مقاله پژوهشی

نشریه علمی تحقیقات ژنتیک و اصلاح گیاهان مرتعی و جنگلی ایران شناسه دیجیتال (DOI): 10.22092/ijrfpbgr.2019.126854.1346

جلد ۲۸، شماره ۱، صفحه ۷۸-۶۷ (۱۳۹۹) شناسه دیجیتال (DOR): 98.1000/1735-0891.1398.28.69.55.1.1578.1607

تأثیر محیط کشت و تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی بر شاخص‌های رشدی گونه انارشیطان *Tecomella undulata (Roxb.) Seem* در شرایط درون شیشه

میترا امام*[۱]، لیلا میرجانی[۲]، محسن حسام‌زاده حجازی[۳] و محمد امین سلطانی‌پور[۴]

۱*- نویسنده مسئول مکاتبات، استادیار پژوهشی، گروه مستقل تحقیقات زیست فناوری، مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران

پست الکترونیک: Emam@rifr -ac.ir

۲- پژوهشگر، گروه مستقل تحقیقات زیست فناوری، مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران

۳- دانشیار، گروه مستقل تحقیقات زیست فناوری، مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران

۴- استادیار، بخش تحقیقات منابع طبیعی، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان هرمزگان، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، بندرعباس

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۴/۹ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۷/۲۰

چکیده

درخت انارشیطان (*Tecomella undulate*) یکی از گونه‌های انحصاری و در معرض خطر انقراض در ایران می‌باشد. این گیاه از تیره Bignoniaceae است و در جنوب ایران رشد می‌کند. با توجه به ویژگی‌های خاص این گیاه از جنبه‌های مختلف دارویی، زینتی و منابع طبیعی، تولید انبوه آن از طریق کشت بافت و ایجاد گیاهان یکسان از لحاظ ژنتیکی، ضروری به نظر می‌رسد. با استفاده از ریزنمونه‌های جوانه، تأثیر تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی بر شاخص‌های رشدی (تعداد جوانه و شاخه، طول شاخساره، سبزینگی شاخه و ریشه‌زایی) گونه مزبور در شرایط درون شیشه بررسی شد. روش بهینه استریل با غوطه‌وری جوانه‌ها در محلول کلرید جیوه ۰/۱ درصد با زمان ۴ دقیقه و در فصل بهار انجام شد. بهترین شاخه‌زایی در محیط پایه MS با تیمار BA ۱ و Kin۰/۵ میلی‌گرم در لیتر مشاهده شد. به‌طوری‌که این تیمار با میانگین تعداد شاخه‌زایی ۴/۹ و رشد طولی شاخه ۷/۷۸ سانتی‌متر بهترین گزینه برای این مرحله بود. در مرحله ریشه‌زایی با وجود تیمارهای متعدد اعمال شده محیط کشت و هورمون (انواع غلظت‌های هورمون اکسین)، شروع ریشه‌زایی تنها در تیمار 1/2MS IBA2 دیده شد.

واژه‌های کلیدی: انار شیطان، کشت بافت، ریزازدیادی، بومی.

مقدمه

انار شیطان *Tecomella undulata (Roxb.) Seem* تنها جنس و گونه بومی این تیره در مناطق جنوبی ایران می‌باشد. این گیاه دوپایه و نیمه خزان‌کننده با حالت درختی و درختچه‌ای است. گل‌آذین خوشه‌ای کم‌گل و گل‌های آن بدون بو به رنگ زرد، نارنجی و قرمز اناری دیده می‌شود. دانه‌ها بالدار و بال‌ها ضخیم غشایی است. زمان گلدهی در اوایل دی و میوه‌دهی در خردادماه است (Mozaffarian, 2009). در ایران دو ریختی

گرده، پیش‌پرچمی و فقدان گرده‌افشان‌ها در رویشگاه گیاه باعث عدم تولید میوه و بذر شده است (Rezanejad *et al.*, 2018). پراکندگی جغرافیایی آن در ایران در خوزستان (اندیمشک و شوش)، فارس (اطراف جهرم، لار، کازرون و میمند، فراشبند و فیروزآباد)، بوشهر (شهرستان جم)، کرمان (اطراف جیرفت و دلفارد) و هرمزگان گزارش شده است.

انارشیطان کاربردهای فراوانی در زمینه‌های گوناگون ازجمله مصارف دارویی، زینتی، جنگل‌کاری، تولید الوار، بیابان‌زدایی و غیره دارد. پوست گیاه انار شیطان حاوی لاپاکول بوده که یک ترکیب نفتوکوئینونی همراه با اثرهای ضد سرطانی، ضد باکتریایی، ضد قارچی و ویروسی می‌باشد (Mohsenzade *et al.*, 2012). انارشیطان به دلیل تا حدی همیشه سبز بودن و گوناگونی رنگ گل‌های بسیار زیبایش، قابلیت تبدیل شدن به یک گیاه زینتی پرکاربرد را به‌ویژه در نواحی خشک و گرمسیری دارد. از سوی دیگر به دلیل پایداری فراوان در برابر خشکی می‌توان از آن به‌عنوان گیاهی برای پوشش فضای سبز مناطق خشک و صنعتی استفاده نمود. گونه‌ای از این گیاه دارای چوب ضخیم، محکم و بادوام است که برای تولید لوازم چوبی، مبلمان و اسباب بازی، منبت‌کاری و تولید ابزارهای چوبی کشاورزی مورد استفاده قرار می‌گیرد (Negi *et al.*, 2012). بر اساس گزارش Shekarchian و همکاران (۲۰۱۰)، قلمه‌های گرفته شده از ریشه پاجوش درخت انارشیطان با قطر ۱/۵– سانتی‌متر ۱۰۰ درصد موفقیت داشته است ولی تکثیر انارشیطان از طریق قلمه در IBA با غلظت ppm ۳۰۰۰ تا ۲۲ درصد موفقیت داشته که مطلوب نبوده است. در گزارشی Salehi و همکاران (۲۰۱۳) تکثیر گیاه را از طریق بذر با تحریک هورمون حیبرلیک اسید و نیترات پتاسیم و همچنین ریشه‌زایی قلمه‌های گیاه (سخت، نیمه‌سخت و علفی) را با استفاده از دو تیمار NAA و IBA در دو زمان مختلف (اواخر پاییز و اواخر زمستان) انجام دادند. مشخص شد که کاربرد IBA و NAA در اواخر زمستان تأثیر بسزایی در ریشه‌زایی قلمه‌ها داشته که بالاترین درصد ریشه‌زایی این گیاه در قلمه‌های چوب سخت و با تیمار ۳۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر NAA به‌دست آمد. در زمینه تکثیر غیرجنسی گیاه از طریق ریزازدیادی، Uthaman (۱۹۹۳) یک روش مؤثر ریزازدیادی را از کالوس حاصل از ریزنمونه‌های میان‌گره شرح داده است. Kumar و Singh (۲۰۱۲) یک پروتکل کارآمد را برای تکثیر گیاه از طریق کشت سرشاخه گیاهان ۲– ۳ ساله در محیط کشت MS بدست آوردند.

