تعیین شرایط بهینه برای ریزازدیادی گیاه زالزالک (*Cratagus aronia*) در شرایط کشت درون شیشه‌ای

مژده متقی[۱]، رویا رضوی زاده[۲]*، آرش مختاری[۳] و محمود اطرشی[۳]

[۱] ایران، تهران، دانشگاه پیام نور، گروه بیوتکنولوژی کشاورزی

[۲] ایران، تهران، دانشگاه پیام نور، گروه زیست‌شناسی

[۳] ایران، اصفهان، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی، مدیریت بیوتکنولوژی کشاورزی منطقه مرکزی کشور، بخش تحقیقات کشت بافت گیاهی

تاریخ دریافت: ۹۴/۱۲/۳ تاریخ پذیرش: ۹۶/۴/۱۳

چکیده

زالزالک از تیره گل سرخ (Rosaceae) و ازجمله گیاهانی است که دارای مصارف دارویی و زینتی بوده و ارزش صادراتی دارد. این جنس به دلیل انجام دورگه شده‌های فراوان، دور گیری درهم، سیستم تولیدمثلی آپومیکسی و پلی پلوییدی به لحاظ تکثیر یکی از مشکل‌ترین جنس‌ها برای گیاه‌شناسان است. استفاده از فناوری‌های نوین بخصوص تکنیک کشت بافت در تولیدات گیاهی قادر خواهد بود به‌عنوان روش جایگزین، روند تولید انبوه و کنترل‌شده این گیاه را ارتقا بخشد. ازاین‌رو در این تحقیق مراحل مربوط به بهینه‌سازی ریز ازدیادی گونه *Crataegus aronia* شامل شاخه زایی و ریشه‌زایی در شرایط کشت درون شیشه‌ای مورد ارزیابی قرارگرفته است. نمونه‌برداری در فصل بهار انجام و سپس سترون‌سازی شدند. محیط کشت پایه (MS) جهت استقرار اولیه مورداستفاده قرار گرفت. آزمایش شاخه‌زایی در محیط کشت MS و غلظت‌های مختلفی از تنظیم‌کننده‌های رشد ایندول بوتیریک اسید، ایندول استیک اسید، بنزیل آمینو پورین و تیدیازورون و آزمایش ریشه‌زایی در محیط‌های MS ۱/۲، MS با غلظت‌های مختلف ایندول بوتیریک اسید و نفتالین استیک اسید صورت گرفت. نتایج مقایسه میانگین‌ها نشان داد که بهترین میزان شاخه‌زایی درتیمار ۳ میلی‌گرم در لیتر بنزیل آمینو پورین و ۱ میلی‌گرم در لیتر ایندول بوتیریک اسید و بیشترین میزان ریشه‌زایی در محیط کشت MS ۱/۲ در تیمار ۳ میلی‌گرم در لیتر ایندول بوتیریک اسید حاصل شد.

واژه های کلیدی: زالزالک، ریز ازدیادی، کشت بافت

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۹۱۳۳۶۷۸۲۱۸ ، پست الکترونیکی: roya1354@yahoo.com

مقدمه

زالزالک، کیالک و یا کویج بانام انگلیسی hawthorn و نام علمی *Crataegus aronia* گیاه درختچه‌ای است که در سراسر حوزه رویش زاگرس، اعم از جنگل‌های پیوسته و منفصل وجود دارد. در خارج از حوزه رویش زاگرس، این‌گونه در نواحی استپی البرز در ارتفاعات دره کرج و زنجان، کوهین سیاه‌بیشه در جاده چالوس، استان کهکیلویه و بویراحمد و استان اصفهان به خصوص شهرستان نجف‌آباد بصورت خودرو می‌روید (۱۲). این جنس دارای ۲۰۰۰ گونه در سراسر جهان است(۹).

پراکنش گونه *Crataegus aronia* بطور عموم در مناطق معتدل نیم‌کره شمالی می‌باشد (۲۱). در ایران حدود ۲۷ گونه (۲۲ گونه، ۵ هیبرید) از این جنس وجود دارد. میوه آن دارای خواص دارویی بوده و قابلیت خوراکی دارد (۷).

گل‌ها، برگ‌ها و میوه زالزالک سرشار از آنتی‌اکسیدان و پل فنل ها هستند و تنها در باغ‌ها مزارع و حاشیه‌ها جاده‌ها استفاده می‌شود (۵).

گونه *Cratagus aronia* در سراسر حوزه رویش زاگرس، اعم از جنگل‌های پیوسته و منفصل وجود دارد. همچنین ازاین‌گونه در کرمان نیز نام‌برده شده و به‌طورکلی این‌گونه متعلق به منطقه ایران – تورانی زاگرس هست. سازگاری بالایی به خشکی و سرما دارند و ضمن پوشش دادن مناطق نیمه‌خشک وسیع کشور بهترین پایه پیوند برای به، گلابی و سیب به می‌باشد و ازنظر خواص دارویی و ارزش صادراتی دارای اهمیت می‌باشد (۱۲).

بذور زالزالک برای جوانه‌زنی به سرمادهی و حداقل به ۲ سال وقت نیاز دارند(۲۳،۱۸). به‌منظور تکثیر گیاه از روش قلمه‌زنی نیز می‌توان استفاده کرد که مشکل عمده در این حالت سختی ریشه‌زایی در قلمه‌ها می‌باشد (۱۱). بر اساس اطلاعات موجود اقدامات صورت گرفته در خصوص جنگل‌کاری با گونه‌های زالزالک، چه بصورت بذرکاری و چه درزمینه تولید نهال، با موفقیت مواجه نبوده است.

در تکثیر گیاه از طریق بذر، گیاهان جدیدی با صفات ژنتیکی متفاوت از گونه والد تولید می‌شوند و درنتیجه این نحوه تکثیر برای پایه‌های بدست‌آمده از والد با خلوص ژنتیکی همراه نیست (۴). بنابراین برای رسیدن به یک ساختار ژنتیکی از والد مرغوب و تولید انبوه آن به روش‌های غیرجنسی روی می‌آورند. مطالعات کمی در رابطه با کشت بافت خانواده Rosaceae انجام‌گرفته است و بهترین محیط کشت برای استقرار جوانه‌ها در گونه *Prunus mahaleb* L محیط کشت MS (Murashige and Skoog) می‌باشد (۱۵). بر اساس تحقیقات انجام‌شده بر روی *Prunus dulcis* Mill (۱۶)، *Prunus* sp (۱۷) و بر روی *Crataegus* sp (۱۰و۳)، BAP (Benzylaminopurine) بعنوان بهترین تنظیم‌کننده رشد در مرحله شاخه‌زایی در محیط کشت MS معرفی‌شده است.

