فصلنامهٔ علمی پژوهش و توسعه جنگل
جلد ۵، شماره ۴، صفحه ۶۷۲-۶۵۷، (۱۳۹۸)

باززایی درون شیشه‌ای گیاه سپستان (*Cordia myxa* L.) به روش اندام‌زایی مستقیم

هما بساک[۱]، محمدحسین دانشور[۲]، محمدرضا صالحی سلمی*[۳] و امین لطفی جلال‌آبادی[٤]

۱- کارشناسی ارشد علوم باغبانی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان، خوزستان، ایران. (h_bosak@gmail.com)
۲- استاد، گروه علوم باغبانی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان، خوزستان، ایران. (mhdaneshvar@yahoo.com)
۳- استادیار، گروه علوم باغبانی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان، خوزستان، ایران. (mrsalehisalmi@gmail.com)
٤- استادیار، گروه مهندسی تولید و ژنتیک گیاهی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان، خوزستان، ایران. (aminlo2020@gmail.com)

تاریخ دریافت: ۹۷/۰۹/۰۷ تاریخ پذیرش: ۹۷/۱۰/۲٤

چکیده

در این پژوهش، دستورالعمل سریع و کارآمد باززایی درون‌شیشه‌ای گیاهک‌های سپستان با استفاده از ریزنمونه‌های مختلف بررسی شد. در این پژوهش از آزمایشی جداگانه برای بهینه‌سازی شاخه‌زایی، یک آزمایش برای پرآوری و یک آزمایش ریشه‌زایی استفاده شد. طرح آماری مورد استفاده در آزمایش شاخه‌زایی، فاکتوریل ۷×۳ در قالب طرح پایه کاملاً تصادفی با سه تکرار و طرح آماری مورد استفاده در آزمایش‌های پرآوری و ریشه‌زایی طرح پایه کاملاً تصادفی بود. نتایج نشان داد بیشترین شاخه‌زایی (٤/۳۳ شاخه از هر ریزنمونه) از ریزنمونه‌های لپه مستقر در محیط کشت MS حاوی ٤ میلی‌گرم در لیتر کینتین (KIN) به همراه ۰/۰۱ میلی‌گرم در لیتر نفتالین استیک اسید (NAA) به‌دست آمد. مدت‌زمان لازم برای آغاز شاخه‌زایی در حدود ۲۱-۱۵ روز به طول انجامید. برای پرآوری شاخه‌های تولیدی، ریزنمونه‌ها در محیط کشت MS حاوی غلظت‌های متفاوت دو نوع سیتوکنین (KIN یا BAP) به همراه ۰/۰۱ میلی‌گرم در لیتر NAA قرار گرفتند. بیشترین پرآوری شاخه در تیمار مشابه با شاخه‌زایی، در محیط کشت MS حاوی ٤ میلی‌گرم در لیتر KIN به همراه ۰/۰۱ میلی‌گرم در لیتر NAA، به‌دست آمد. همچنین نتایج نشان داد که ایندول بوتریک اسید (IBA) با غلظت ۱ میلی‌گرم در لیتر مؤثرترین تیمار برای ریشه‌زایی بود. گیاهک‌های ریشه‌دارشده با موفقیت توانستند مراحل سازگاری در شرایط گلخانه‌ای را سپری کنند.

واژه‌های کلیدی: اکسین، پرآوری، جنگل، گل‌گاوزبان، سیتوکنین.

* نویسنده مسئول شمارهٔ تماس: ۰۹۱۷۷۰۱٦۱۷۸

مقدمه

سپستان با نام علمی *Cordia myxa* L. متعلق به تیره گل‌گاوزبان (Boraginaceae) است. این گیاه بومی هندوستان است و در جنوب ایران از سیستان و بلوچستان تا خوزستان به‌خوبی رشد و نمو می‌کند (Sabeti, 1976). ارتفاع این گیاه در ایران از هفت متر تجاوز نمی‌کند، ولی در شرایط آب‌وهوای هندوستان و استرالیا بیش از این حد نیز رشد می‌کند. در اغلب کشورها مانند ایران به‌منظور زیبایی و سرسبزی پارک-های جنگلی مورد استفاده قرار می‌گیرد. بررسی خواص آناتومیکی روی چندگونه *Cordia* در جنگل‌های گرمسیری مکزیک نشان داد که این درختان تا ارتفاع ۱۰ متر و قطر حدود ٤٠ سانتی‌متر می‌رسند. همچنین این گونه‌ها دارای صمغ و کریستال فراوان در پارانشیم طولی و شعاعی هستند (Barajas-Morales, 1985). از سوی دیگر در ایران به‌دلیل کمبود سطح جنگل‌ها و وجود زمین‌های خشک، کم‌آب و فقیر، درختانی بردبار که بتوانند چوب به‌نسبت مناسب را برای رفع نیاز مصارف روستایی و صنایع چوب و کاغذ کشور تأمین کنند، باید بیش‌ازپیش موردتوجه قرار گیرند. سپستان یکی از گونه‌های چوبی تندرشد است که می‌تواند در ایجاد جنگل‌های مصنوعی و در پی آن کاربردهای صنعتی نقش بسزایی داشته باشد (Nosrati *et al*., 2015).

روش تکثیر از طریق کشت بافت، یعنی در یک وسعت کم، در حد انبوه تکثیر انجام شود. شرایط مناسب محیط‌های کشت، با توجه به عوامل فیزیکی، غذایی و هورمونی انتخاب می‌شود. در این روش، گیاه یا قسمت‌هایی از گیاه از تمام موجودات بیماری‌زا (قارچ‌ها، باکتری‌ها و ویروس‌ها) و همین‌طور دیگر آفات گیاهان (حشرات، نماتدها) عاری هستند. در روش کشت بافت، الگوی معمول نمو گیاه، ازبین رفته و یک بافت ایزوله‌شده می‌تواند تولید کالوس کرده و به اندام و جنین‌های سوماتیکی تبدیل شوند. توانایی رشد پروتوپلاست‌ها و یا تک‌سلول‌ها، امکان دستورزی ژنتیکی را که قبلاً ناممکن بود، مقدور می‌سازد (Jafari *et al*., 2017b). کشت بافت گیاهی نقش مهمی در تولید گیاهان جنگلی، به‌منظور بهبود کیفیت ایفا می‌کند. پژوهش‌ها در زمینه کشت بافت یک دانش چندبعدی است که جنبه‌های مهمی را در اصلاح گیاهان ارائه می دهد (Razdan, 2003).

معمولاً از چهار گروه تنظیم‌کننده رشد گیاهی، به-ترتیب اکسین‌ها، سیتوکینین‌ها، جیبرلین‌ها و پلی‌آمین‌ها در کشت بافت استفاده می‌شود (Jafari *et al*., 2017b). پرآوری شاخه، یک مرحله از فرآیند ریزازدیادی است که به‌عنوان یکی از مراحل اصلی علم بیوتکنولوژی درنظر گرفته می‌شود. این فرآیند تولید 'شاخه از جوانه' از زمان کشف سیتوکینین و ترکیبات شبه سیتوکینین به-دست آمد (Damino *et al*., 2000). در اندام‌زایی مستقیم، قسمتی از بافت گیاه (ریزنمونه) جدا شده و در شرایط عاری از آلودگی به محیط کشت مناسب منتقل می‌شود. سپس با تغییر غلظت مواد تنظیم‌کننده رشد در محیط کشت، اندام موردنظر تشکیل می‌شود (Murashige, 1974).