در سال‌های اخیر با بروز پدیده تغییر اقلیم ازجمله خشکسالی‌های متوالی، بسیاری از گونه‌های گیاهی ازجمله انارشیطان در عرصه‌های منابع طبیعی کشور در معرض خطر تهدید یا انقراض قرار گرفته است. این گیاه با استفاده از بذر در هند و پاکستان قابل افزایش می‌باشد، ولی در کشور ایران قادر به تولید میوه و بذر نیست، از سویی به دلیل چرای دام و بهره‌برداری‌های بی‌رویه ساکنان محلی برخی از مناطق برای مصرف سوخت و کاربردهای دارویی، گیاه در حال انقراض است. به‌طور طبیعی نحوه تکثیر معمول این گیاه در زیستگاه خود با تولید پاجوش می‌باشد که البته در این روش نیز با توجه به جمعیت کم این گیاه در رویشگاه‌های طبیعی محدودیت فراوانی وجود دارد (Golamian, 2018).

با توجه به در معرض خطر انقراض بودن گیاه بومی و باارزش انارشیطان، هدف از انجام این تحقیق تولید انبوه گیاه از طریق کشت بافت به‌منظور ایجاد گیاهان یکسان از لحاظ ژنتیکی برای احیای عرصه‌های طبیعی آن می‌باشد.

مواد و روش‌ها

پایه‌های انارشیطان در استان هرمزگان (منطقه گنو) شناسایی شد. شاخه‌های سه پایه مختلف در منطقه در فصول مختلف سال با طول ۲۰ تا ۳۰ سانتی‌متر تفکیک شد. بعد از تقسیم شاخه به قطعات کوچک حاوی جوانه و حذف برگ‌های آن به‌منظور جلوگیری از دست رفتن آب، بسته‌بندی آنها در کیسه‌های پلاستیکی تمیز انجام شد و در داخل یخدان‌های حاوی قالب یخ به آزمایشگاه محل اجرای طرح حمل شد و در کوتاه‌ترین زمان مورد سترون‌سازی و کشت قرار گرفتند.

مراحل سترون‌سازی شامل برس‌کشی با مایع ظرفشویی،

برس‌کشی با محلول اتانول ۷۰ درصد، استفاده از محلول قارچ‌کش تیرام ۰/۲ درصد و قرار دادن نمونه‌ها به مدت ۳۰ تا ۶۰ دقیقه زیر آب جاری بود. تعداد تکرار حدود ۶۰ ریزنمونه بود. از این مرحله، کار در زیر هود مخصوص کشت انجام شد. برای سترون کردن جوانه‌ها از محلول سترون‌سازی شامل محلول هیپوکلریت سدیم تجاری با یک درصد کلر فعال در زمان‌های مختلف (۶ تا ۱۲ دقیقه) و محلول کلرید جیوه (۰/۱ درصد) از زمان‌های (۲ تا ۱۵ دقیقه) با توجه به فصل برداشت نمونه از عرصه استفاده گردید. برای حذف این محلول‌ها در هر مرحله، جوانه‌ها ۳ بار با آب مقطر سترون شده شستشو داده شدند. ریزنمونه‌ها معمولاً حاوی یک یا دو جوانه و یک پایه به ابعاد ۰/۵ تا ۱ سانتی‌متر بودند. قبل از قرار دادن ریزنمونه در محیط، ۱ تا ۲ میلی‌متر از انتهای قاعده آن قطع گردید (شکل ۱).

محیط کشت‌های بکاررفته در این تحقیق محیط‌های MS و ۱/۲ MS (ماکرونیترات نصف محیط پایه) بود (Murashige and Skoog, 1962). نمک‌های معدنی و ویتامین‌های دو محیط کشت MS و ۱/۲ MS با ساکارز ۳ درصد و آنتی‌اکسیدان PVP (پلی وینیل پیرولیدون) به غلظت ۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر استفاده شد. ریزنمونه‌ها در محیط غذایی شامل سیتوکنین‌های مختلف (BA,2iP, Kin) و اکسین (IBA, NAA) (جدول ۱) کشت شدند. محیط‌های کشت با ۶/۸ گرم در لیتر آگار (شرکت Fluka) جامد و برای مدت ۲۰ دقیقه اتوکلاو شدند. کشت‌ها در شرایط نوری ۱۶/۸ (۱۶ ساعت نور (۵۰۰۰– ۳۰۰۰ لوکس) و ۸ ساعت تاریکی) و دمای ۲۵ –۲۳ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

در ضمن از ویتامین‌های اضافی در ترکیب محیط کشت استفاده شد. طرز درست کردن محلولهای غلیظ این مواد در جدول ۲ آورده شده است.