کشت سرشاخه‌های گونه *C. azarolus* در محیط کشت LP تغییریافته و با تنظیم‌کننده‌های رشد BAP و فورکولورفنورون۵- ایندول استیک اسید (CPPU) با ۳ غلظت (۰/۲، ۰/۰۸/۴) میلی‌گرم در لیتر انجام شد که بیش‌ترین شاخه زایی را در غلظت ۰/۴ میلی‌گرم در لیتر به دست آمد و بیشترین درصد ریشه‌زایی و تعداد ریشه را در محیط کشت LP همراه با ۴ میلی‌گرم در لیتر IBA (Indole3- butric acid) به مدت ۵ روز و سپس انتقال به محیط کشت بدون هورمون به دست آوردند (۶). در بررسی ریشه‌زایی *C.sinsica Boiss* در محیط ۱/۲ MS و MS و با تنظیم‌کننده‌های رشد IAA (Indole3-acetic acid) IBA با غلظت‌های (۰، ۰/۵، ۱ و ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر)۹ درصد ریشه‌زایی در محیط ۱/۲ MS همراه با ۱ میلی‌گرم در لیتر IBA به دست آوردند (۱۵).

استفاده از فناوری‌های نوین بخصوص تکنیک کشت بافت در تولیدات گیاهی قادر خواهد بود به‌عنوان روش جایگزین، روند تولید انبوه و کنترل‌شده این گیاه را ارتقا بخشد. در کشت تک گره، جوانه یا بخشی از ساقه بمنظور تشکیل و توسعه ساقه جدا می‌شود. این روش طبیعی‌ترین روش تکثیر گیاهان در شرایط آزمایشگاهی است. تکثیر رویشی بروش معمول مشکل است اما روش کشت تک گره برای سرعت بخشیدن به تکثیر در مقیاس زیاد در زمان اندک و کمک به حفظ بقای گیاه ارجحیت دارد (۱۶).

هدف از این پژوهش تعیین بهترین ترکیب از تنظیم‌کننده‌های رشد گیاه در راستای ریز ازدیادی و تولید انبوه گیاه زالزالک و همچنین دسترسی به یک پروتکل زودبازده برای تکثیر سریع پایه زالزالک از طریق کشت جوانه جانبی (تکنیک کشت تک گره) در شرایط درون شیشه می‌باشد که می‌تواند در احداث اصولی باغات با استفاده از پایه‌های همگن، مرغوب و عاری از ویروس و تولید تجاری و انبوه پایه مورداستفاده در احداث باغات بکار گیرد و بعنوان محصول اصلی یا گیاه‌پایه برای انجام

پیوند مورداستفاده قرار گیرد.

مواد و روشها

تحقیق حاضر در مهرماه سال ۱۳۹۳ در بخش کشت بافت پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی منطقه مرکزی کشور در اصفهان آغاز شد. سرشاخه‌های موردنیاز برای این پژوهش از درختان زالزالک در اوایل بهار و زمانی که هنوز سرشاخه‌ها حالت چوبی پیدا نکرده بودند از نهالستان (خزانه) مورد تأیید سازمان جهاد کشاورزی استان اصفهان جمع‌آوری شدند که همه از ژنوتیپ زالزالک قرمز هستند. ریز نمونه از این نهالستان‌ها و همه در یک‌زمان گرفته‌شده است. برای تهیه ریز نمونه از جوانه‌های انتهایی و جانبی شاخه‌های جوان در فصل بهار استفاده شد. بمنظور آماده‌سازی، بعد از جدا کردن کلیه برگ‌ها، هر سرشاخه به قطعات ۲-۳ سانتی‌متر، حاوی حداقل یک جوانه تقسیم شد. ابتدا نمونه‌ها با آب شهری شست‌وشو و به مدت یک ساعت با قارچ‌کش کاپتان به مقدار ۲ گرم در لیتر ضدعفونی شده و با محلول اتانول ۷۰ درصد به مدت یک دقیقه و با آب مقطر دو بار یونیزه شست‌وشو شده و سپس در محلول هیپوکلریت سدیم ۲۰ درصد به همراه ۳ قطره توین ۲۰ (به منظور افزایش کشش سطحی) به مدت ۲۰ دقیقه و ۳ بار شست‌وشو با آب مقطر در زیر لامینار انجام گرفت. تعداد ۵ عدد سرشاخه به طول ۱ سانتی‌متر که هرکدام دارای یک گره بودند پس از طی مراحل ضدعفونی در هر شیشه حاوی محیط کشت MS کشت شدند. سپس سرشاخه‌ها جهت رشد به اتاق رشد با شرایط دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد، فتوپریود ۱۶ ساعت نور و ۸ ساعت تاریکی و شدت نور ۳۰۰۰ لوکس منتقل شدند.

پس از انجام مراحل ضدعفونی، ریز نمونه‌ها بمنظور رشد اولیه جوانه‌ها و بررسی میزان موفقیت در مراحل ضدعفونی در محیط MS فاقد تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی کشت گردید و با مشاهده آلودگی، نمونه‌های آلوده مجدداً ضدعفونی شدند و برای ضدعفونی مجدد سرشاخه‌های گیاه زالزالک از آنتی‌بیوتیک کلرامفنیکل (۳۶۰µl) وپنی سیلین ۴۰۰ به مقدار (۱۰۰µl) در یک لیتر محیط کشت جامد استفاده شد. پس از حصول اطمینان از عدم آلودگی، مراحل بعد انجام گرفت. بمنظور ریز ازدیادی، قطعات حاوی یک جوانه جانبی بعنوان ریز نمونه برای کشت بر روی محیط MS حاوی غلظت‌های مختلف IBA, IAA (۰، ۰/۵، ۱) و BAP (۰،۱،۲،۳)، TDZ (Thidiazuran)(۰، ۰/۵، ۱، ۱/۵) میلی‌گرم بر لیتر استفاده شد. پس از گذشت سی روز پارامترهای رشدی مختلف مثل تعداد شاخه فرعی، میانگین طول ساقه، درصد باززایی و میانگین فاصله میانگره در ریز شاخه‌ها اندازه‌گیری شدند. تکثیر بیشتر و مکرر از طریق برداشت جوانه‌های شاخه در قالب گره‌های منفرد، بر روی محیط القا مشابه به‌صورت واکشت انجام گردید. تمامی محیط‌های کشت در شرایط دمایی ۲۵ درجه و سیکل نوری ۱۶ ساعته با شدت نور ۲۵۰۰ لوکس نگهداری شد. ریز شاخه‌های حاصل از مرحله قبل به محیط ریشه‌زایی MS حاوی (۰/۵، ۱، ۱/۵) میلی‌گرم بر لیتر NAA (Naphthaleneacetic acid)، IBA و (۱،۲،۳) میلی‌گرم بر لیتر IBA و محیط ریشه‌زایی ۱/۲ MS حاوی (۰/۵، ۱، ۱/۵) میلی‌گرم بر لیتر IBA، NAA و (۱،۲،۳) میلی‌گرم بر لیتر IBA منتقل شدند. نمونه‌ها ابتدا یک هفته در تاریکی و سپس به مدت ۳ هفته در شرایط مشابه با مرحله قبل نگهداری گردیدند. پس از گذشت ۳۰ روز صفاتی شامل طول ریشه، تعداد ریشه و درصد ریشه‌زایی اندازه‌گیری شد. آزمایش بصورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار انجام و داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SAS تجزیه‌وتحلیل گردیدند. تجزیه واریانس با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ۵ درصد صورت گرفت.

