساقه، نواحی پیش مریستمی فعالی دارند که برای تکثیر غیرجنسی مناسب هستند زیرا به آسانی مورد دستورزی قرار گرفته و به آسانی تکثیر می‌شود *ویجایا چیترا و پادماجا* (Vijaya Chitra and Padmaja, 1999). همچنین این نتایج مشابه با تحقیقی است که بر روی ریزنمونه گره از گونه *peony* انجام شده است *تیان* و همکاران (Tian *et al*., 2010). کشت عمودی ریزنمونه گره بر روی محیط‌کشت، به‌طوری‌که قسمت انتهایی از محیط‌کشت بیرون باشد، در باززایی مستقیم و تولید شاخه‌های نابه‌جا تأثیر بسزایی دارد *مامون* و همکاران (Mamun *et al*., 1996).



شکل ۷: (۱) پینه تولید شده توسط ریزنمونه گره (۲) ریشه مویی تولید شده توسط ریزنمونه برگ کشت شده بر روی محیط‌کشت MS حاوی 1mg/l NAA + (۳) شاخه‌های تولید شده (مستقیم) از ریزنمونه گره کشت شده بر روی MS حاوی 1 mg/l BAP (۴) باززایی پینه بر روی محیط‌کشت MS حاوی 1 mg/l TDZ (۵) شاخه‌زایی بر روی محیط‌کشت MS حاوی 5 mg/l Kin (۶) باززایی نامناسب پینه بر روی محیط‌کشت MS حاوی 5 mg/l BAP(۷) آغاز ریشه‌زایی در گیاهچه‌ی کشت شده بر روی محیط‌کشت حاوی هورمون IBA (۸) نمونه‌ای از گیاهان انتقال داده شده به گلدان حاوی خاک برگ استریل شده

Fig. 7: (1) yellow embryogenic callus of node explants (2) root hairs produced of leaf explants on MS+1mg/l NAA (3) direct shoot induction from node segments cultured in the MS medium containing 1mg/l BAP (4) unusual shape and abnormality adventitious shoots formation on medium supplemented with 1mg/l TDZ (5) adventitious shoots regenerated of culture on MS supplemented with 5 mg/l Kin (6) Multiple adventitious shoots of culture on MS supplemented with 5 mg/l BAP (7) Root formation on the medium containing 1 mg/l IBA (8)The first days of transfer to soil

برخلاف این دو هورمون NAA و BAP، هورمون‌های TDZ و 2,4-D تأثیر بسیار زیادی در تولید پینه و شکل‌زایی (مورفوژنز) آن داشتند. هورمون TDZ شبه سایتوکنین مؤثر در کشت بافت گونه‌های چوبی می‌باشد *کرمی* (Karami, 2008). در همه‌ی غلظت‌های TDZ در هر سه ریزنمونه استفاده شده، افزایش تولید و تکثیر پینه مشاهده شد و نتایج تمام غلظت‌ها تقریباً مشابه بود (جدول ۱). این نتیجه با یافته‌های تحقیقی که از هورمون TDZ برای تولید و تکثیر پینه گونه *Arbutus unedo* و همچنین در تحقیق دیگر بر روی گونه *Jatropha curcas* استفاده کردند مشابه بود *هار و وان استادن*؛ *شارما کومار و ردی* (Hare and Van staden, 1994; Sharma Kumar and Reddy, 2011). اکسین 2,4-D به‌تنهایی یا در ترکیب با سایتوکینین به‌طور گسترده در تولید و حفظ پینه استفاده می‌شود (Chen and Chang, 2000) و در تحقیقات زیادی مشـــاهده شد که 2,4-D بهترین و معمول‌ترین اکسین به‌منظور تولید پینه در تک‌لپه‌ای‌ها و حتی در دولپه‌ای‌ها می‌باشد (Mansor far, 2011) که موافق با این نتایج بود. همانند این تحقیق تأثیر بازدارندگی 2,4-D با افزایش غلظت در یافته‌های دیگر نیز مشاهده شد *عارفی* و همکاران (Arefi *et al.*, 2003). در تحقیقاتی که در گذشته صورت گرفته بیان شده که هورمون NAA اکسین بسیار مناسبی به‌منظور ریشه‌زایی می‌باشد که در ازدیاد درون‌شیشه‌ای چندین گونه گیاهی این نکته به اثبات رسیده است *مارکوئیز* و همکاران (Marques *et al.*, 2011).