جدول ۱– تیمارهای محیط کشت و هورمون مورد استفاده در مرحله شاخه‌زایی

نام تیمار	محیط‌کشت	هورمون سیتوکنین								
		BA			Kin		2iP			
		۰	۰/۵	۱	۰	۰/۵	۰	۰/۵	۱
تیمار۱	(MS)	–	-	+	–	+	–	–	–
تیمار۲	(MS)	-	-	+	+	–	–	+	–
تیمار۳	(MS)	-	+	-	+	–	–	–	+
تیمار۴	(MS)	+	-	-	–	+	–	–	+
تیمار۵	(۱/۲MS)	-	-	+	–	+	–	–	–
تیمار۶	(۱/۲MS)	-	-	+	+	–	–	+	–
تیمار۷	(۱/۲MS)	-	+	-	+	–	–	–	+
تیمار۸	(۱/۲MS)	+	–	-	–	+	–	–	+

غلظت هورمون‌ها برحسب میلی‌گرم در لیتر می‌باشد.

جدول ۲– نحوه تهیه ویتامین‌های مختلف برای اضافه کردن به محیط کشت

نام ویتامین	میلی‌گرم در لیتر محیط کشت	غلظت در ۱۰۰ میلی‌لیتر محلول غلیظ (میلی‌گرم)
Biotin	۱	۲۰
Ca- Panthotenate	۰/۵	۱۰
Riboflavin	۰/۵	۱۰
Folic acid	۰/۵	۱۰

از محلولهای ذکرشده به مقدار ۵ میلی‌لیتر برای تهیه یک لیتر محیط کشت به آن اضافه شد. شیشه‌های حاوی محلولهای ویتامین در داخل فریزر نگهداری شدند. چون این محلول‌ها در برابر درجه حرارت بالای اتوکلاو تجزیه شده و خاصیت شیمیایی خود را از دست می‌دهند، بنابراین این قبیل مواد حساس به وسیله دستگاه مخصوص فیلتر کردن (میلی‌پور) سترون می‌شوند. این عمل با کمک پمپ خلأ و در حالت مکش انجام می‌شود. این محلول‌ها را پس از سترون کردن به محیط کشت سترون شده در اتوکلاو قبل از آنکه به دمای ۴۰ درجه سانتیگراد برسد، اضافه می‌کنند.

برای کاشت ریزنمونه‌ها از شیشه‌های کوچک دارویی حاوی ۵ میلی‌لیتر محیط کشت استفاده شد. برای جلوگیری از شیوع آلودگی، در هر شیشه یک نمونه قرارداده شد. واکشت جوانه‌ها به‌طور ماهیانه انجام شد و در طی این مدت نمونه‌های آلوده و یا نکروزه از مجموعه کشت حذف و تنها جوانه‌های سالم و سبز و در حال رشد واکشت شدند. در هر واکشت علاوه بر استفاده از محیط‌های کشت برای یافتن بهترین و مناسب‌ترین ترکیب تنظیم کننده‌های رشد، تیمارهای مختلفی از اکسین‌ها و سیتوکینین‌ها مورد بررسی قرار گرفتند. پس از استقرار و رشد جوانه‌ها، برای شروع شاخه‌زایی، تعداد ۸ تیمار هورمونی از سیتوکنین‌های (Kin, BA, 2iP) در غلظت صفر تا ۱ میلی‌گرم در لیتر در دو نوع محیط کشت MS و MS با ۱/۲ غلظت نیترات استفاده شد (جدول ۱). لازم به ذکر است که در طی این آزمون IBA در غلظت ۰/۰۱ میلی‌گرم در لیتر به‌طور ثابت فرض شد. تعداد تکرارها برای هر تیمار ۵ عدد و هر تکرار شامل ۳ ریزنمونه بود و این عملیات در طی سه واکشت و با تناوب زمانی ۴ هفته انجام شد. برای آزمون آماری، اعداد مربوط به شاخص‌های رشدی ضریب ازدیاد (متوسط تعداد جوانه و شاخه در هر تکرار)، رشد طولی و سبزینگی شاخه‌ها انتخاب شد. قابل ذکر است که عامل سبزینگی به دلیل کیفی بودن آن باید به صورت کمی تعریف شود. بنابراین در این تحقیق، رنگ برگها از سبز پررنگ تا زرد رنگ با معیارهای از ۴ تا ۱ تعریف و بعد با استفاده از آزمون کروسکال والیس (Kruskal Wallis Test) و به‌صورت ناپارامتری مورد بررسی قرار گرفتند. در مرحله ریشه‌زایی، انتقال شاخه‌های با طول دو سانتی‌متر از مرحله شاخه‌زایی به محیط کشت MS بدون هورمون برای یک ماه به‌عنوان پیش‌تیمار ریشه‌زایی انجام شد. برای مرحله ریشه‌زایی، استفاده از گیاهک‌های درون شیشه‌ای دارای یک تا دو گره به طول ۲ سانتی‌متر در تیمارهای مختلف از هورمون ریشه‌زایی IBA و NAA در غلظت‌های متفاوت (۰/۵، ۱، ۲ و ۴ میلی‌گرم در لیتر) به‌تنهایی و به‌طور تلفیقی بودند (جدول ۳). برای هر تیمار تعداد ۳ تکرار و در هر تکرار ۵ ریزنمونه استفاده شد. این نمونه‌ها برای یک ماه در شرایط اتاق رشد و دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و روشنایی ۲۵۰۰ لوکس لامپ‌های با نور سفید قرار گرفتند. بعد از یک ماه عوامل درصد ریشه‌زایی ثبت گردید.

تجزیه‌های آماری از طریق آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملا تصادفی و با استفاده از برنامه نرم‌افزاری SPSS (version 16.1) انجام شد و آزمون نرمالیته داده‌ها با ضریب Anderson-Darling انجام گردید. مقایسه و دسته‌بندی میانگین‌ها به روش دانکن در سطح معنی‌داری ۵ درصد انجام شد.