نتایج

بعد از کشت ریز نمونه‌ها بر روی محیط MS حاوی تنظیم‌کننده‌های رشدی مختلف، پارامترهای رشدی مختلف

مثل تعداد شاخه فرعی، میانگین طول ساقه، درصد باززایی و میانگین فاصله میانگره پس از سی روز اندازه‌گیری شدند. بمنظور بررسی بهینه‌ترین ترکیب اکسین و سیتوکینین بر روی باززایی گیاه، چهار آزمایش با حضور اکسین‌های (IBA و IAA) و سیتوکینین‌های (TDZ و BAP) انجام گرفت. در آزمایش اول از تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی IBA و BAP در غلظت‌های مختلف استفاده شد. نتایج تجزیه واریانس داده‌های حاصل از این آزمایش نشان داد که اثر تیمار BAP برای صفات طول ساقه، تعداد شاخه فرعی، درصد باززایی و تعداد گره در سطح احتمال ۱ درصد معنی‌دار بوده اما از طرف دیگر، هیچ‌گونه تأثیر معنی‌دار ازلحاظ آماری بر روی صفت فاصله میانگره رخ نداده است. اثر متقابل بین BAP و IBA مبین تأثیر معنی‌دار ($p\leq0.01$) بر روی طول ساقه، درصد باززایی و فاصله میانگره است (جدول۱).

جدول۱- نتایج تجزیه واریانس اثر سطوح مختلف IBA و BAP بر طول ساقه، تعدادشاخه فرعی، درصد باززایی، تعداد گره و فاصله میانگره گیاه زالزالک

منابع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات				
		طول ساقه	تعداد شاخه فرعی	درصدباززایی	تعداد گره	فاصله میانگره
BAP	۳	۱,۶۴ **	۲,۴۴**	۷۴۲۵**	۴,۷۶**	۰,۲۴ ns
IBA	۲	۱,۵۸ **	۰,۷۷ns	۲۲۵ns	۰,۰۲ns	۰,۴۵ **
BAP*IBA	۶	۱,۴ **	۰,۷۷ ns	۳۸۲۵**	۱,۹۹ns	۰,۵۷ **
خطا	۲۴	۰,۱۶	۰,۵۸	۵۲۵	۱,۱۶	۰,۰۹
کل	۳۵					

ns، * و ** به ترتیب نشان‌دهنده عدم معنی‌دار بودن، معنی‌دار بودن در سطح ۵ درصد و ۱ درصد

در آزمایش دوم، ترکیب BAP و IAA استفاده شد. طبق جدول ۲، تأثیر BAP فقط بر طول ساقه و درصد باززایی در سطح ۱ درصد معنی‌دار شده است. کنش متقابل بین این دو تنظیم‌کننده رشد بر هیچ‌یک از صفات معنی‌دار نبوده است.

در آزمایش سوم باززایی از TDZ و IAA استفاده گردید. نتایج تجزیه واریانس داده‌های حاصل از این آزمایش نشان داد که تنظیم‌کننده رشد TDZ بر صفات تعداد شاخه فرعی، درصد باززایی، تعداد گره و فاصله میانگره در سطح احتمال ۱ درصد تأثیرات معنی‌داری دارد. کنش متقابل TDZ و IAA بر طول ساقه و درصد باززایی در سطح ۱ درصد اما بر تعداد شاخه فرعی در سطح ۵ درصد معنی‌دار بوده است (جدول۳).

زمانی که به‌جای IAA از اکسین دیگر (IBA) استفاده شد، کنش متقابل تغییر کرده به‌نحوی‌که صفات تعداد شاخه فرعی، درصد باززایی و تعداد گره در سطح ۱ درصد تحت تأثیر قرار گرفتند. صفات طول ساقه و فاصله میانگره در این آزمایش تحت تأثیر ترکیب تیماری قرار نگرفتند (جدول ۴).

در خصوص بررسی بهترین ترکیب تنظیم‌کننده رشد، تیمارهای (۱) BAP + (۰) IBA، (۳) BAP + (۱)IBA و (۳) BAP + (۰,۵) IBA ازلحاظ آماری با یکدیگر تفاوت معنی‌دار در سطح ۵ درصد نداشته اما نسبت به سایر تیمار بیشترین تأثیر را بر درصد باززایی داشته‌اند (نمودار1a). در نمودار 1b، بیشترین فاصله میانگره در تیمار (۱) BAP + (۰) IBA مشاهده می‌شود. اگرچه این ترکیب تیماری در خصوص طول ساقه نیز ارجحیت داشته اما ازلحاظ آماری

تفاوت معنی‌داری با تیمارهای (۱) BAP + (۰) IBA یا (۳) IBA(۰) + BAP در سطح ۵ درصد نشان نداده است (نمودار1c).

جدول ۲- نتایج تجزیه واریانس اثر متقابل سطوح مختلف IAA و BAP بر طول ساقه، تعدادشاخه فرعی، درصد باززایی، تعداد گره و فاصله میانگره گیاه زالزالک

منابع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات				
		طول ساقه	تعداد شاخه فرعی	درصد باززایی	تعداد گره	فاصله میانگره
BAP	۳	۱,۹۷ **	۱,۳۷ ns	۵۲۲۵**	۱,۸۰ ns	۰,۰۶ ns
IAA	۲	۰,۷۴ **	۰,۱۹ns	۵۲۰۰**	۱,۸۶ns	۰,۰۶ ns
BAP*IAA	۶	۰,۲۲ ns	۰,۱۲ ns	۱۴۰۰ ns	۰,۷۵ns	۰,۰۸ ns
خطا	۲۴	۰,۱۱	۱۲	۶۷۵	۱,۰۲	۰,۰۵
کل	۳۵					

ns، * و ** به ترتیب نشان‌دهنده عدم معنی‌دار بودن، معنی‌دار بودن در سطح ۵ درصد و ۱ درصد

جدول ۳- نتایج تجزیه واریانس متقابل سطوح مختلف IAA و TDZ بر طول ساقه، تعدادشاخه فرعی، درصد باززایی، تعداد گره و فاصله میانگره گیاه زالزالک