Lameira and Pinto (2006) پرآوری *Cordia verbenaceae* را با ریزنمونه‌های جوانه‌های انتهایی و جانبی مورد بررسی قرار دادند. آن‌ها گزارش دادند که بیش‌ترین تعداد شاخه در ۵ میکرومول کینتین به‌دست آمد. هم‌چنین مشخص شد که جوانه‌های انتهایی عملکرد بهتری نسبت به جوانه‌های جانبی داشتند. Padhi and Singh (2017) در گیاه سپستان به بررسی نوع ریزنمونه و مدت‌زمان استفاده از ترکیبات زداینده در جلوگیری از آلودگی درون‌شیشه‌ای پرداختند. نتایج نشان داد کمترین آلودگی در ریزنمونه‌های قطعات گره با استفاده از کلریدجیوه ۰/۱ درصد به‌مدت ۱۰ دقیقه

به‌دست آمد. در پژوهش دیگری ریزنمونه‌های برگی سپستان در محیط کشت MS حاوی غلظت‌های مختلفی تنظیم‌کننده‌های رشدی قرار گرفته شد. نتایج نشان داد که بیشترین کالوس‌زایی در محیط کشت دارای ۱ میلی-گرم در لیتر BA و ۱/۵ میلی‌گرم NAA به‌دست آمد. همچنین نتایج نشان داد که بیشترین شاخه‌زایی در محیط کشت حاوی ۱ میلی‌گرم در لیتر BA و ۱ میلی‌گرم NAA و بیشترین ریشه‌زایی در محیط کشت دارای ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر IAA به‌دست آمد (Singh *et al.*, 2007).

با توجه به اهمیت سپستان در جنگل‌کاری و اثرهای دارویی آن، لزوم تکثیر سریع و انبوه این گیاه بیش‌ازپیش احساس می‌شود، از سوی دیگر به‌علت عدم کارایی روش‌های متداول تکثیر رویشی (مانند آلودگی بالا و محدودیت قلمه) و ازدیاد با بذر که سبب تولید درختان هتروزیگوت با اختلاف بسیار در مورفولوژی می‌شود (Nosrati *et al.*, 2015) و همچنین جوانه‌زنی بذر در بهترین حالت با استفاده از سایش پوسته سخت بذر در ماسه و سپس تیمار با اسید جیبرلیک تنها ٦٦ درصد است (Meghwal, 2006)؛ بنابراین استفاده از کشت بافت برای تکثیر انبوه و سریع سپستان مطمئن ترین روش است.

مواد و روش‌ها

محل انجام آزمایش و تهیه مواد آزمایشگاهی

این پژوهش در سال‌های ٩٤-١٣٩٣ در آزمایشگاه کشت بافت گروه علوم باغبانی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان، واقع در شهر ملاثانی انجام شد. برای تهیه بذر، در اواخر خردادماه ۱۳۹۳ میوه‌های رسیده درخت سپستان در محوطه دانشگاه جمع‌آوری و پس از شستشوی لایه موسیلاژدار روی بذر با آب معمولی، بذرها در سایه خشک و به قارچ‌کش بنومیل آغشته و در سردخانه آزمایشگاه کشت بافت گروه باغبانی نگه‌داری شدند.

گندزایی، جوانه‌زنی بذور و تهیه ریزنمونه

در ابتدا برای ازبین‌بردن آلودگی‌های سطحی بذرها با چند قطره مایع ظرف‌شویی آغشته و مالش داده شدند و سپس با محلول آب معمولی ولرم و مایع ظرف‌شویی به‌مدت ۳۰ دقیقه شستشو داده شدند. پس از آن بذرها به‌مدت ۳۰ دقیقه در زیر آب جاری قرار داده شدند. سپس در اتاق انتقال و زیر دستگاه لامینار ایرفلاو بذرها به‌مدت یک دقیقه در الکل اتیلیک ۷۰ درصد و سپس به‌مدت ۲۰ دقیقه در هیپوکلریت سدیم ۳۰ درصد قرار داده شدند. برای ایجاد شرایط محیطی مناسب برای جوانه‌زنی بذر، کشت در محیط کشت MS (Murashige and Skoog, 1962) پایه بدون تنظیم‌کننده رشد در شرایط روشنایی انجام شد. پس از جوانه‌زنی بذور و رشد دانهال به‌مدت دو هفته، ریزنمونه‌های لپه، هیپوکوتیل و اپیکوتیل برای مراحل بعدی از دانهال تهیه شد.

اندام‌زایی مستقیم

برای اندام‌زایی مستقیم از ریزنمونه‌ها، آزمایشی به-صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی در سه تکرار اجرا شد. تیمارهای مورد استفاده برای اندام‌زایی مستقیم شامل NAA به غلظت ۰/۰۱ میلی‌گرم در لیتر به همراه BAP (۱، ۲، ۳ و ٤ میلی‌گرم در لیتر) و یا KIN (۱، ۲، ۳ و ٤ میلی‌گرم در لیتر) بود و برای تیمار شاهد از محیط کشت MS بدون تنظیم‌کننده رشد استفاده شد. درمجموع در این مرحله ۲۷ تیمار استفاده شد. پس از گذشت هشت هفته، شاخص‌های تعداد و طول شاخساره اندازه‌گیری شدند.

پرآوری

در این آزمایش به‌منظور پرآوری، شاخساره‌های تولیدی از ریزنمونه‌های رشد کرده در بهترین محیط کشت، به

محیط کشت جدید انتقال یافتند. آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی در سه تکرار بود. تیمارهای مورد استفاده برای پرآوری شامل NAA به غلظت ۰/۰۱ میلی‌گرم در لیتر به همراه BAP (۱، ۲، ۳ و ٤ میلی‌گرم در لیتر) و یا به همراه KIN (۱، ۲، ۳ و ٤ میلی‌گرم در لیتر) بود و برای تیمار شاهد از محیط کشت MS بدون تنظیم‌کننده رشد استفاده شد. درمجموع در این مرحله ۹ تیمار استفاده شد. ویژگی‌های تعداد و طول شاخساره اندازه‌گیری شدند.

ریشه‌زایی

پس از تشکیل شاخساره در محیط‌های کشت پرآوری، به‌منظور ریشه‌زایی به محیط‌های کشت جدید منتقل شدند. این مرحله شامل تنظیم‌کننده رشد NAA با چهار غلظت (۰/۲۵، ۰/۵، ۰/۷۵ و ۱ میلی‌گرم در لیتر) و IBA با چهار غلظت (۰/۲۵، ۰/۵، ۰/۷۵ و ۱ میلی‌گرم در لیتر) و تیمار شاهد (بدون تنظیم‌کننده رشد) بود. آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی در سه تکرار بود. پس از گذشت ۱۰ روز ریزنمونه‌ها به محیط کشت MS منتقل‌شده و چهار هفته بعد تعداد ریشه و طول بلندترین ریشه اندازه‌گیری شد.

سازگاری

ابتدا گیاهک‌های ریشه‌دار شده را در زیر دستگاه لامینار ایر فلاو از درون آگار خارج کرده و برای زدودن آگار و جلوگیری از آلودگی به‌مدت یک دقیقه در محلول بنومیل (دو در هزار) فرو و سپس با آب مقطر شسته شده و در سه نوع محیط کشت گلدانی شامل پرلایت، کوکوپیت و پرلایت+کوکوپیت به نسبت (۱:۱) در عمق مناسب کشت شده و با محلول غذایی هوگلند آبیاری شدند و درب گلدان‌ها با کیسه نایلونی بسته شدند. پس از گذشت ۱۰ روز، کیسه‌های نایلونی برداشته شدند.

تجزیه‌وتحلیل آماری

در تمامی آزمایش‌های انجام‌شده تجزیه‌وتحلیل داده‌ها با نرم‌افزار SAS و مقایسه میانگین داده‌ها با آزمون چند-دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال پنج درصد و رسم نمودارها با نرم‌افزار اکسل انجام شد.