پینه‌های تشکیل شده دارای یک سری تفاوت‌های درونی در محل‌های تقسیم سلولی، تفاوت‌های تمایزی و تفاوت در تعداد کروموزوم‌ها و توانایی شکل‌زایی می‌باشند؛ بنابراین سلول‌های داخلی پینه هرگز مشابه نیستند *آئی* و همکاران (Aea *et al.*, 1998)؛ بنابراین دلایل می‌توان به این نتیجه رسید که از آنجایی‌که سلول‌های تشکیل‌دهنده یک پینه متفاوت هستند، لذا پینه‌های تشکیل شده با منشاء متفاوت نیز دارای تفاوت در قابلیت باززایی هستند. دلیل دیگر که می‌توان برای بالاتر بودن قابلیت باززایی ریزنمونه گره نسبت به سایر ریزنمونه‌ها مطرح کرد، این است که اکثر پینه‌های تولیدی توسط ریزنمونه گره و ریشه، پینه‌های رویان‌زا بوده، درصورتی‌که پینه‌های تولید شده توسط ریزنمونه برگ بیشتر پینه‌های غیررویان‌زا تولید کردند. پینه‌های رویان‌زا بهتر می‌توانند اندام تولید *کنند اثنی عشری و زکایی خسروشاهی* (Asnaashari and Zokaee khosrashahi, 2011). بیان شده که سرعت تشکیل و رشد پینه‌های رویان‌زا پایین بوده *لو* (Lu, 2002) که در مطالعه‌ای که بر باززایی گونه *Oncidium* انجام داده شد، به این نتیجه رسیده شد که ریزنمونه ریشه نسبت به ریزنمونه برگ پینه‌های رویان‌زای بیشتری تولید کرد. در این تحقیق ظرفیت باززایی بالای ریشه را، به‌دلیل مبداء پینه از سلول‌های مریستمی نوک ریشه توضیح دادند *گومز-لیوا* و همکاران (Gomez-Leyva *et al.*, 2008).

با استناد به مشاهدات می‌توان به این نتیجه رسید که هورمون Kin هم در توان باززایی پینه‌ها و تولید آنها و هم در تکثیر آنها از دو هورمون دیگر مؤثرتر بود. در این تحقیق با افزایش غلظت Kin، باززایی و توانایی در تولید شاخساره، افزایش پیدا کرد. در تحقیقی که بر روی گونه *Capsicum frutescens* L صورت گرفت به همین نتیجه دست یافتند (Sanatombi and Sharma, 2007). در گزارشات متعددی آورده شده که TDZ در تشکیل شاخه بعضی از گونه‌ها به‌ویژه گونه‌های چوبی مؤثر می‌باشد *مالیتی* و همکاران (Maliti *et al.*, 2005) که نتیجه این مطالعه نیز با این یافته‌ها مشابه بوده و TDZ تأثیر بالایی در باززایی از کالوس و تولید شاخه داشت.TDZ محرک سنتز و انباشتگی بازهای پورین است. علاوه‌بر آن متابولیسم سایتوکینین را تغییر داده و موجب افزایش سطح سایتوکینین درونی به‌وسیله بازدارندگی عملکرد سایتوکینین اکسیداز خواهد شد *کومار* و همکاران؛ *موریتی* و همکاران (Kumar *et al.*, 2011; Murthy *et al.*, 1998). برخلاف این نتیجه در تحقیقی که بر روی گونه *Punica granatum* L. صورت گرفت بیان شد، از بین سایتوکینین‌های استفاده شده TDZ کمترین تأثیر را در تولید شاخه داشت *نیک* و همکاران (Naik *et al.*, 1999). این تناقض می‌تواند به این دلیل باشد که تأثیر هورمون‌ها در گونه‌ها و حتی بین ژنوتیپ‌های یک گونه متفاوت است. در مطالعه حاضر، توان باززایی کالوس‌ها در حضور هورمون TDZ بالا بود اما شاخه‌های تولید شده توسط این هورمون کوتاه و دفرمه بودند (بخش ۴ شکل ۷). گزارش مشابه با این نتیجه، در تحقیقی که بر روی گونه *Acacia seyal* Del صورت گرفت اعلام شد (*عارفی و همکاران*، 2003). علاوه‌بر این در این تحقیق مشاهده شد که هورمون TDZ در غلظت‌های پایین در باززایی تأثیر بیشتری داشت زیرا با افزایش غلظت این هورمون شاخه‌زایی کاهش پیدا می‌کند (شکل ۲). در تحقیقی که بر روی ریزنمونه برگ گونه *Ziziphus jujuba* صورت گرفت به این نتیجه رسیدند که غلظت‌های پایین TDZ بر تولید شاخه تاثیر بیشتری دارد *ژانگ و جیو* (Zhang and Gu, 2005). 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 جوانه-