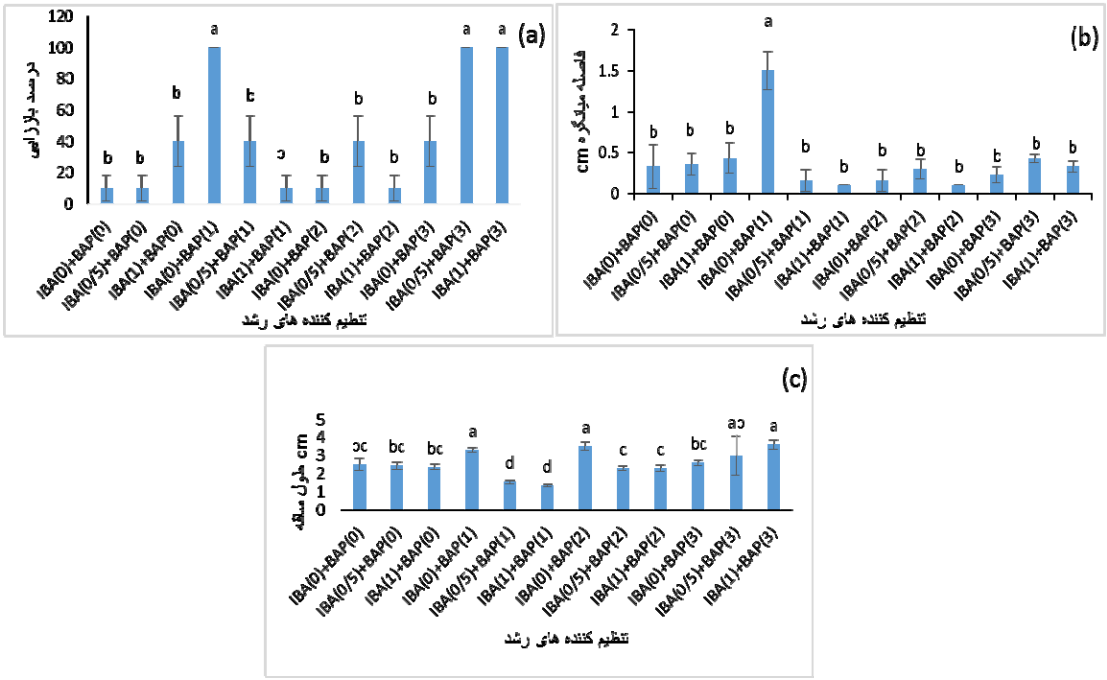
منابع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات				
		طول ساقه	تعداد شاخه فرعی	درصد باززایی	تعداد گره	فاصله میانگره
TDZ	۳	۱,۹۸ ns	۴,۱۷ **	۱۰۶۰۰**	۶,۳۲ **	۰,۱۲ **
IAA	۲	۰,۰۰۰۲ ns	۲,۵**	۹۰۲۵**	۲,۳۳ns	۰,۰۲ ns
TDZ*IAA	۶	۰,۸۶ **	۱,۶۲ *	۲۱۲۵ **	۰,۵ns	۰,۰۰۹ ns
خطا	۲۴	۰,۱۷	۰,۵	۳۵۰	۰,۸۳	۰,۰۱
کل	۳۵					

ns، * و ** به ترتیب نشان‌دهنده عدم معنی‌دار بودن، معنی‌دار بودن در سطح ۵ درصد و ۱ درصد.

جدول ۴- نتایج تجزیه واریانس اثر سطوح مختلف IBA و TDZ بر طول ساقه، تعدادشاخه فرعی، درصد باززایی، تعداد گره و فاصله میانگره گیاه زالزالک

منابع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات				
		طول ساقه	تعداد شاخه فرعی	درصد باززایی	تعداد گره	فاصله میانگره
TDZ	۳	۲,۴۷ **	۰,۶۶ *	۴۶۹۱,۶**	۱,۲۱ ns	۰,۰۱ ns
IBA	۲	۰,۴۸ ns	۰,۰۲ns	۳۲۵ ns	۰,۴۴ns	۰/۰۰۴ ns
TDZ*IBA	۶	۰,۳۹ ns	۰,۶۹ **	۴۹۹۱**	۱,۹۶**	۰,۰۲ ns
خطا	۲۴	۰,۱۹	۰,۱۹	۳۷۵	۰,۵	۰,۰۱
کل	۳۵					

ns، * و ** به ترتیب نشان‌دهنده عدم معنی‌دار بودن، معنی‌دار بودن در سطح ۵ درصد و ۱ درصد



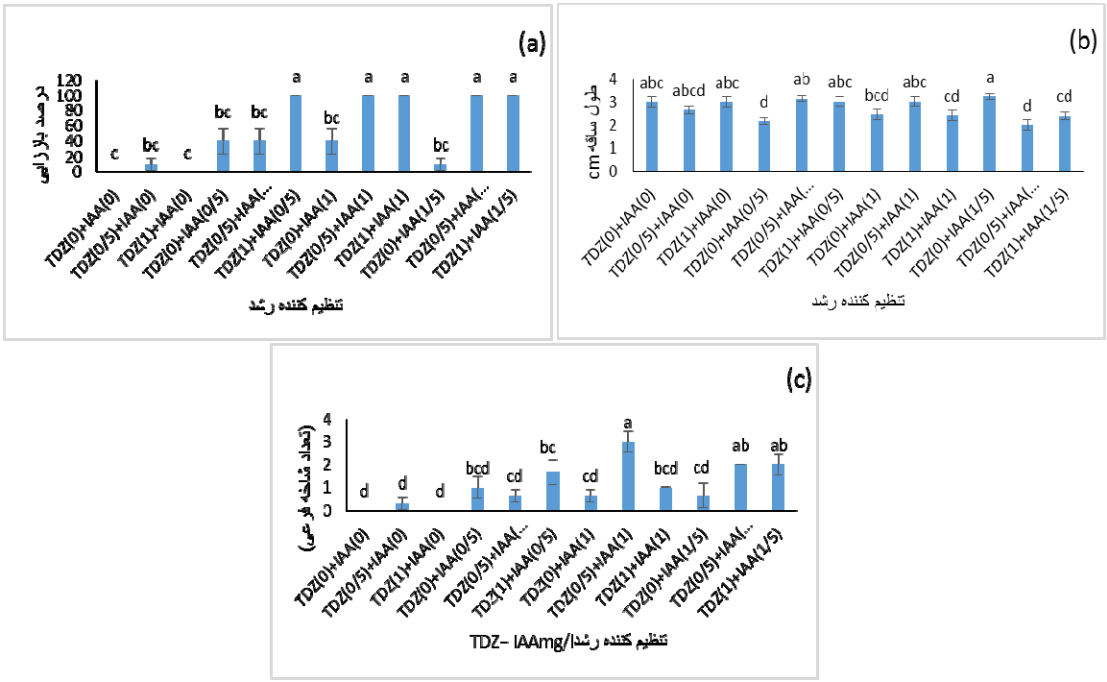
نمودار۱- تاثیر تنظیم کنندگان رشد گیاهی (BAP+IBA) بر درصد باززایی(a)، فاصله میانگره(b) و طول ساقه(c) گیاه زالزالک. مقادیر میانگین ۳ تکرار بوده و حروف نامشابه بیانگر اختلاف معنی دار می باشد($P\leq 0.05$).