نتایج

آزمایش اول: اثر نوع ریزنمونه، تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی و برهمکنش آن‌ها بر شاخه‌زایی مستقیم

نتایج تجزیه واریانس نشان داد که اثر نوع ریزنمونه، نوع تنظیم‌کننده رشد بر تعداد و طول شاخساره در سطح احتمال خطای یک درصد معنی‌داری بود، اما برهمکنش این دو عامل فقط بر تعداد شاخساره در سطح احتمال خطای پنج درصد تفاوت معنی‌داری نشان داد (جدول ۱). نتایج اثر ریزنمونه بر تعداد شاخساره نشان داد که بیش‌ترین تعداد شاخساره (۱/۸۱ شاخساره) در ریزنمونه لپه به‌دست آمد که با تعداد شاخساره در ریزنمونه‌های اپیکوتیل و هیپوکوتیل تفاوت معنی‌داری در سطح احتمال یک درصد نشان داد (شکل ۱). همچنین در بررسی نتایج اثر ریزنمونه‌ها بر طول شاخساره نشان داده شد که ریزنمونه لپه بیش‌ترین طول شاخساره را نسبت به دیگر ریزنمونه‌ها داشت و در سطح احتمال خطای یک درصد اختلاف معنی‌دار داشت (شکل ۱).

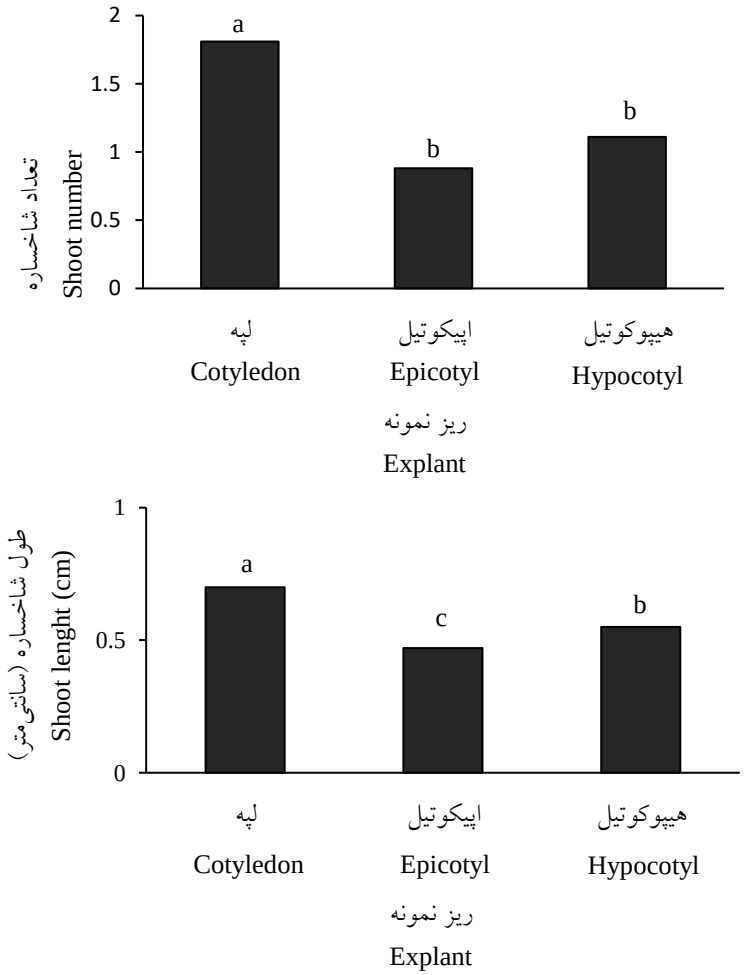
جدول ۱- تجزیه واریانس شاخص‌های تعداد و طول شاخساره تحت تأثیر تیمارهای مختلف اندام‌زایی مستقیم

Table 1. Results of Anova on number and length of shoot characteristics affected by different treatments in direct organogenesis experiment

Mean squares میانگین مربعات			
طول شاخساره Shoot length	تعداد شاخساره Shoot number	درجه آزادی df	منابع Source
0.38^{**}	6.30^{**}	2	ریزنمونه Explant (A)
1.36^{**}	6.89^{**}	8	محیط کشت اندام‌زایی Medium (B)
0.01^{ns}	0.51^{*}	16	ریزنمونه × محیط کشت اندام‌زایی A*B
0.02	0.22	54	خطای آزمایش Error
10.15	16.07	-	ضریب تغییرات (درصد) C.V. (%)

**،* و ns به‌ترتیب معنی‌دار در سطح احتمال خطای یک درصد، پنج درصد و عدم تفاوت معنی‌دار

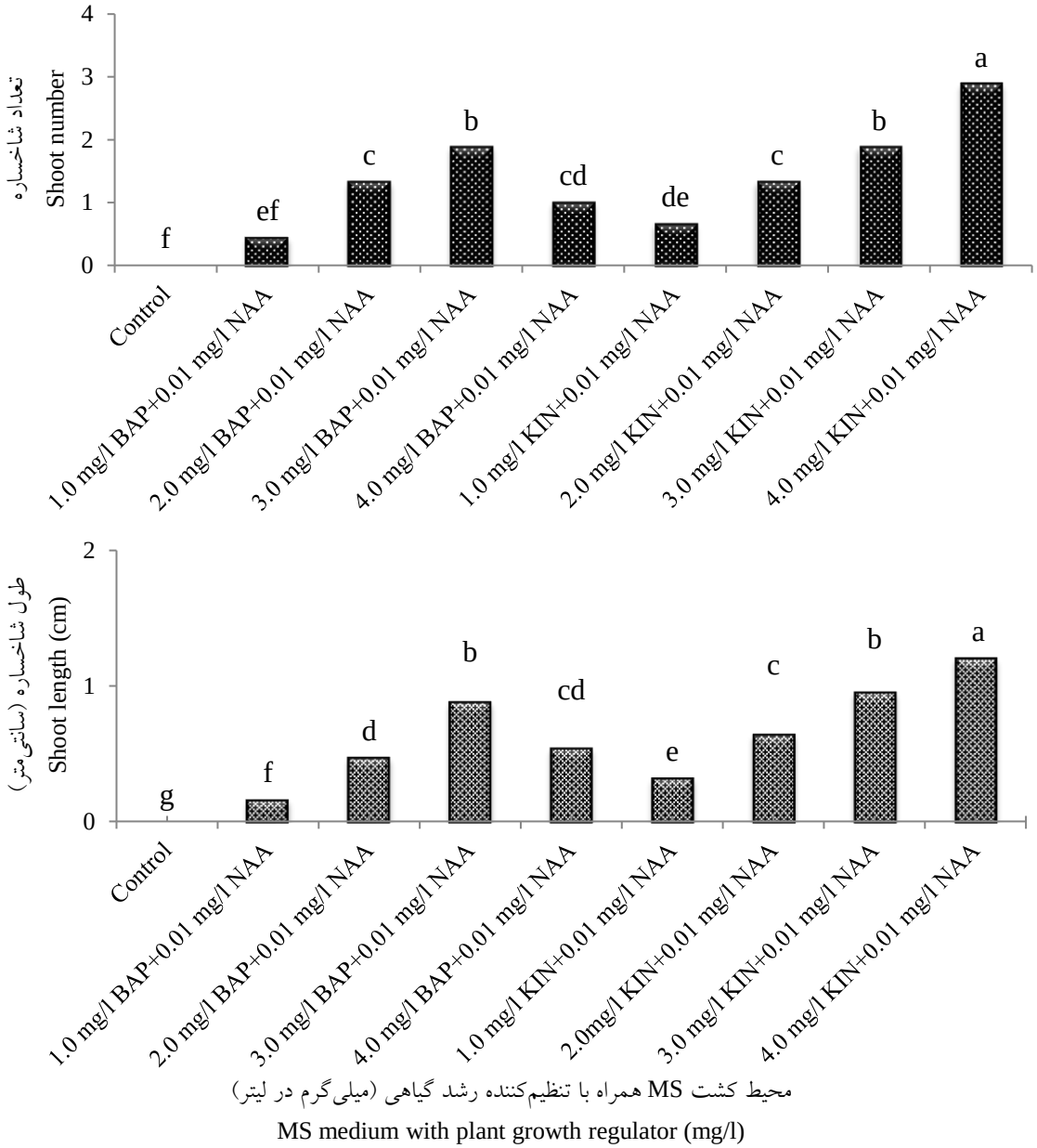
**,* and ns significant at p<0.001, p<0.005 and non-significant respectively