جدول ۳- تیمارهای مختلف ریشه‌زایی درون شیشه

نام تیمار	هورمون اکسین ($mg.l^{-1}$)									
	IBA					**NAA**				
	۰	۰/۵	۱	۲	۴	۰	۰/۵	۱	۲	۴
تیمار۱	–	+	–	–	–	–	–	–	–	–
تیمار۲	–	–	+	–	–	–	–	–	–	–
تیمار۳	–	–	–	+	–	–	–	–	–	–
تیمار۴	–	–	–	–	+	–	–	–	–	–
تیمار۵	–	–	–	–	–	–	+	–	–	–
تیمار۶	–	–	–	–	–	–	–	+	–	–
تیمار۷	–	–	–	–	–	–	–	–	+	–
تیمار۸	–	–	–	–	–	–	–	–	–	+
تیمار۹	–	+	–	–	–	–	+	–	–	–
تیمار۱۰	–	–	+	–	–	–	–	+	–	–
تیمار۱۱	–	–	–	+	–	–	–	–	+	–

نتایج

ضدعفونی کردن جوانه‌ها در فصل تابستان با استفاده از تیمار محلول هیپوکلریت سدیم ۲۰ درصد (یک درصد کلر فعال) در محدوده زمانی از ۶ تا ۱۲ دقیقه انجام شد (جدول ۴). به‌طوری‌که بالاترین درصد زنده‌مانی جوانه‌ها در تیمار مزبور و برای زمان ۱۲ دقیقه بدست آمد. افزایش زمان کاربرد این محلول به‌ترتیب از ۶ تا ۱۲ دقیقه باعث افزایش درصد جوانه‌زنی گیاه شد. در مورد تیمار استریل با محلول کلرید جیوه، افزایش زمان کاربرد منجر به کاهش جوانه‌زنی شد.

جدول ۴- درصد استقرار جوانه‌های گیاه بر اثر تیمارهای استریل در فصل تابستان

شماره تیمار	تیمار استریل	زمان (دقیقه)	درصد جوانه فعال	درصد آلودگی	درصد نکروزگی
۱	محلول هیپوکلریت سدیم ۲۰ درصد	۶	۱۵/۶	–	۸۴/۳
۲	محلول هیپوکلریت سدیم ۲۰ درصد	۸	۳۱/ ۲	–	۶۸/۷
۳	محلول هیپوکلریت سدیم ۲۰ درصد	۱۰	۳۳/۳۳	۵۰	۱۶/۶
۴	محلول هیپوکلریت سدیم ۲۰ درصد	۱۲	۴۴/۸	۳۱	۲۴/۱
۵	محلول کلرید جیوه ۰/۱ درصد	۲	۸/۱	۲/۴	۸۹/۷
۶	محلول کلرید جیوه ۰/۱ درصد	۴	۸	–	۹۲
۷	محلول کلرید جیوه ۰/۱ درصد	۶	۲/۴	۱/۹۶	۹۵/۷

در فصل بهار در بین تیمارهای استریل به‌کاررفته در این بررسی، محلول کلرید جیوه ۰/۱ درصد با زمان ۴ دقیقه بالاترین درصد جوانه‌زنی گیاه (۶۳/۴ درصد) و در فصل زمستان این تیمار در زمان ۱۰ دقیقه با درصد جوانه‌زنی ۱۸/۶ تیمار مناسب استریل تعیین شد (جدول‌های ۵ و۶).

تأثیر زمان برداشت نمونه از پایه مادری بر نحوه استریل کردن آن امری ثابت شده می‌باشد، زیرا این موضوع به‌طور مستقیم با وضعیت مورفولوژی اندام و بافتهای گیاه در فصول مختلف در ارتباط است. به‌طوری‌که در فصول بهار و تابستان با رویش جوانه و سرشاخه گیاه، بافت تازه و فاقد بافت حفاظتی (مانند پوسته جوانه و غلاف شاخه و برگ) در معرض مواد شوینده قرار می‌گیرد، بنابراین تیمار استریل (زمان، غلظت و نوع محلول استریل کننده) در این فصول به‌طور مسلم باید با تیمار لازم برای استریل نمونه در فصول پاییز و زمستان متفاوت (ضعیف تر) باشد تا نمونه‌ها با حداقل آلودگی و سیاه‌شدگی بافت، زنده‌مانی بالاتری را در تیمارهای بهینه استریل داشته باشند.

جدول ۵- درصد استقرار جوانه‌های گیاه با تیمارهای استریل در فصل بهار

شماره تیمار	تیمار استریل	درصد جوانه فعال	درصد آلودگی	درصد نکروزگی
۱	محلول هیپوکلریت ۲۰ درصد (۱۰ دقیقه)	۲۳	۱۷	۲۰
۲	محلول هیپوکلریت ۲۰ درصد (۷ دقیقه)	۴۱/۶	-	۵۸/۳
۳	محلول کلریدجیوه ۰/۱ درصد (۲)	۳۸	-	۶۲
۴	محلول کلریدجیوه ۰/۱ درصد (۴)	۶۳/۴	۱/۷	۳۶/۵

جدول ۶- درصد استقرار جوانه‌های گیاه با تیمارهای استریل در فصل زمستان

شماره تیمار	تیمار استریل	درصد جوانه فعال	درصد آلودگی	درصد نکروزگی
۱	محلول کلریدجیوه ۰/۱ درصد (۱۰)	۱۸/۶	۶/۹	۷۴/۴
۲	محلول کلریدجیوه ۰/۱ درصد (۱۲)	۱۵/۷	۸/۷	۷۵/۴
۳	محلول کلریدجیوه۰/۱ درصد (۱۵)	۸	۳۶	۵۶

شاخه‌زایی مناسب از جوانه‌ها در محیط پایه MS دارای هورمون سیتوکنین BA و اکسین IBA در غلظت‌های به‌ترتیب ۱ و ۰/۰۱ میلی‌گرم در لیتر انجام شد. در بررسی تأثیر محیط کشت بر صفات رشدی شاخه، آنالیز واریانس میانگین‌های رشد (ضریب ازدیاد جوانه، رشد طولی و سبزینگی شاخه) نشان داد که عامل محیط کشت بر این صفات رشد دارای تأثیر معنی‌دار است، به‌طوری‌که بیشترین رشد طولی و تکثیر جوانه در محیط کشت MS به‌دست آمد (جدول ۷).