در بررسی ترکیب دو تنظیم‌کننده IAA و TDZ ، ترکیب تیماری IAA(۰,۵) + TDZ(۱)، IAA(۱) + TDZ(۰,۵)، IAA(۱) +TDZ (۱) اگرچه IAA(۱,۵) + TDZ(۱) نسبت به سایر تیمارها منجر به‌عکس العمل بهتری ازلحاظ درصد باززایی و تعداد شاخه فرعی برخوردار بوده اما در سطح ۵ درصد با یکدیگر تفاوت معنی‌دار ندارند (نمودار c و ۲a). ترکیب تیمارهای مختلف TDZ و IAA در اکثر موارد ازلحاظ طول ساقه با یکدیگر مشابهت آماری در سطح ۵ درصد دارند (نمودار ۲b). در بررسی کنش متقابل TDZ و IBA، ترکیب تیماری IBA(۰,۵) + TDZ(۱) اگرچه بیشترین تأثیر را بر صفت تعداد گره داشته اما ازلحاظ آماری (۵٪) با تیمارهایی همچون TDZ(۰) + IBA(۱,۵) یا IBA(۰,۵) + TDZ(۰,۵) تفاوت ندارد (نمودار ۳a). همین روند در خصوص درصد باززایی و تعداد شاخه فرعی نیز مشاهده می‌گردد. در نمودارهای c و ۳b، تفاوت معنی‌دار بین دو تیمار IBA(۱,۵) + TDZ(۰) و IBA(۰,۵) + TDZ(۱) ازلحاظ درصد باززایی و تعداد شاخه فرعی در سطح احتمال ۵ درصد مشاهده نمی‌گردد.

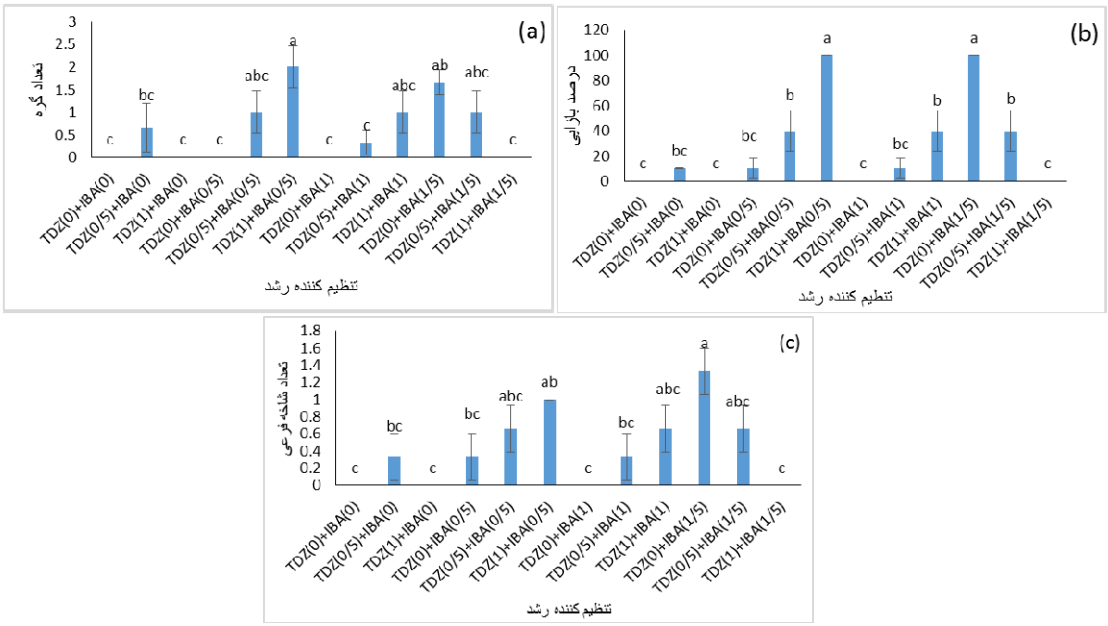
بررسی ریشه‌زایی بر روی محیط کشت MS : به‌منظور بررسی ریشه‌زایی نمونه‌ها، آزمایش‌هایی در حضور IBA و NAA انجام پذیرفت. کاربرد منفرد هر یک از این دو اکسین منجر به ریشه‌زایی نگردید که از ذکر جداول مربوطه خودداری می‌گردد. همانگونه که در جدول ۴ مشاهده می گردد، کنش متقابل بین این دو اکسین از تأثیر معنی داری در سطح احتمال ۱ درصد بر روی صفات درصد ریشه‌زایی، تعداد ریشه و طول ریشه برخوردار بوده است.

نتایج مقایسه میانگین داده های این آزمایش نشان داد که بیشترین درصد ریشه زایی و تعداد ریشه و طول ریشه مربوط به تیمار ۱,۵ میلی گرم برلیتر IBA و ۱,۵ میلی گرم بر لیتر NAA بود(نمودار ۴). تیمار های ترکیبی(۱) NAA + IBA(1) و (۰,۵) NAA + IBA(۰,۵) از لحاظ آماری مشابهت داشته و تأثیری بر صفات فوق نشان ندادند (نمودار ۴). بمنظور بررسی بیشتر ریشه‌زایی، ترکیبات مشابه (IBA+NAA) در محیط MS ۱/۲ نیز بکار رفته و

تأثیر آنها ارزیابی گردید. همانگونه که در جدول ۵ ذکر شده است، در محیط MS ۱/۲ نیز کنش متقابل بین دو اکسین IBA و NAA مهم بوده به نحوی که درصد ریشه-زایی را در سطح احتمال ۵ درصد تحت تأثیر خود قرار داده است.



نمودار۲- تاثیر تنظیم کنندگان رشد گیاهی (TDZ+IAA) بر درصد باززایی (a)، طول ساقه (b) و تعداد شاخه فرعی(c) گیاه زالزالک. مقادیر میانگین ۳ تکرار بوده و حروف نامشابه بیانگر اختلاف معنی دار می باشد($P\leq 0.05$).