شکل ۱- اثر ریزنمونه بر تعداد شاخساره (تصویر بالا) و طول شاخساره (تصویر پایین) در باززایی مستقیم

Figure 1. Effect of explant type on number (up) and length (down) of shoots in direct organogenesis experiment

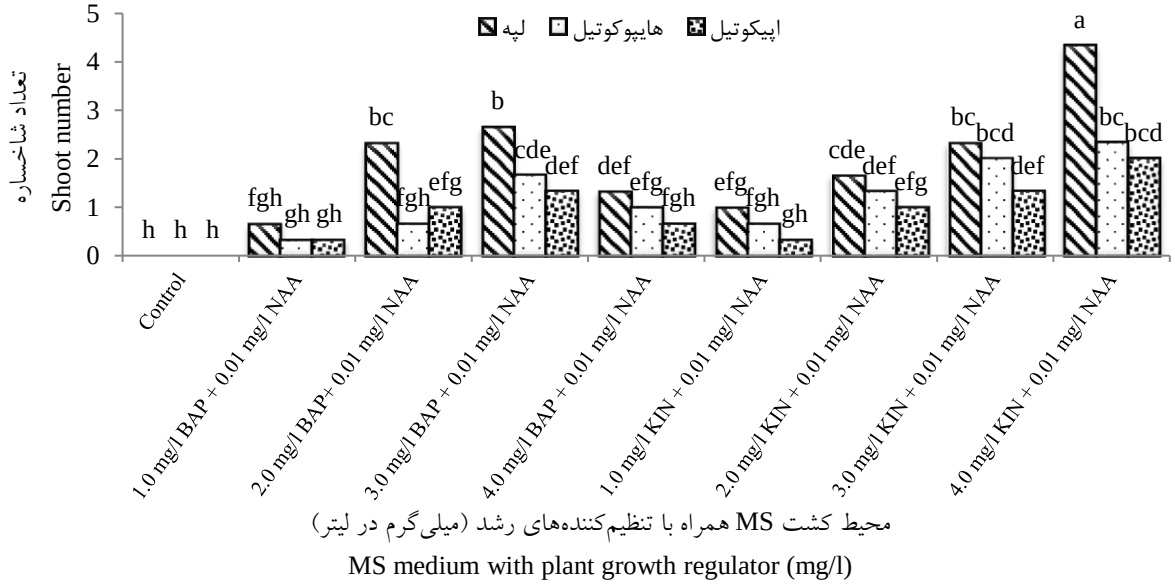
نتایج اثر محیط کشت اندام‌زایی بر تعداد شاخساره نشان داد که بیش‌ترین تعداد شاخساره (۲/۸۸ شاخساره در هر ریزنمونه) در محیط کشت MS حاوی ٤ میلی‌گرم در لیتر KIN همراه با ۰/۰۱ میلی‌گرم در لیتر NAA به‌دست آمد که با دیگر تیمارها تفاوت معنی‌داری نشان داد. کم‌ترین تعداد شاخساره، بدون شاخه‌زایی، مربوط به تیمار شاهد (بدون تنظیم‌کننده رشد) بود (شکل ۲). همچنین نتایج نشان داد که بلندترین طول شاخساره (۱/۲ سانتی‌متر) در محیط کشت MS حاوی ٤ میلی‌گرم در لیتر KIN همراه با ۰/۰۱ میلی‌گرم در لیتر NAA به دست آمد که با دیگر تیمارها تفاوت معنی‌داری نشان داد (شکل ۲).



شکل ۲- اثر تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی در محیط کشت MS بر تعداد شاخساره (نمودار بالا) و طول شاخساره. در هر نمودار، ستون‌هایی با حروف مشابه از نظر آماری اختلاف معنی‌داری ندارند.

Figure 2. Effect of plant growth regulators on shoot number (up) and shoot length (down) in MS medium. In each chart, column with different letter are significantly different.

اثر برهمکنش دو عامل ریزنمونه و نوع تنظیم‌کننده رشد گیاهی بر اندام‌زایی نشان داد که بیش‌ترین تعداد شاخساره (٤/٣٣ شاخساره در هر ریزنمونه) از ریزنمونه لپه در محیط کشت MS حاوی ٤ میلی‌گرم در لیتر KIN همراه با ٠/٠١ میلی‌گرم در لیتر NAA به‌دست آمد که با دیگر تیمارها تفاوت معنی‌داری نشان داد. کم‌ترین تعداد شاخساره، بدون شاخه‌زایی، مربوط به تیمار بدون تنظیم‌کننده رشد گیاهی بود (شکل ٣). با توجه به نتایج در تمامی تیمارها، ریزنمونه‌های لپه از قدرت شاخه‌زایی بیشتری برخوردار بودند.



شکل ٣- اثر برهمکنش ریزنمونه و تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی در محیط کشت MS بر تعداد شاخساره. ستون‌هایی با حروف مشابه، از نظر آماری اختلاف معنی‌داری ندارند.

Figure 3. Effect of interaction between explant and plant growth regulators on shoot number in MS medium. Column with same letter are not significantly different.

آزمایش دوم: اثر تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی بر پرآوری شاخه

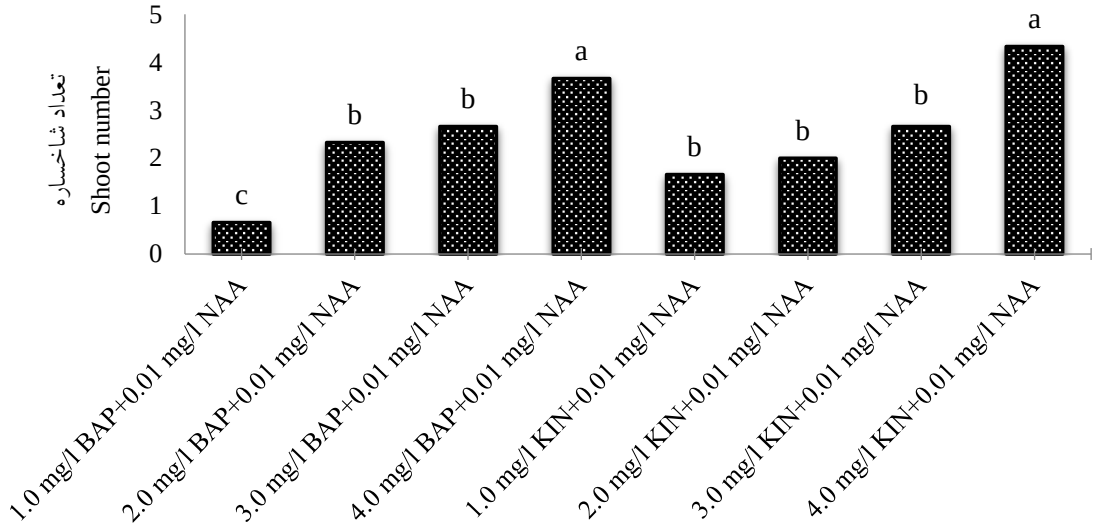
نتایج حاصل از تجزیه واریانس نشان داد که اثر تنظیم-کننده‌های رشد گیاهی در محیط کشت پرآوری، بر شاخص‌های تعداد و طول شاخساره در سطح احتمال یک درصد معنی‌داری بود (جدول ٢). بررسی اثر تنظیم-کننده رشد گیاهی بر شاخص تعداد شاخساره در آزمایش پرآوری، نشان داد که با افزایش غلظت هر دو تنظیم‌کننده‌های رشد BAP و KIN تعداد شاخساره افزایش یافت. به‌طوری‌که بیش‌ترین تعداد شاخساره (٤/٣٣ شاخساره در ریزنمونه) در محیط کشت MS حاوی ٤ میلی‌گرم در لیتر KIN و ٠/٠١ میلی‌گرم در لیتر NAA مشاهده شد که با تیمار ٤ میلی‌گرم در لیتر BAP و ٠/٠١ میلی‌گرم در لیتر NAA تفاوت معنی‌داری نداشت؛ اما با دیگر تیمارها در سطح احتمال یک درصد تفاوت معنی‌داری نشان داد. همچنین اثر تنظیم‌کننده رشد گیاهی بر طول شاخساره گیاه سپستان نشان داد که با افزایش غلظت KIN طول شاخساره افزایش یافت، به‌طوری‌که بیش‌ترین طول شاخساره (١/٢٦ سانتی‌متر) در محیط کشت MS با ٤ میلی‌گرم در لیتر KIN و ٠/٠١ میلی‌گرم در لیتر NAA به‌دست آمد و با دیگر تیمارها در سطح احتمال یک درصد اختلاف معنی‌داری داشت (شکل ٤).