آنالیز واریانس میانگین‌های رشد (ضریب ازدیاد شاخه، رشد طولی) نشان داد که عامل هورمون تنها بر صفت شاخه‌زایی دارای تأثیر معنی‌دار بود، به‌طوری‌که بیشترین تعداد شاخه در محیط دارای هورمون BA ۱ میلی‌گرم در لیتر به‌دست آمد.

جدول ۷- نتایج تجزیه واریانس صفات شاخه‌زایی، جوانه‌زنی و رشد طولی انارشیطان

منبع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات		
		شاخه‌زایی	جوانه‌زایی	رشد طولی
محیط کشت	۱	^{ns}۱/۳۵	*۱۴۰/۹۱	*۲۱/۳۶
هورمون	۳	*۶/۷۳۶	^{ns}۱۳/۸۸۰	^{ns}۶/۹۷
تأثیر متقابل هورمون ❊ محیط کشت	۱	*۱۰۹/۳۵۳	۱۲۵۷/۶۰۶*	۱۸۹/۰۵۱*
خطا	۱۷	۰/۴۵۹	۵/۷۸۱	۳/۶۳۹

❊ و ❊❊: به‌ترتیب معنی‌داری در سطح ۵٪ و ۱٪ وns: غیرمعنی دار

مقایسه میانگین اثر متقابل هورمون در محیط کشت برای صفات عوامل رشد (شاخه‌زایی، جوانه‌زایی و رشد طولی) در سطح احتمال ۵ درصد معنی‌دار بوده، به‌نحوی‌که محیط کشت MS به همراه ۱ میلی‌گرم در لیتر BA، ۰/۰۱ میلی‌گرم در لیتر IBA و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر Kin بیشترین تعداد شاخه و جوانه را تولید نمود و میانگین رشد طولی نیز در همان غلظت دارای بیشترین مقدار بود. به‌طوری‌که این تیمار با میانگین شاخه‌زایی ۴/۹ و رشد طولی شاخه ۷/۷۸ بهترین گزینه برای این مرحله بود (جدول ۸).

بهترین تیمار شاخه‌زایی برای محیط کشت MS ۱/۲ نیز مشابه محیط کشت اول (تیمار ۱ و ۵) بود. البته تیمار هورمونی 2iP نسبت به BA بر میزان جوانه‌زنی شاخه مؤثرتر عمل نموده است (جدول ۸). از سویی غلظت 2iP۱ به همراه Kin در غلظت ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر (تیمار ۴) بعد از تیمار اصلی (تیمار ۱)، مناسبترین گزینه برای صفات شاخه‌زایی و رشد طولی شاخه بود (جدول ۸).

جدول ۸- تأثیر عوامل محیط کشت و تنظیم کننده رشد بر میانگین صفات شاخه‌زایی، جوانه‌زنی و رشد طولی گیاه

شماره تیمار	تیمار محیط و هورمون	میانگین شاخه‌زایی	میانگین جوانه‌زایی	میانگین رشد طولی
۱	MSB1K0.5	a۴/۹	a۱۲/۶	a۷/۸۷
۲	MSB1P0.5	bc۱/۵	b۶/۱۴	b۳/۲۵
۳	MSP1B0.5	Bc۱/۲۵	a۱۳/۳	bc۱/۳۱
۴	MSP1K0.5	b۲/۳	ab۸/۵	b۴/۱
۵	1/2MSB1K0.5	b۲/۸۶	c۵/۶	bc۱/۳
۶	1/2MSB1P0.5	bc۱/۶	cd۴/۷۴	bc۱/۸
۷	MSP1B0.5 1/2	bc۱/۵	d۴	bc۱/۵
۸	1/2MSP1K0.5	bc۱/۷۵	c۵/۱۶	bc۱/۶۵

میانگین‌های دارای حروف مشترک از نظر آماری در سطح ۰/۰۵ اختلاف معنی‌داری با هم ندارند.

در مورد شاخص سبزینگی شاخه، داده‌ها به صورت آزمون ناپارامتری و از طریق آزمایش Kruskal Wallis مورد بررسی قرار گرفتند (جدول ۹). نتیجه آزمون بیانگر این واقعیت بود که در بین ۴۸ داده از ۴ گروه تیمار هورمونی،

تفاوت معنی‌داری از نظر آماری مشاهده نشد. ولی میانگین مشاهدات حکایت از برتری شاخص سبزینگی در گروه تیمار (۱) یعنی تیمار B1 K0.5 داشت (جدول ۱۰).