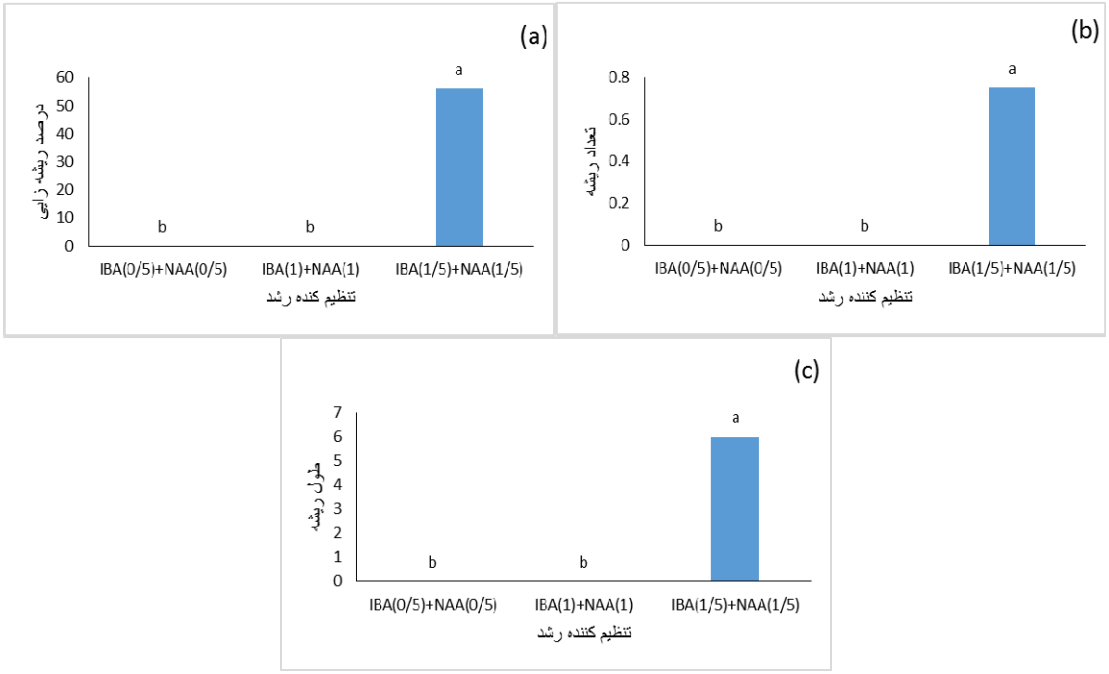


نمودار۳- تاثیر تنظیم کنندگان رشد گیاهی (TDZ+IBA) بر تعداد گره (a)، درصد باززایی (b) و تعداد شاخه فرعی(c) گیاه زالزالک. مقادیر، میانگین ۳ تکرار بوده و حروف نامشابه بیانگر اختلاف معنی دار می باشد($P\leq 0.05$).

جدول۵- نتایج تجزیه واریانس اثر متقابل IBA*NAA بر درصد ریشه زایی، تعداد ریشه و طول ریشه در کشت درون شیشه قطعات گره ساقه گیاه زالزالک در محیط MS

منابع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات		
		درصد ریشه‌زایی	تعداد ریشه	طول ریشه
IBA*NAA	۲	۴۲۱۸,۷ **	۰,۷۵ **	۴۸ **
خطا	۹	۴۶۸,۷۵	۰,۰۸۳	۶
کل	۱۱			

** معنی‌دار بودن در سطح ۵ درصد و ۱ درصد.



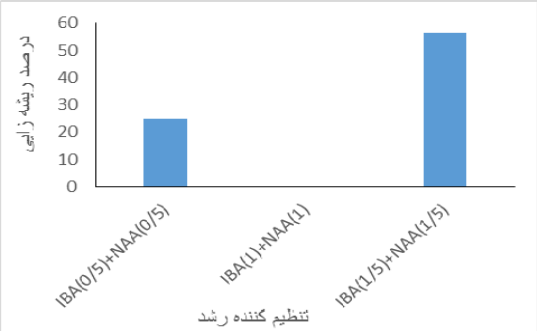
نمودار۴- تاثیر تنظیم کننده رشد گیاهی IBA+ NAA در محیط MS بر درصدریشه زایی (a)، تعداد ریشه (b) و طول ریشه(c) گیاه زالزالک.
مقادیر میانگین ۳ تکرار بوده و حروف نامشابه بیانگر اختلاف معنی دار می باشد($P\leq 0.05$).

جدول ۶- نتایج تجزیه واریانس اثر متقابل IBA*NAA بر درصد ریشه زایی، تعداد ریشه و طول ریشه در کشت درون شیشه قطعات گره ساقه گیاه زالزالک در محیط MS۱/۲

منابع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات		
		درصد ریشه زایی	تعداد ریشه	طول ریشه
IBA*NAA	۲	۳۱۷۷,۰۸ *	۳,۰۸ ns	۱۷,۶۴ ns
خطا	۹	۷۴۶,۵	۰,۸۳	۷,۱
کل	۱۱			

ns، * و ** به ترتیب نشان‌دهنده عدم معنی‌دار بودن، معنی‌دار بودن در سطح ۵ درصد و ۱ درصد.

صفات دیگر اعم از تعداد ریشه و طول ریشه تحت تأثیر نبوده اند. از نمودار ۵ می‌توان دریافت که تیمار (۱ و ۵) IBA(۱,۵) +NAA همانند محیط MS منجر به بیشترین میزان ریشه‌زایی شده و ترکیب IBA(۰,۵) + NAA (۰,۵) در رتبه دوم قرار دارد. در شکل ۱ مراحل مختلف کشت تک گره گیاه زالزالک و رشد و تکثیر و پرآوری گیاهچه-های زالزالک در محیطMS نشان داده شده است. این مراحل شامل کشت تک گره در محیط بدون تیمار و سپس پرآوری گیاهچه‌ها در بهترین محیط هورمونی حاوی BAP و IBA و پس از آن ریشه زایی گیاهچه های حاصل در محیط MS حاوی هورمونهای NAA و IBA و در نهایت مقاوم سازی گیاهچه های ریشه‌دار شده زالزلک در محیط گلخانه می باشد.



نمودار۵- تاثیر تنظیم کننده رشد گیاهی (IBA+NAA) در محیط MS ۱/۲ بر درصد ریشه زایی زالزالک. مقادیر میانگین ۳ تکرار بوده و حروف نامشابه بیانگر اختلاف معنی دار می باشد($P\leq 0.05$).

شکل ۱- کشت تک گره گیاه زالزالک در محیط MS در هفته اول در محیط بدون تیمار(a)، رشد تک گره‌ها در هفته دوم(b)، پرآوری با بهترین تیمار IBA و BAP (c,d)، پس ازیک ماه، ریشه‌زایی با تیمار NAA و IBA در محیط MS ۱/۲ (e) و مقاوم سازی در گلخانه (f).عجو

بحث

در پژوهش حاضر اثرات تنظیم کننده های مختلف رشد در محیط کشت MS بر روی تکثیرساقه و ریشه‌زایی گیاه زالزالک ارزیابی شدند. نتایج این پژوهش نشان داد که در آزمون اول باززایی محیط کشت‌های حاوی IBA به همراه مقادیر بیشتر BAP باعث افزایش میانگین طول ساقه و درصد باززایی شده است. در مطالعات مشابه در گیاهان دیگر غلظت‌های بالای BAP بهمراه NAA نیز سبب شاخه‌زایی فراوان شده است. در پژوهش Ahmadloo و همکاران در سال (۲۰۱۴) بر روی

C. pseudoheterophylla گزارش شد که در محیط MS حاوی ۸ میلی‌گرم در لیتر BAP و ۲ میلی‌گرم در لیتر NAA بیشترین میزان شاخه‌زایی و باززایی مشاهده شده است(۳). در پژوهشی دیگر که توسط Maharik و همکاران در سال (۲۰۰۹) بر روی *Crataegus sinaiea* انجام شد با استفاده از ترکیب ۵ میلی‌گرم در لیتر BAP و ۲ میلی‌گرم در لیتر NAA شاخه‌زایی را به حدود ۲۲ عدد رساندند و بیان کردند که غلظت بالای BAP ممکن است در ریزازدیادی برخی گونه‌های چوبی مشکلی ایجاد نکند(۱۴). در پژوهش Otroshi و همکاران بر روی *Capsicum annuum* L. بهترین رشد طولی شاخساره‌ها در محیط کشت MS حاوی ۳ میلی گرم در لیتر BAP و ۱ میلی گرم در لیتر IBA نشان داده شد(۱).در مطالعه‌ای Mahdavian و همکاران (۲۰۱۰) گزارش شد که عدم حضور BAP در محیط سبب عدم استقرار ریز نمونه می‌گردد و تعداد شاخه‌ها در محیط کشت حاوی سطوح بالای BAP نسبت به سطوح کم آن بطور معنی‌داری بیشتر است (۱۵).