جدول ۲- تجزیه واریانس شاخص‌های تعداد و طول شاخساره تحت تأثیر تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی در آزمایش پرآوری شاخساره

Table 2. Results of Anova on number and length of shoot characteristics affected by different plant growth regulators in proliferation experiment

منابع تغییرات Source	درجه آزادی df	میانگین مربعات Mean squares	
		تعداد شاخساره Shoot number	طول بلندترین شاخساره Maximum shoot length
محیط کشت Medium	7	3.90**	0.34**
خطای آزمایش Error	16	0.29	0.009
ضریب تغییرات (درصد) C.V. (%)	-	21.6	12.49

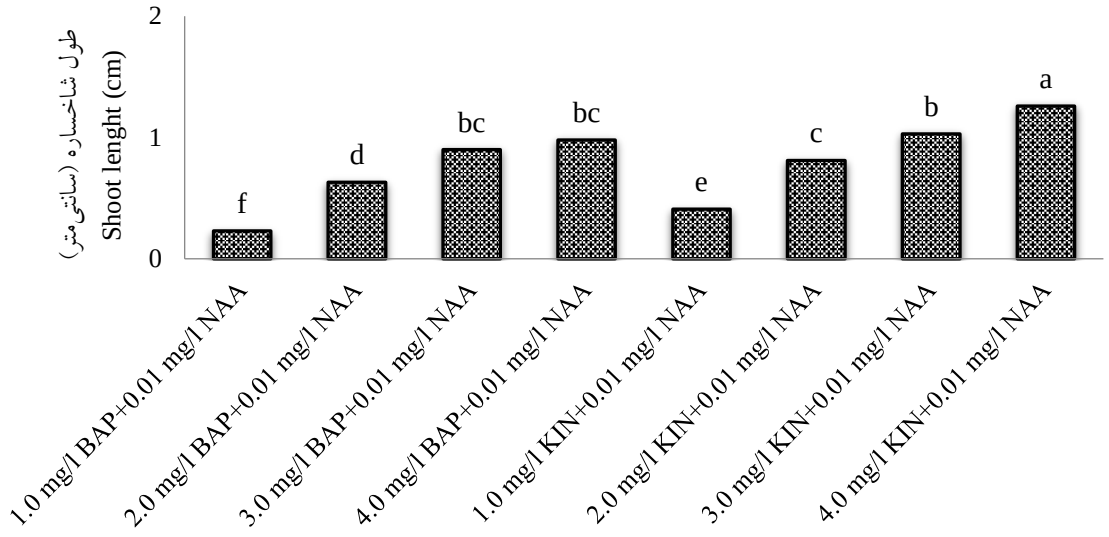
** نشان‌دهنده معنی‌دار در سطح احتمال خطای یک درصد. **significant at p<0.001



شکل ٤- اثر نوع تنظیم‌کننده رشد گیاهی بر تعداد شاخساره (نمودار بالا) و طول شاخساره در آزمایش پرآوری. در هر نمودار، ستون‌هایی با حروف مشترک، از نظر آماری اختلاف معنی‌داری ندارند.

Figure 4. Effect of plant growth regulators on shoot number (up) and Shoot length in proliferation experiment. In each chart, columns with same letter are not significantly different.

-



محیط کشت MS همراه با تنظیم کننده های رشد (میلی‌گرم در لیتر)

Plant growth regulator (mg/l) in MS medium

ادامهٔ شکل ٤.

Continued figure 4.

آزمایش سوم: اثر غلظت‌های مختلف NAA و IBA بر ریشه‌زایی شاخه

نتایج تجزیه واریانس نشان داد اثر غلظت‌های مختلف دو نوع اکسین NAA و IBA به‌کاررفته در محیط کشت ریشه‌زایی، بر تعداد و طول ریشه در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بود (جدول ۳). نتایج اثر غلظت‌های اکسین نشان داد که بیش‌ترین تعداد ریشه در محیط کشت حاوی ۱ میلی‌گرم در لیتر IBA به‌دست آمد که با تیمار ۱ میلی‌گرم در لیتر NAA تفاوت معنی‌داری نداشت، اما با دیگر تیمارها در سطح احتمال یک درصد تفاوت معنی‌داری داشت. کم‌ترین تعداد ریشه نیز در تیمار شاهد (بدون تنظیم‌کننده رشد گیاهی) مشاهده شد. همچنین نتایج این بررسی نشان داد که تیمارهای ۱ میلی‌گرم در لیتر IBA دارای بیش‌ترین طول ریشه (۱/٦۳ سانتی‌متر) بود که با ۱ میلی‌گرم در لیتر NAA تفاوت معنی‌داری نداشت. کم‌ترین طول ریشه نیز در تیمار شاهد (بدون تنظیم‌کننده رشدی) مشاهده شد (شکل ۵).