جدول ۹- آزمون ناپارامتری Kruskal Wallis برای شاخص سبزینگی برگ

پارامتر آماری	شاخص سبزینگی
مربع کی	۳/۰۴۲
درجه آزادی	۳
سطح معنی‌دار بودن	۰/۳۸۵

جدول ۱۰ : نتیجه آماری آزمون ناپارامتری Kruskal Wallis برای شاخص سبزینگی برگ

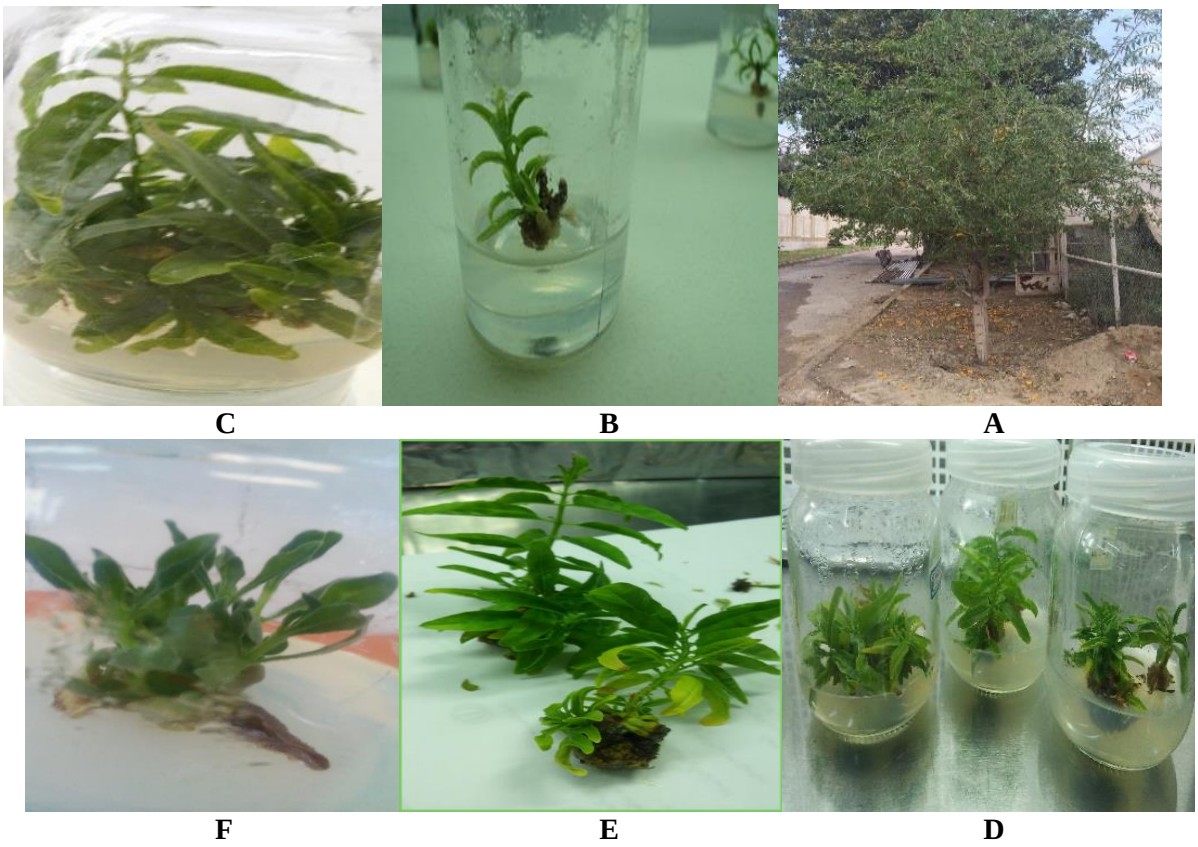
گروه (تیمار هورمونی)	نام تیمار	میانگین شاخص سبزینگی
۱	B1K0.5	۲۸/۶۲
۲	B1P0.5	۲۳/۰۰
۳	P1B0.5	۲۱/۵۰
۴	P1K0.5	۲۴/۸۸

جدول ۱۱- اثر عوامل محیط کشت و تنظیم‌کننده رشد بر میانگین صفات رشدی طول و سبزینگی شاخه، میانگین حجم و رنگ کالوس

شماره تیمار	تیمار محیط کشت و هورمون	طول شاخه(cm)	حجم کالوس (cm^3)	رنگ کالوس	سبزینگی شاخه
۱	1/2MSIBA0.5	b۲/۷	b۱	b۲	a۳/۵
۲	1/2MSIBA1	b۳/۲۵	b۰/۶	b۲	ab۳
۳	1/2MSIBA2	a۴/۷	a۱/۷۵	ab۳	a۴
۴	1/2MSIBA4	b۳	b۰/۷۵	b۲/۷	ab۳
۵	1/2MSNAA0.5	b۲/۵	b۰/۵	ab۳	ab۳/۲۵
۶	1/2MSNAA1	b۳	b۰/۵	ab۳	ab۳
۷	1/2MSNAA2	b۳	b۰/۷۵	ab۳	a۴
۸	1/2MSNAA4	b۲/۸	b۰/۷	b۲	ab۳
۹	1/2MSIBA,NAA0.5	b۲/۲۵	b۰/۷۵	b۲/۵	c۱
۱۰	1/2MSIBA,NAA1	b۲/۷۵	b۱	ab۳	a۴
۱۱	1/2MSIBA,NAA2	b۲/۶	b۱	b۲	cb۲
۱۲	1/4MSIBA1	b۳	b۰/۷۵	b۲	ab۳

میانگین‌های دارای حروف مشترک از نظر آماری در سطح ۰/۰۵ اختلاف معنی‌داری با هم ندارند.

در مرحله ریشه‌زایی در شرایط درون شیشه‌ای چندین تیمار اعم از تیمار اکسینی IBA , NAA به‌طور انفرادی در غلظت‌های از ۰/۵ تا ۴ میلی‌گرم در لیتر و تلفیقی از ۰/۵ تا ۲ همراه با عملیات کاهش املاح محیط کشت تا ۱/۴ غلظت آن در محیط پایه برای تحریک ریشه‌زایی انجام شد. شروع کالزایی از قاعده شاخه که مقدمه ریشه‌زایی گیاه است در تیمارهای مختلف هورمونی دیده شد. بیشترین حجم کالوس ایجادی با حفظ سبزینگی مناسب شاخه در محیط 1/2MS IBA2 حاصل شد که با استمرار رشد فعال گیاه و سبزینگی مطلوب همراه بود (جدول ۱۱). شروع ریشه‌زایی نیز در این تیمار دیده شد. تصاویر موجود در شکل ۱، بیانگر مراحل مختلف رشد جوانه تا شاخه‌زایی و ریشه‌زایی گیاه می‌باشد.