های جانبی را افزایش می‌دهد جیو و همکاران، 2005؛ *حسندخت و ابراهیمی* (Guo *et al.*, 2005; Hasandokht and Ebrahimi, 2009). در این تحقیق، مشخص شد که غلظت‌های پایین BAP تأثیری بیشتری در تولید شاخه دارد. این نتیجه با یافته‌هایی که بر روی ریزنمونه گره گونه کنار انجام دادند مشابه است (*عصاره و سردابی*، 2005). این نکته قابل ذکر است که با افزایش مقدار این هورمون در محیط‌کشت توان تولید و روند افزایشی تعداد شاخه‌ها کاهش پیدا می‌کند، این نتیجه با یافته‌های تحقیقی که توسط *السلیمان و برکت* (2010) بر روی ریزنمونه گره گونه کنار انجام دادند مشابه است. غالبیت سایتوکینین BAP در توان باززایی و تولید و تکثیر شاخه *راچور* و همکاران (Rathore *et al.*, 2007) و همچنین از لحاظ بیولوژیکی *اونوفریو و مورینی* (Onofrio and Morini, 2006)، نسبت به سایتوکینین Kin در اغلب گونه‌های چوبی اعلام شده است. درصورتی‌که در تحقیق حاضر هورمون Kin از دو هورمون استفاده شده دیگر عکس‌العمل بهتری نشان داد و هم در توان تولید و هم در تکثیر و تعداد شاخه‌زایی تأثیر بالاتری داشت. در تحقیقی که بر گونه‌های دیگر این خانواده صورت گرفت، گونه *Z.nummularia* *ماچور* و همکاران (Machur *et al.*, 1993)، گونه *Z. jujuba* *چنقو* و همکاران (Chenghou *et al.*, 2004) و *Z. mauritiana* *عباس* (Abass, 2010.)، نیز به همین نتیجه دست یافتند، که تاثیر BAP کمتر از Kin در پرآوری شاخه داشت. در مرحله ریشه‌زایی هورمون IBA هم در تولید ریشه و هم در افزایش تعداد ریشه از هورمون NAA مؤثرتر بود. هورمون IBA به‌طور گسترده به‌منظور ریشه‌زایی گیاهانی که به‌سختی ریشه‌دار شده و معمولاً در گونه‌های چوبی به کار برده می‌شود (*راچور* و همکاران، 2007). در تحقیقات دیگری که بر روی همین گونه صورت گرفت، تأثیر هورمون IBA بر ریشه‌زایی نسبت به سایر اکسین‌ها بیشتر بود (*عصاره و سردابی، 2005*؛ *سادهرسان و حسین، 2003*). در تحقیقی بر روی گونه *Pongamia pinnata* L صورت گرفت IBA تاثیر زیادی بر روی تعداد ریشه داشت *شریواستاوا و کانت* (Shrivastava and Kant, 2010). *خلف‌آلا* و همکاران (2010) 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 موثر است. *سینق و تیواری* (2010) در تحقیق خود به تأثیر کم IBA در غلظت‌های بالا (۲ میلی‌گرم به بالا) پی بردند. *احمد* و همکاران (2010) در ریشه‌زایی گونه *Ruta graveolens* دریافتند که با افزایش غلظت NAA تعداد ریشه، در فاز ریشه‌زایی کاهش می‌یابد. این نتایج با یافته‌های این تحقیق مطابقت داشت. کاهش مقدار نمک‌های معدنی موجود در محیط‌کشت، مرحله انتقال به خاک و سازگاری ریشه را راحت‌تر می‌کند *گومز* و همکاران (Gomes *et al.*, 2010). تأثیر کاهش نمک و ساکارز در فاز ریشه‌زایی در گزارش متعددی بیان شده است *ناگوری و پیورهیت* (Nagori and Purohit, 2004). بر همین اساس در تحقیق حاضر نیز از محیط‌کشت 1/2MS به‌منظور ریشه‌زایی استفاده شد و نتایج مطلوبی مشاهده شد.

نتیجه‌گیری کلی

باتوجه به منابع موجود تحقیق حاضر، اولین گزارش دستورالعمل کامل به‌منظور تولید پینه از ریزنمونه برگ، گره و ریشه گونه کُنار و باززایی از این گونه محسوب می‌شود. تشکیل پینه برای باززایی بافت‌های تراریخت لازم است. در مرحله بعد سیستم باززایی از پینه است که دستورالعمل تکثیر گیاه برای این گونه را به‌وجود می‌آورد. این دستورالعمل، نه تنها برای مطالعه و تحقیقات بیشتر بر روی این گونه 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.

منابع:

جهت مطالعه منابع به صفحه‌های ۱۱-۹ متن انگلیسی مراجعه شود.