آزمایش چهارم: اثر نوع بستر کشت بر درصد سازگاری گیاهک‌های ریشه‌دار شده

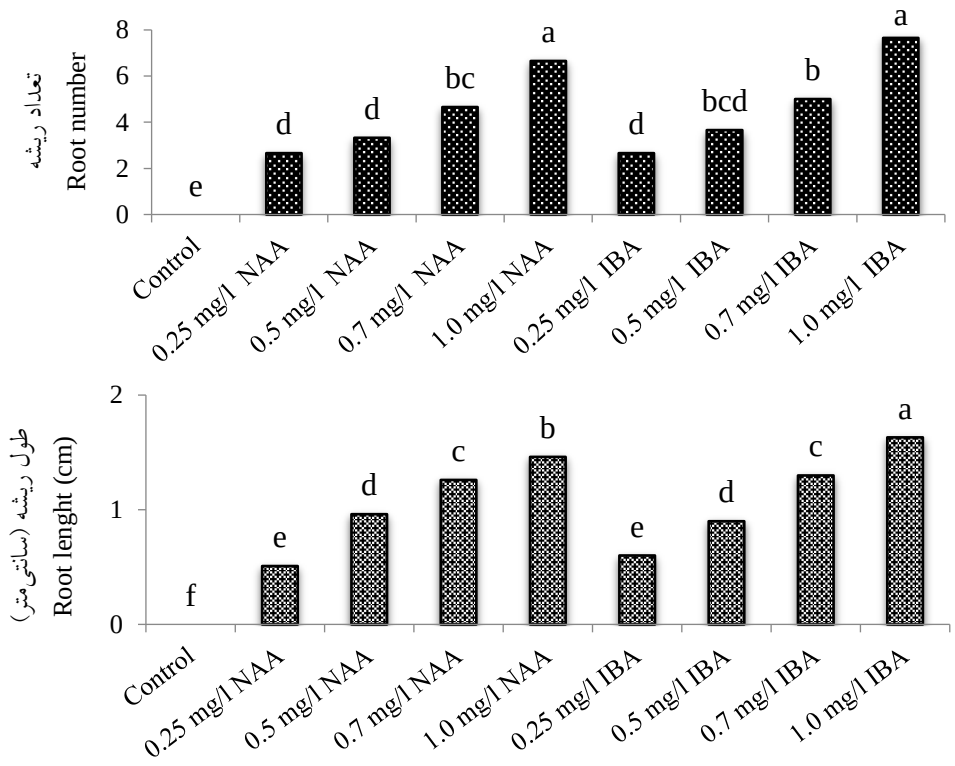
نتایج تجزیه واریانس نشان داد که تیمار نوع بستر کشت بر شاخص درصد سازگاری در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بود (جدول ٤). نتایج حاصل از بررسی اثر بستر کشت سازگاری بر درصد زنده‌مانی گیاهک‌های ریشه‌دارشده، نشان داد بیش‌ترین درصد سازگاری (۷۵ درصد)، در بستر کوکوپیت با پرلیت وجود داشت و به‌طور معنی‌داری بیش‌تر از درصد سازگاری در دیگر تیمارها بود و کمترین درصد سازگاری در بستر کشت پرلایت (٤۵ درصد) مشاهده شد (شکل ٦).

جدول ۳- تجزیه واریانس اثر تیمارهای تنظیم‌کننده رشد گیاهی بر تعداد و طول ریشه در آزمایش ریشه‌زایی

Table 3. Results of Anova on number and length of root characteristics affected by different plant growth regulators in root induction experiment

میانگین مربعات Mean square		درجه آزادی df	منابع تغییرات Source
طول ریشه Root length	تعداد ریشه Root number		
0.81**	15.78**	8	غلظت اکسین Auxin
0.007	0.59	18	خطای آزمایش Error
9.28	19.06	–	ضریب تغییرات (درصد) C.V. (%)

** معنی‌دار در سطح احتمال خطای یک درصد. **significant at p<0.001



غلظت تنظیم‌کننده‌های رشد در محیط کشت MS ریشه‌زایی (میلی‌گرم در لیتر)

Plant growth regulator (mg/l) in root induction medium

شکل ۵- اثر غلظت‌های مختلف تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی IBA و NAA بر تعداد (نمودار بالا) و طول ریشه. در هر شکل، ستون‌هایی با حروف مشابه از نظر آماری اختلاف معنی‌داری ندارند.

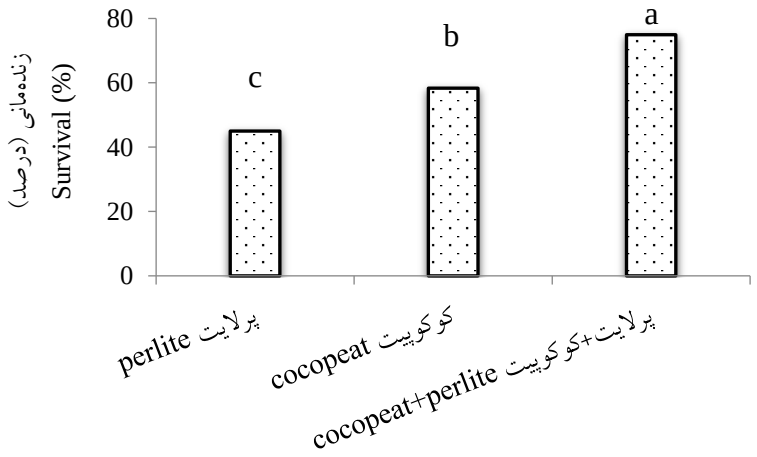
Figure 5. Effect of plant growth regulators, IBA and NAA, on root number (up) and root length (down). In each chart, column with same letter are not significantly different.

جدول ٤- تجزیه واریانس اثر بستر کشت بر درصد سازگاری گیاهک‌های در آزمایش سازگاری

Table 4. Results of Anova on survival rate of plantlets in acclimatization experiment.

منابع تغییرات Source	درجه آزادی df	میانگین مربعات Mean square درصد زنده‌مانی Survival percentage
بستر کشت Medium	2	677.77**
خطای آزمایش Error	6	19.44
ضریب تغییرات (درصد) C.V. (%)		7.41

** نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار در سطح احتمال خطای یک درصد. **significant at p<0.001



شکل ٦- اثر بستر کشت بر درصد زنده‌مانی در آزمایش سازگاری. ستون‌هایی با حروف متفاوت، از نظر آماری دارای اختلاف معنی‌دار هستند.

Figure 6. Effect of media type on survival rate in acclimatization experiment. Column with same letter are not significantly different.

بحث

اندام‌زایی مستقیم، تشکیل اندام از ریزنمونه بدون تشکیل کالوس است. به‌دلیل پتانسیل بالای تولید شاخساره در مدت‌زمان کوتاه، این روش، یک روش کارآمد باززایی محسوب می‌شود. در بیش‌تر موارد، مقدار باززایی بستگی به نوع ریزنمونه و ژنوتیپ گیاهی دارد (George *et al.*, 2007). در این پژوهش با افزایش مقدار KIN تعداد و طول شاخساره افزایش یافت و در تیمار BAP تا غلظت ۳ میلی‌گرم در لیتر، تعداد و طول شاخساره افزایش نشان داد؛ اما در غلظت بیشتر تعداد و طول شاخساره کاهش یافت. BAP می‌تواند سنتز سایتوکینین‌های طبیعی گیاه را تحریک کند و تشکیل شاخساره‌های جدید را بهبود بخشد (Magyar-Tábori *et al.*, 2010). نسبت سایتوکینین به اکسین عامل مهمی در تقسیم سلولی و اندام‌زایی است. این نسبت بستگی به ژنوتیپ گیاهی، نوع ریزنمونه و تنظیم‌کننده رشد