در این پژوهش اکثر شاخه‌های جانبی تکثیرشده، در قسمت پایه ریز نمونه ایجاد شدند، در مطالعه مشابه توسط Muna و همکاران (۱۹۹۹) گزارش شده است که در حضور BAP شاخه‌زایی در پای شاخساره‌های cherry rootstock انجام می‌شود(۱۶). در تحقیقات Bassi و همکاران در سال ۱۹۹۱ گزارش شد نقش BAP در شکستن غالبیت انتهایی و تحریک رشد شاخساره های جدید می باشد(۴). بنابراین، با افزایش غلظت BAP در محیط، شاخه زایی افزایش می‌یابد که موید نتایج این پژوهش می‌باشد. در تحقیقی که در سال ۲۰۰۷ توسط Gokbunar و همکاران برروی کشت بافت زالزالک انجام شد، به این نتیجه دست یافتند که تعداد ساقه‌های حاصل از هر ریز نمونه بر روی محیط کشت با سطوح بالای BAP بطور معنی‌داری بالاتر از محیطی با سطوح پایین‌تر از BAP است(۱۰). نتایج پژوهش حاضر نشان داد که وجود BAP با غلظت ۳ میلی‌گرم بر لیتر باعث ایجاد بیشترین باززایی (۱۰۰٪) شد که با نتایج تحقیق Lapichino و همکاران و Nasو همکاران بر روی گیاه زالزالک مطابقت داشت (۱۳و۲۱).

باتوجه به آزمون دوم ریزازدیادی نتایج نشان‌دهنده این است که تغییر نوع اکسین تأثیر زیادی بر روی تعداد شاخه و میانگره و فاصله بین آنها داشته است و تائید می‌کند که استفاده از IBA نسبت به IAA تأثیر بیشتری بر باززایی داشته است. مقایسه نتایج آزمایش سوم با نتایج آزمایشات اول و دوم نشان می‌دهد که استفاده از اکسین (IAA) و سیتوکینین (TDZ) نسبت به آزمایش اول بر روی تعداد شاخه فرعی تأثیر بیشتری داشته است و در مقایسه با کل ترکیب‌های مختلف مورداستفاده، بیشترین تعداد شاخه در این آزمایش مشاهده شد ولی میانگین طول ساقه کمتر از زمانی بود که از دو تنظیم‌کننده رشد IBA و BAP استفاده شد. نتایج نشان داد که استفاده از IBA به همراه TDZ می‌تواند تاثیر مثبتی بر روی باززایی داشته باشد ولی همان‌طور که در آزمایش اول مشاهده شد، ترکیب IBA به همراه BAP نیز نتایج موثری در باززایی بهمراه داشت. در مطالعه‌ای توسط Lapichino و همکاران بر روی *C. monogyna*، بیشترین طول ساقه در غلظت ۱ میلی‌گرم بر لیتر از BA و ۰٫۵ میلی‌گرم بر لیتر از IBA در محیط کشت MS گزارش شد (۱۳). در تحقیق حاضر بیشترین میانگین طول ساقه (۳/۶۰ سانتی‌متر) در غلظت ۱ میلی‌گرم در لیتر IBA بهمراه ۳ میلی‌گرم در لیتر BAP حاصل شد. در یک نتیجه‌گیری کلی می‌توان بیان داشت که بیشترین طول ساقه در حضور BAP (۳ میلی‌گرم بر لیتر) بهمراه IBA (۱ میلی‌گرم بر لیتر) مشاهده گردید و استفاده از TDZ سبب تولید بیشترین شاخه فرعی شد.

در بررسی ریشه‌زایی جداکشت های گیاه *C. sinaica* که توسط Maharik و همکاران در محیط MS ۱/۲ و MS و در حضور IBA و IAA انجام گرفت مشاهده شد که در

غلظت ۱ میلی‌گرم بر لیتر IBA بالاترین میزان ریشه‌زایی اتفاق می‌افتد(۱۴).در مطالعه jokari و همکاران بر روی *Ziziphus* spp در مرحله ریشه‌زایی محیط کشت حاوی ۱۰ میلی‌گرم در لیتر IBA بهترین تیمار ریشه‌زایی برای کنار بنگالی بی هسته شناخته شد(۲). در پژوهش Ahmadloo مشخص شد که استفاده از IBA (۱ میلی‌گرم در لیتر) بهترین نتیجه را برای ریشه‌دار کردن زالزالک در محیط MS داشته است(3). در پژوهش حاضر بیشترین ریشه‌زایی در حضور ۱,۵ میلی‌گرم بر لیتر NAA و ۱,۵ میلی‌گرم بر لیتر IBA صورت گرفته است.

مقایسه نتایج این بررسی با نتایج بررسی‌های قبلی نشان می‌دهد که وجود تنظیم کننده‌IBA برای ریشه‌زایی در زالزالک ضروری است، بطوری‌که مطلوب‌ترین نتایج در حضور این تنظیم‌کننده رشد گیاهی اتفاق افتاده است. IBA بطورمعمول برای تحریک آغازش ریشه در کشت درون شیشه‌ای به سبب تأثیر بر توسعه سلولی، بزرگ شدن سلول‌ها و تقسیم بافت مورد استفاده قرار می‌گیرد. تمایز آغازین‌های ریشه بستگی به نوع و غلظت اکسین مورداستفاده دارد تا قادر باشد به علائم و سیگنال‌های ارگانوژنیک پاسخ دهند. درکل با استفاده از نتایج پژوهش حاضر می‌توان یک پروتکل ساده و مناسب جهت تکثیر پایه‌های مناسب زالزالک از سرشاخه‌های این گیاه در محیط درون شیشه‌ای معرفی کرد که نتایج آن می‌تواند در تولید پایه‌های مناسب و یکسان برای گیاهان به، ازگیل و گلابی کاربرد داشته باشد. بر طبق نتایج حاصل از این پژوهش مشخص شد با استفاده از سرشاخه‌های جوان گیاه زالزالک بر روی محیط کشت MS حاوی تنظیم کننده های رشدی مختلف می‌توان گیاهچه‌های مناسبی را در شرایط درون شیشه‌ای باززایی و ریشه‌دار نمود.