شکل ۱- مراحل ریزازدیادی گیاه انارشیطان به‌ترتیب از راست به چپ A: پایه مادری، B: استقرار جوانه، C: رشد طولی و تکثیر شاخه، D: تیمارهای مختلف شاخه‌زایی، E: کالزایی در تیمار هورمونی اکسین و F: ریشه‌زایی گیاه

بحث

در روش پیش‌استریل جوانه‌ها، برس‌کشی سطح نمونه‌ها با مایع ظرفشویی و اتانول در حذف زوائد سطح جوانه و لایه مومی سطح کوتیکول مؤثر بوده و آلودگی‌های سطحی را تا حد امکان به حداقل رسانید و اجازه نفوذ و تأثیر مناسب‌تر محلول اصلی ضدعفونی‌کننده را بر بافت نمونه داد. Emam و همکاران (۲۰۱۲) نیز از این روش برای استریل نمونه‌های تیس (*Sorbus aucoparia*) بهره جستند. در مرحله اصلی استریل، کاربرد محلول هیپوکلریت سدیم (یک درصد کلر فعال در زمان ۱۲ دقیقه و در فصل تابستان) تأثیر قوی و ماندگاری را بر حذف آلودگی‌های میکروبی داشت. با توجه به ترشحات فنلی بالای نمونه‌ها که باعث کندی رشد و استقرار آنها در محیط کشت می‌شد، استفاده از محلول پلی‌وینیل پیرولیدون (PVP) به‌عنوان آنتی‌اکسیدانت، نقش

مؤثری در برطرف کردن اثرهای منفی این ترشحات بر رشد و تکثیر گیاه داشت. Emam و همکاران (۲۰۱۰) از همین روش برای حذف ترشحات فنلی ریزنمونه‌های (*Eucaluptus. grandis*) استفاده کردند.

در بین دو محیط کشت مورد استفاده در این تحقیق، محیط کشت پایه MS با ویتامین‌های اضافی برای رشد و تکثیر شاخه مناسب بود. مقایسه غلظت‌های یونی در دو محیط کشت MS و 1/2MS نشانگر آن است که یون‌هایی مانند نیترات و آمونیم در محیط MS بیشتر موجود است. این میزان بالای ازت نقش مثبتی بر رشد و تکثیر شاخه دارد و در تحقیقی به نقش مثبت ازت در ساختار اسیدهای آمینه و متابولیسم پروتئین‌ها، رشد و تمایز گیاه و کیفیت شاخه اشاره شده است (Mccown,1982).

در بین تنظیم‌کننده‌های رشد مورد استفاده در مرحله شاخه‌زایی، بیشترین میانگین ضریب ازدیاد شاخه، جوانه و سبزینگی شاخه در محیط کشت با ترکیب هورمونی BA (۱ میلی‌گرم در لیتر) و Kin (۰/۵) و IBA ۰/۰۱ میلی‌گرم در لیتر بدست آمد. BA ازجمله تنظیم کننده‌های محرک رشد و تکثیر شاخه با قدرت ماندگاری بالا بوده و با افزایش تولید سیتوکنین داخلی، در افزایش شاخه‌زایی مؤثر می‌باشد (Bennet *et al*., 1994). در این تحقیق ترکیبی از سیتوکنین‌های مختلف (BA و Kin) بر ضریب ازدیاد شاخه دارای تأثیر مثبت بوده است. در بررسی دیگری Lakishma sita و همکاران (۱۹۹۳) نیز با کاربرد تلفیقی (mgl^{-1} BA(۰/۱ و ($۰/۵ mgl^{-1}$) Kin در محیط MS برای *Eucalyptus tereticornis* افزایش رشد طولی و ازدیاد شاخه را مشاهده کردند.

برای تحریک ریشه‌زایی در این تحقیق از پیش‌تیمار محیط کشت بدون هورمون استفاده شد، زیرا تجمع فلاونوئیدها بوسیله اکسین منجر به القای تشکیل ریشه شده که این اتفاق در حضور سیتوکنین انجام نشد. در این پژوهش، اثرهای کاهش نمک‌های محیط کشت و نیز وجود اکسین‌های IBA, NAA در محیط MS بر ریشه‌زایی شاخه‌های باززایی شده بررسی شد. استفاده از تیمارهای مختلف ریشه‌زایی منجر به ایجاد کالوس فعال در قاعده شاخه و بعد از مدتی پژمردگی شاخه گردید. در نهایت تیمار ریشه‌زایی با حفظ رشد و شادابی شاخه گیاه 1/2MS, IBA2 تعیین شد. در تحقیق Chalupa (۱۹۸۷) تأثیر هورمون‌های خانواده اکسین ازجمله IBA و NAA و یا ترکیبی از این دو هورمون بر ریشه‌زایی گونه‌های مختلف جنگلی، مثبت ارزیابی شد. این مسئله توسط محققان دیگر ازجمله Emam و همکاران (۲۰۱۰) نیز در بررسی گیاه (*Eucaluptus grandis*) اثبات شده است. Uthaman (۲۰۱۲) در طی تحقیقی قطعات گره‌ای درختان بالغ انارشیطان را بر محیط MS, BA 1, IAA 0.01, شاخه‌دار نمود و ریشه‌زایی را در طی ۱۰ تا ۱۲ روز بر محیط MS مایع با ورمیکولیت دارای IBA ۰/۳ بدست آورد.

نتیجه‌گیری کلی: با توجه به اهمیت گیاه بومی انارشیطان از نظر دارویی، صنعتی و اقتصادی و خطر رو به زوال بودن این گونه در منطقه، باعث شده تا تکثیر آن از طریق کشت بافت برای حفاظت و کشت گیاه در عرصه امری ضروری به نظر آید. بنابراین تحقیقات بیشتر بر مراحل ریشه‌زایی و سازگاری گیاه کشت بافتی در عرصه کاملا مورد نیاز است.