گیاهی به‌کاربرده‌شده دارد (George *et al*., 2007). Hare and Dhurendra (2013) نشان دادند که در اندام‌زایی مستقیم *Cordia myxa* Roxb. با استفاده از قلمه‌های تک‌گره در محیط کشت MS با غلظت‌های ۱، ۲، ۳ و ٤ میلی‌گرم در لیتر KIN همراه با ۰/۰۱ میلی‌گرم در لیتر NAA، بهترین غلظت برای تولید شاخساره توسط تیمار ٤ میلی‌گرم در لیتر KIN بود که با مشاهدات این آزمایش مطابقت داشت. سیتوکینین‌ها تقسیم سلول را از طریق تأثیر بر عواملی که عبور آن را از چرخه تقسیم سلولی مهار می‌کنند، کنترل می‌کند. سیتوکینین‌ها علاوه بر این‌که سرعت تقسیم را تنظیم می‌کنند، رشد جوانه‌های جانبی را نیز تحریک می‌کنند (Garcia-Ferriz *et al*., 2000). وجود اکسین به‌همراه سیتوکینین سبب تقویت نقش سیتوکینین می‌شود (Mendoza and Kaeppler, 2002). علت هم‌گرایی سیتوکینین با اکسین در تقسیم سلولی این است که بزرگ شدن سلول اتفاق افتد و به دنبال آن تقسیم سلولی انجام گیرد و تا زمانی که سلول به یک اندازه مشخص نرسیده باشد، تقسیم سلولی انجام نمی‌شود. هم‌چنین مراحل اولیه تقسیم سلولی نیازمند به اثر اکسین است (Gould *et al*., 1981). سیتوکینین‌ها نقش اساسی در تقسیم سلولی داشته و سبب رفع غالبیت انتهایی، القا و رشد شاخساره می‌شوند. نوع و غلظت سیتوکینین‌ها عامل مهمی در موفقیت پرآوری درون‌شیشه‌ای است (Grattapaglia and Machado, 1998). هم‌چنین تولید شاخساره پرآوری شده در محیط‌های کشت دارای سیتوکینین، اغلب نتیجه آزاد شدن جوانه‌های جانبی از غالبیت انتهایی جوانه‌های انتهایی است (Jafari *et al*., 2017b). Lameira and Pinto (2006) اثر جوانه‌های جانبی و انتهایی را در پرآوری *Cordia verbenacea* مورد بررسی قرار دادند. آن‌ها گزارش دادند که بیش‌ترین تعداد و طول شاخساره در ۵ میکرومولار KIN به‌دست آمد. هم‌چنین آن‌ها گزارش دادند، جوانه‌های انتهایی عملکرد بهتری نسبت به جوانه‌های جانبی داشتند که با این نتایج مطابقت دارد.

بیشتر گیاهان برای ریشه‌زایی مؤثر به اکسین نیازمند هستند. تنظیم‌کننده رشد اکسین تنها برای القای ریشه ضروری است و پس از آن از رشد ریشه جلوگیری می‌کند. بنابر گزارش Barcelo و همکاران (1988) نوک شاخساره محل تولید و سنتز اکسین بوده که وقتی به سمت قاعده ساقه حرکت می‌کند سبب ریشه‌زایی و طویل شدن ریشه می‌شود. با این وجود کیفیت شاخساره در مرحله ازدیاد هم عامل تعیین‌کننده در کیفیت ریشه‌دهی است. گزارش شده است که گیاهان چوبی نسبت به گیاهان علفی، به غلظت‌های بالاتری از اکسین برای ریشه‌زایی نیازمند هستند. تنظیم‌کننده رشد اکسین در خیلی از گیاهان به‌صورت موفقیت‌آمیزی برای افزایش درصد ریشه‌زایی مورد استفاده قرار گرفته است (Jafari *et al*., 2017a). با این حال رفتار ریشه‌زایی گیاهان مختلف در غلظت‌های مختلف تیمار تنظیم‌کننده رشدی اکسین متفاوت است (Dibax *et al*., 2005). Hare and Dhurendra (2013) گزارش دادند که شاخه‌های باززایی‌شده در شرایط درون‌شیشه‌ای گیاه *Cordia myxa* Roxb. را از جوانه‌های شاخه جدا کرده و تک‌تک در محیط کشت ریشه‌زایی شامل محیط کشت MS همراه با NAA، IBA و ۷۵۰ میلی‌گرم در لیتر زغال فعال کشت کردند که بهترین محیط کشت ریشه‌زایی حاوی ۲ میلی‌گرم در لیتر NAA و ۲ میلی‌گرم در لیتر IBA در ترکیب با زغال فعال بود. Mantovani و همکاران (2001) گزارش دادند که بهترین محیط کشت برای ریشه‌زایی درون‌شیشه‌ای در *Cordia dichotoma*، محیط کشت MS همراه با ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر IBA به همراه ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر زغال فعال بود. هم‌چنین آن‌ها اعلام کردند که تنظیم‌کننده رشد IBA بهتر از

تنظیم‌کننده رشد NAA سبب ریشه‌زایی در این گیاه شد. با توجه به نتایج پژوهش، در هر دو تنظیم‌کننده رشد با افزایش مقدار تنظیم‌کننده رشد بر تعداد و طول ریشه افزوده شد اما تنظیم‌کننده رشد IBA در افزایش طول ریشه برتر از NAA بوده و به نظر می‌رسد برای افزایش تعداد و طول ریشه در سپستان استفاده از IBA بهتر از NAA باشد. تنظیم‌کننده رشد NAA در محیط کشت نسبت به دیگر اکسین‌ها پایدارتر است (Nissen, and Sutter, 1990; Razavi *et al*., 2018). هم‌چنین NAA اثر بازدارنده‌ای دارد و ریشه‌های کم‌تری نسبت به دیگر اکسین‌ها از قبیل IBA القاء می‌کند. ثبات و دوام NAA به شکل آزاد در بافت گیاه سبب توقف رشد ریشه می‌شود و از افزایش طول ریشه جلوگیری می‌کند (Koetle *et al*., 2010) که با نتایج این پژوهش مطابقت دارد. اختلاف مشاهده‌شده میان اکسین‌ها می‌تواند به‌دلیل تمایل مختلف گیرنده‌های اکسین، اختلاف در جذب، انتقال و متابولیسم آن‌ها باشد (Deklerk *et al*., 1997).

در آخرین مرحله ریزازدیادی، گیاهک‌های ریشه‌دار شده طی چند مرحله سازگاری به خاک انتقال داده می شوند. انتقال و سازگاری اندام‌های ریشه‌دارشده از داخل شیشه‌های کشت به بسترهای کشت در گلخانه که از نظر دما، رطوبت، نور و مواد غذایی متفاوت هستند، انجام می‌شود (Torres, 1989). Kasthuri و همکاران (2013) گیاهک‌های ریشه‌دار شده *Heliotropium zeylanicm* در شرایط کشت درون‌شیشه‌ای را به گلدان-های پلاستیکی حاوی ورمی‌کولایت استریل شده منتقل کرده و به‌مدت یک هفته با محلول MS نیم غلظت، آبیاری و سپس به محیط گلخانه منتقل شدند. گیاهک-های سازگارشده ۸۲ درصد بقا نشان دادند. بنابراین، این پژوهش با حفظ و تکثیر گونه‌های برتر از طریق ریزازدیادی (شکل ۷)، مسیری را برای تولید انبوه این گیاه گشود که این مسئله خود برای جنگلکاری در مناطق خشک و انجام پژوهش‌های بعدی حائز اهمیت است.

شکل ۷- مراحل باززایی درون شیشه‌ای گیاه سپستان (*Cordia myxa* L.) به روش اندام‌زایی مستقیم (از چپ به راست).

Figure 7. Steps of *in vitro* plant regeneration through direct organogenesis in *Cordia myxa* L. (Left to right)

تشکر و قدردانی

شایسته است مراتب تشکر و قدردانی خود را از همکاران معاونت پژوهشی و فناوری دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان که در اجرای این تحقیق شرایط مناسب را فراهم کردند، ابراز داریم.