سپاسگزاری

نویسندگان مقاله از دانشگاه پیام نور اصفهان و پژوهشکده بیوتکنولوژی منطقه مرکزی کشور که ما را در این پژوهش یاری نمودند تشکر و قدردانی می‌کنند.

منابع

۱. اطرشی، م. مرادی، ک. ۱۳۹۳. بررسی کالوس زائی و اندام زائی غیرمستقیم گیاه فلفل‌دلمه‌ای (*Capsicum annuum L*.) در شرایط کشت درون شیشه ای. مجله پژوهش های گیاهی ۲۷. ۳: ۳۵۵-۳۴۶

۲. جوکاری، س .هدایت، م.۱۳۹۶. بررسی اثر تنظیم کننده های رشد بر باززایی چهار نوع کنار (*Ziziphus* spp.) در کشت درون شیشه ای . مجله پژوهش های گیاهی ۳۰. ۳: ۷۳۵-۷۵۱

3. Ahmadloo, f., Tabari Kouchaksaraei, m., Azadi, p., Hamidi, a., Beiramizadeh, e., 2014, Micropropagation of creataegus pseudoheterophylla POJARK Via *in vitro* calture, Jornal of Wood and Forest Science and Thechnology, 21:3, 1-24

4. Al- Manasrah, w.s., 2012, In vitro propagation of *Crataegus aronia* L. and secondary metabolites detection, Master Thesis, Palestine Polytechnic University, 44-45.

5. Arjmandi, a.a., Nazri, v., Ejtehadi, h., Joharchi, m.r., 2009, Review of the genus *Crataegus* in the north east of Iran, Rostaniha, 10:1, 1-12.

6. Bassi, g., Cossio, f., 1991, In vitro shoot regeneration on 'Bluefre' and 'Susina di Dro' prune cultivars (*Prunus domestica* L.), Acta Horticulturae Journal, 289: 81-82.

7. Bujarska, b., 2002, Breaking of seed dormancy, germination and seedling emergence of the common hawthorn (*Crataegus monogyna* Jacq.), Dendrobiology, 47: 61-70.

8. Caboni, e., Meneghini, m., Tonelli, m., 2010, Improved micropropagation of Azarole (*Crataegus azarolus* L.), Propagation of Ornamental Plants, 10:1. 9-13.

9. Donmez, a.a., 2004, The genus *Crataegus* L. (Rosaceae) with special reference to hybridization and biodiversity in Turkey, Turkish Journal of Botany, 28: 29-37.

10. Gokbunar, l., 2007, In vitro micropropagation of howthorn (*Crataegus* sp), University of Kahramanmaras Sutcu Imam Institute of Natural and Applied Sciences, Department of Horticulture (M.sc Thesis), 42.

11. Gough, r.e., 1996, Growing Trees and Shrubs from Seeds, MONTGUID Agriculture MT 9604, Montana state University, Montana, 24.

12. Khatamsaz, m., 1992, Flora of Iran: Rosaceae. Research Institute of Forests and Rangelands of Iran, 6: 241-267.

13. Lapichino, g., Airo. m., 2009, Multiplication of *crataegus monogyno* by in vitro culture of nodal segments, Acta Horticulturae Journal, 812: 135-140.

14. Maharik, n., Elgengaihi, s., Taha., h., 2009, In vitro mass propagation of the endangered sinai hawthorn crataegus sinaiea boiss, International Jornal of Academic Research, 1(1): 24-29.

15. Mahdavian, m., Bouzari, n., Abdollahi, h., 2010, Effects of culture media and growth regulators on proliferation and rooting of a vegetative mahaleb rootstock (SL-64), Seed Plant Improve Journal, 1: 1-26.

16. Martin, b., 1994, Tissue culture techniques, An Introduction Birkhauser Boston, 268.

17. Miguel, c.m., Druart, p., Oliveira m.m., 1996, Shoot regeneration from adventitious buds induced on juvenile and adult almond (*Prunus dulcis* Mill.) explants, In Vitro Cellular and Developmental Plant Biology, 32: 148-153.

18. Mirzadeh Vaghefi S.S. and Nasiri M.2012, The effects of physical and chemical factors on the seed germination of *Crataegus assadii*, journal of Plant Researches ,26:3,366-374.

19. Muna, a., Ahmad, a., Mahmoud, k., Abdul-Rahman, k., 1999, In vitro propagation of a semi-dwarfing cherry rootstock, Plant Cell, Tissu and Organ Culture, 59: 203-208.

20. Murashige, t., Skoog, f., 1962, A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures, Physiologia Plantarum, 15: 473-497.

21. Nas, m.n., Gokbunar, l., Sevgin, n., Aydemir, m., 2012, Micropropagation of mature crataegus aronia L., a medicinal and ornamental plant with rootstock potential for pome fruit, Plant Growth Regulation, 67:57–63.

22. Potter, d., Eriksson, t., Evans, r.c., Oh, S., Smedmork, j.e.e., Morgan, d.r., Kerr, m., Robertson, k.r., Arsenault, m., Dickinson, t.a., Campbell, c.s., 2007, Phylogeny and Classification of Rosaceae, Plant Systematics and Evolution, 266: 5-43.

23. Tyszkiewicz, s., 1949, Nasiennict wo less ne (The Forest Seeds), Instytut Badawczy Les'nictwa. 521p.

The determination of optimal condition for micro propagation of *Cratagus aronia* under *in vitro* culture

Motaghi M.[1], Razavizadeh R.[2], Mokhtari A.[3] and Otroshi M.[3]

[1] Dept. of Agriculture Biotechnology, Payame Noor University, Tehran, I.R. of Iran.

[2] Dept. of Biology, Payame Noor University, Tehran, I.R. of Iran.

[3] Dept. of Plant Tissue culture, Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran- Isfahan Branch, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Isfahan, I.R. of Iran.

Abstract

Crataegus Sp. (Rosaceae) has medicinal, ornamental and commercial utilizations but due to interspecific hybrization, apomixis and polyploidy, it has become one of the most difficult type of trees for botanists to propagate. To overcome this and to promote the process of controlled and mass production new technologies especially tissue culture can be used. Hence, this study was conducted for *in vitro* optimization of micropropagation of *Cataegus aronia* which includes shoot proliferation and rooting. Sampling was performed during spring. The samples were then disinfected and the explants were cultured on MS medium for initial establishment. The MS media was supplemented with concentrations of Indole acetic acid, Indole butric acid, Benzylaminopurine and Thidiazuranfor shoot proliferations and 1/2 MS or MS medium with concentrations of Indole butric acid and Naphthaleneacetic acid was used for rooting experiments. The results indicate that the best proliferation occurred on 3 mg/l Benzylaminopurine + 1 mg/l Indole butric acid and the 1/2 MS medium containing 3 mg/l Indole butric acid resulted in the highest percentage of rooting.

Key words: *Crataegus aronia*, micro propagation, tissue culture