منابع مورد استفاده

– Bennett, I.J., J.A. Mc Comb, C.M. Tonkin & D.A.J .Mc david, 1994. Alternating cytokinins in multiplication media stimulates *in vitro* shoot growth and rooting of *globulus Labill*, Annals of Botany, 74: 53-58.

– Chalupa, V., 1987. Effect of benzyl amino purine and thydiazuron on *in vitro* shoot proliferation of *Tilia cordata* Mil., *Sorbus aucuparia* L. and *Robinia pseudo acaciae* L. Biologia Plantarum, 29: 425-429.

– Emam, M., Assare, M.H., Shahrzad, SH., Khojir, K., 2010. *In vitro* propagation of *Eucalyptus. grandis* by tissue culture. Iranian Journal of Rangelands and Forests Plant, Breeding and Genetic research No1 – 35. In Persian

– Emam, M.,Ghamari zare,A., Shahrzad, SH., Naraghi,T.S., Espahbodi, K., Zare, H., Mirjani, L., 2012. Investigation of Medium, plant growth regulation and Genotypes on *in vitro* propagation of

culture. Physiologia Plantarum, 15: 473-597.
– Negi, RS, Sharma, MK., Sharma, KC, Kshetrapal, S., Kothari, SL., and Trivedi, PC. 2012. Genetic diversity and variations in the endangered tree (*Tecomella undulata*) in Rajasthan; International Journal; 1(1): 50-58.
– Rezanejad, F., Saberi, A., Nejad alimoradi, F., 2018. Morphogenesis, Ecology and endangered plant propagation of *Tecomella undulate* in Jiroft Golparaks desert. Journal of Biogenesis. 10(3). .1-14.In Persian
– Salehi,M., Saffari,V.,Maghsoodi, A., salehi,A. 2013. Investigating the Sexual and Asexual regeneration of *Tecomella undulate.* National Conference on passive Defense in Agricultural region. : 1-2. .WWW.Civilica.com/Paper-NCPDAOL-2789.html. In Persian
– Shekarchian,A., Baniasad, M., Khodashenas, M., 2010. Final research Report: Identification of Seed germination, propagation methods and seed treatments of *Tecomella undulate* and *Olea europea*. Research Institute of Forests and Rangelands. 115 Pages .In Persian
– Uthaman, D, Madathupatti, R, David, P.2012. *In vitro* regeneration of *Tecumella undulate* an endangered medicinal plant. International Journal of Plant, Animal and Environmental Science. (4): 44-49.

Sorbus aucoparia. Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants: 29(1): 85-96. In Persian.
– Golamian, F. 2018. Investigation of *Tecomella undulata* propagation methods to develop the areas of natural resource in Bushehr Province. Final research Report: Research center of agriculture and natural resource Booshehr province. Booshehr. Iran.78 pages. In Persian
– Kumar, S. Singh, N. 2012. Multiplication of desert Teak, *Tecumella undulata*, under *in vitro* conditions. Journal of Tropical Medicine Plants 13(2): 129-137.
– Lakishma sita, G., 1993. Micro propagation of *Eucalyptus*. In: Micro propagation of woody plants. M.R. Ahuja. Kluwer Academic Publisher. Netherlands.
– McCown, B.H and J.C. Sellmer, 1982. Media and physical environment. In: Bonga, J.M and D.J. Durzan (ed.) Cell and Tissue Culture in Forestry. VoL1, General principles and Biotechnology. Martinus Nijhoff Publishers, Pordrecht : p. 4-17.
– Mohsenzade, S., Saharkhiz, M., Taiiebi, N., Jaimie, A. 2012. Allelopatic potential of *Tecomella undulate*. Medicinal and Aromatic Plant Science and Biotechnology. 6(1): 73-77. In Persian
– Mozaffarian, V., 2009. Dictionary of Iranian plants names. Sixth edition. Contemporary Publication, Tehran, Iran. 740 Pages. In Persian
– Murashige, T. and Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bio- assays with tobacco tissue

Influence of Medium and Plant growth regulators on *in vitro* growth indexes of *Tecomella undulata* (Roxb.) Seem

M.Emam[1*], L.Mirjani[2], M. Hesamzade Hejazi[3], M.A.Soltanipoor[4]

1-*Corresponding author, Assis,Prof., Research Institute of Forests and Range lands, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO),Tehran, I.R.Iran. Email: emam@rifr-ac.ir
2- Researcher., Research Institute of Forests and Range lands, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO),Tehran, I.R.Iran.
3- Assoc. Prof. Research Institute of Forests and Range lands, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO),Tehran, I.R.Iran.
4- Assis, Prof.,Department of Forest, Agricultural and Natural Resources Research Center of Hormozgan, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Bandar abbas, I.R.Iran.

Received: 30.06.2019 Accepted: 12.10.2019

Abstract

*Tecomella undulata i*s one of endemic and endangered plant species in Iran. It is belong to Bignoniaceae family grown in southern of Iran. Due to the specific characteristics of this plant in various aspects of medicine, ornamentation and natural resources, its mass production through tissue culture and creation of identical plants seems necessary. Effects of growth regulators on plant growth indices such as number of buds and branches, shoot length, branch greenness and rooting were studied by bud explants under *in vitro* conditions. The optimal aseptic technique was obtained by immersing the buds in 0.1% mercuric chloride solution for 4 minutes in spring. The best shooting was observed in MS basal medium containing BA 1 treatment and K0.5 mg/L. This treatment was the best selection for this phase with the average shoot growth of 4.9 cm and shoot length of 7.78 cm. At the rooting stage, despite the numerous treatments of the medium and hormones (various concentrations of auxin hormone), the onset of rooting was only observed in 1/2 MS IBA2.

Keywords: *Tecomella undulate*, Tissue culture, Micro propagation, Endemic.