References

- Barajas-Morales, J., 1985. Wood structural differences between trees of two tropical forests in Mexico, *IAWA Bulletin*, 6(4): 355-364.
- Barcelo, C. J., R. G. Nicolas, G. B. Sabater & T. R. Sanchez, 1988. *In vitro* propagation of cubiu (*Solanum sessiliflorum* Dunal) with different auxin and cytokinin types and concentrations, *Asian Journal of Plant Science*, 12: 639-646.
- Damino, C., G. Ferraiolo & W.O. Baudoin, 2000. Ornamental plant propagation in the tropics. FAO plant production and production, 158 p.
- Deklerk, G. J., J. Ter Brugge & S. Marinova, 1997. Effectiveness of indole acetic acid, indole butyric acid and naphthalene acetic acid during adventitious root formation *in vitro* in Malus 'Jork 9', *Plant cell, tissue and organ culture*, 49(1): 39-44.
- Dibax, R., C. L. Eisfeld, F. L. Cuquel, H. Koehler & M. Quoirin, 2005. Plant regeneration from cotyledonary explants of Eucalyptus camaldulensis, *Sience Agriculture*, 62(4): 406-412.
- Garcia-Ferriz, L., R. Ghorbel, M. Ybarra, A. Belaj & I. Trujilio, 2000. Micropropagation from Adult olive trees, *Acta Horticulture*, 585: 879-882.
- George, E. F., M. A. Hall & G. D. Klerk, 2007. Plant Propagation by tissue Culture: Vol 1. The Background. Springer Science & Business Media press, 508 p.
- Gould, A. R., N. P. Everett, T. L. Weng & H. P. Street, 1981. Studies on the control of the cycle in cultured plant cells, *Protoplasma*, 106(1-2): 1-13.
- Grattapaglia, D. & M. A. Machado, 1998. Micropropagation. In: Torres, A. C., L. S. Caldas & J. A. Buso, (Eds.), Cultura de Tecidos e Transformacao Genetica de Plantas. Embrapa-cnph Brasilia press, pp: 183-247.
- Hare, K. & S. Dhurendra, 2013. Micropropagation of Lasora (Cordia myxa Roxb), *Indian journal of Horticulture*, 70(3): 323-327.
- Jafari, S., M. H. Daneshvar, M. R. Salehi Salmi & L. J. Abdi, 2017a. Indirect Organogenesis and Plant Regeneration in Common Sage (*Salvia officinalis* L.): An Important Medicinal Plant of Iran, *Modern Applied Science*, 11(5): 22-29.
- Jafari, S., M. H. Daneshvar, M. R. Salehi Salmi & L. J. Abdi, 2017b. Influence of putrescine and thidiazuron on in vitro organogenesis in *Salvia officinalis* L, *Iranian Journal of Rangelands Forests Plant Breeding and Genetic Research*, 25(2): 201-211.
- Kasthuri, C., E. Natarajan & B. Muthukumar, 2013. High Frequency Shoot Regeneration of *Heliotropium zeylanicum* (Burm. F.) Lam. From Nodal Explant, *Plant Cell Biotechnology and Molecular Biology*, 14(3 and 4): 111-114.
- Koetle, M. J., J. F. Finnie & J. van Staden, 2010. *In vitro* propagation in *Dierama erectum* Hilliard, *Plant cell tissue organ culture*, 103(1): 23-31.
- Lameria, O. A. & J. E. B. P. Pinto, 2006. *In vitro* propagation of *Cordia verbenacea* L. (Boraginaceae), *Revista Brasileira de Plants Medicinais*, 8: 102-104.
- Magyar-Tábori, K., J. Dobránszki, J. A. T. da silva, S. M. Bulley & L. Hudák, 2010. The role of cytokinins in shoot organogenesis in apple, *Plant Cell, tissue and organ Culture*, 101(3): 251-267.
- Mantovani, N. C., E. T. H. Franco & S. Vestena, 2001. *In vitro* regeneration of Louro-Pardo (*Cordia trichotoma* (Vellozo) Arrabia ex steudel). Ciéncia Florestal, *Santa Maria*, 11(2): 93-101.
- Meghwal, P. R., 2006. Propagation Studies in Lehsua (Cordia myxa). Proceedings of the national symposium on production, utilization and export of underutilized fruits with commercial potentialities, Kalyani, Nadia, West Bengal, India, pp: 117-119.
- Mendoza, M. G. & H. F. Kaeppler, 2002. Auxin and sugar effects on callus induction and plant regeneration Frequencies from mature embryos of wheat (*Triticum aestivum* L), *In vitro cellular and Developmental Biology–plant*, 38(1): 39-45.
- Murashige, T. & F. Skoog, 1962. A revised medium for rapid growth and bioassay with tissue culture, *Physiology Plant*, 15: 473-476.
- Murashige, T., 1974. Plant propagation through tissue culture, *Annual reviews of plant physiology*, 25(1): 135-166.
- Nissen, S. J. & E. G. Sutter, 1990. Stability of IAA and IBA in nutrient medium of several tissue culture procedures, *HortScience*, 25(7): 800-802.
- Nosrati, B., M. Masoudifar & M. Haghpanah, 2015. Anatomical, physical and chemical properties of Sepestan wood (*Cordia myxa*

L.) in Iranshahr region, *Iranian journal of wood and paper science research*, 30(1): 110-118.
- Padhi, M. & S. P. Singh, 2017. Surface Sterilization for Reducing Microbial Contamination in *In Vitro* Propagation of Lasora (*Cordia myxa* Roxb.) Using Nodal Segments, *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 6(8): 836-842.
- Razavi, S. A., S. M. H. Nasr & M. Valizadeh, 2018. Effect of cutting type and plant growth regulators (IBA, NAA, 2, 4-D) on rooting of *Taxus baccata* L. cuttings, *Forest Research and Development*, 4(1): 73-83.
- Razdan, M. K., 2003. Introduction to Plant tissue culture, *Oxford of IBH publishes*, 23: 256-261.
- Sabeti, H., 1976. Forests, trees, and shrubs of Iran. Ministry of Agriculture and Natural Resources, 874 p.
- Singh, D., D. G. Dhandra & A. K. Shukla, 2007. *In vitro* clonal propagation of Lasoda (*Cordia myxa* Roxb.). an arid fruit tree, *Recent Trends in Horticulture Biotechnology*, 305-310.
- Torres, K. C., 1989. Tissue culture techniques for horticulture crops. Chapman and Hall. Ronald press, New York, U.S.A, 285 p.

In vitro plant regeneration through direct organogenesis in *Cordia myxa* L.

H. Bosak[1], M. H. Daneshvar[2], M. R. Salehi Salmi[*3] and A. Lotfi Jalal-Abadi[4]

1- M.Sc. of Horticultural Science, Agricultural Sciences and Natural Resources Faculty, University of Khuzestan, Khuzestan, I. R. Iran. (h_bosak@gmail.com)
2- Professor, Department of Horticultural Science, Agricultural Sciences and Natural Resources Faculty, University of Khuzestan, Khuzestan, I. R. Iran. (mhdaneshvar@yahoo.com)
3- Assistant professor, Department of Horticultural Science, Agricultural Sciences and Natural Resources Faculty, University of Khuzestan, Khuzestan, I. R. Iran. (mrsalehisalmi@gmail.com)
4- Assistant professor, Department of Plant Production and Genetic Engineering, Agricultural Sciences and Natural Resources; University of Khuzestan, Khuzestan, I. R. Iran. (aminlo2020@gmail.com)

Received: 28.10.2018 Accepted: 14.01.2019

Abstract

In this study, a rapid and efficient protocol was developed for *in vitro* plantlet regeneration of Lasora (*Cordia myxa* L.) using different explants. Seperate experiments, one for shoot regeneration optimization, one for proliferation, and one for induction were conducted in this study. Factorial design 3*7 based on compeletly randomized design was used for shoot regeneration but just compeletly randomized design used for proliferation and induction. The highest frequency of shoot regeneration (4.33) from cotyledon was obtained on MS medium supplemented with 4.0 mg/l kinetin (KIN) and 0.01 mg/l 1-Naphthaleneacetic acid (NAA). The explants started regenerating shoots after 15-21 days in culture. To proliferation the regenerated shoot, the explants were transferred to MS medium containing different concentrations of KIN or BAP with 0.01 mg/l NAA. Shoot multiplication and elongation took place on the same medium. Indole-3-butyric acid (IBA) at 1.0 mg/l was most effective for root regeneration. Using the current protocol, it tooks 2 months to regenerate plantlets. The *in vitro* regenerated plantlets were successfully acclimatized and established in greenhouse conditions.

Keywords: Auxin, Proliferation, Forest, Boraginaceae, Cytokinin.

[*] Corresponding author Tel: +989177016178