

تعیین شرایط بهینه برای ریزازدیادی گیاه زالزالک (*Crataegus 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 پذیرش: ۹۶/۴/۱۳

تاریخ دریافت: ۹۴/۱۲/۳

چکیده

زالزالک از تیره گل سرخ (Rosaceae) و از جمله 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 تولیدمثل آپومیکیسی و پلی پلویدی 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. از این رو در این تحقیق مراحل مربوط به بهینه‌سازی ریز ازدیادی گونه *Crataegus aronia* شامل شاخه‌زایی و ریشه‌زایی در شرایط کشت درون شیشه‌ای مورد ارزیابی قرار گرفته است. نمونه‌برداری در فصل بهار انجام و سپس سترون‌سازی شدند. محیط کشت پایه (MS) جهت استقرار اولیه مورد استفاده قرار گرفت. آزمایش شاخه‌زایی در محیط کشت MS و غلظت‌های مختلفی از تنظیم‌کننده‌های رشد ایندول بوتیریک اسید، ایندول استیک اسید، بنزیل آمینو پورین و تیدیاورون 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 در تیمار 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.

واژه‌های کلیدی: زالزالک، ریز ازدیادی، کشت بافت

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

مقدمه

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).

زالزالک، کیالک و یا کوپج 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 کهگیلویه و بویراحمد و استان اصفهان به خصوص شهرستان

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

گونه *Crataegus aronia* در سراسر حوزه رویش زاگرس، اعم از جنگل‌های پیوسته و منفصل وجود دارد. همچنین از این گونه در کرمان نیز نام‌برده شده و به‌طور کلی این گونه 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 از نظر 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 در زمینه 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 در نتیجه 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 انجام گرفته 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 (۳ و ۱۰)، BAP (Benzylaminopurine) بعنوان بهترین تنظیم‌کننده رشد در مرحله شاخه‌زایی در محیط کشت MS معرفی شده است.

کشت سرشاخه‌های گونه *C. azarolus* در محیط کشت LP تغییر یافته و با تنظیم‌کننده‌های رشد BAP و فورکولورفنورون-۵- ایندول استیک اسید (CPPU) با ۳ غلظت (۰/۲، ۰/۴، ۰/۸) میلی‌گرم در لیتر انجام شد که بیش‌ترین شاخه‌زایی 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 (*Indole-3-butyric acid*) به مدت ۵ روز و سپس انتقال به محیط کشت بدون هورمون به دست آوردند (۶). در بررسی ریشه‌زایی *C. sinica Boiss* در محیط ۱/۲ MS و با تنظیم‌کننده‌های رشد IAA (*Indole-3-acetic acid*) 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 تک‌گره، 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 تک‌گره 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 تک‌گره) در شرایط درون‌شیشه می‌باشد که می‌تواند در احداث اصولی باغات با استفاده از پایه‌های همگن، مرغوب و عاری از ویروس و تولید تجاری و انبوه پایه مورد استفاده در احداث باغات بکار گیرد و بعنوان محصول اصلی یا گیاه‌پایه برای انجام

پیوند مورد استفاده 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 مورد نیاز 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 گرفته شده 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 هر کدام 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 دمایی 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) و پنی 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, TDZ (Thidiazuran) (۰/۵، ۱، ۱/۵) و BAP (۳، ۲، ۱، 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 واگشت 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 تجزیه و تحلیل 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

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 از لحاظ آماری بر روی صفت فاصله میانگره رخ نداده است. اثر متقابل بین BAP و IBA مبین تأثیر معنی‌دار ($p \leq 0.01$) بر روی طول ساقه، درصد باززایی و فاصله میانگره است (جدول ۱).

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

جدول ۱- نتایج تجزیه واریانس اثر سطوح مختلف IBA و BAP بر طول ساقه، تعداد شاخه 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 |
| BAP | ۳ | ۱,۶۴ ** | ۲,۴۴ ** | ۷۲۲۵ ** | ۴,۷۶ ** |
| IBA | ۲ | ۱,۵۸ ** | ۰,۷۷ ^{ns} | ۲۲۵ ^{ns} | ۰,۰۲ ^{ns} |
| BAP*IBA | ۶ | ۱,۴ ** | ۰,۷۷ ^{ns} | ۳۸۲۵ ** | ۱,۹۹ ^{ns} |
| خطا | ۲۴ | ۰,۱۶ | ۰,۵۸ | ۵۲۵ | ۱,۱۶ |
| کل | ۳۵ | | | | |

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

زمانی که به جای IAA از اکسین دیگر (IBA) استفاده شد، کنش متقابل تغییر کرده به نحوی که 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 + IBA (۰)، (۳) BAP + IBA (۱) و (۳) BAP + IBA (۰,۵) از لحاظ آماری با یکدیگر تفاوت معنی‌دار در سطح ۵ درصد نداشته اما نسبت به سایر تیمار بیشترین تأثیر را بر درصد باززایی داشته‌اند (نمودار ۱a). در نمودار ۱b، بیشترین فاصله میانگره در تیمار (۱) BAP + IBA (۰) مشاهده می‌شود. اگرچه این ترکیب تیماری در خصوص طول ساقه نیز ارجحیت داشته اما از لحاظ آماری

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 (جدول ۳).

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

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

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

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

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

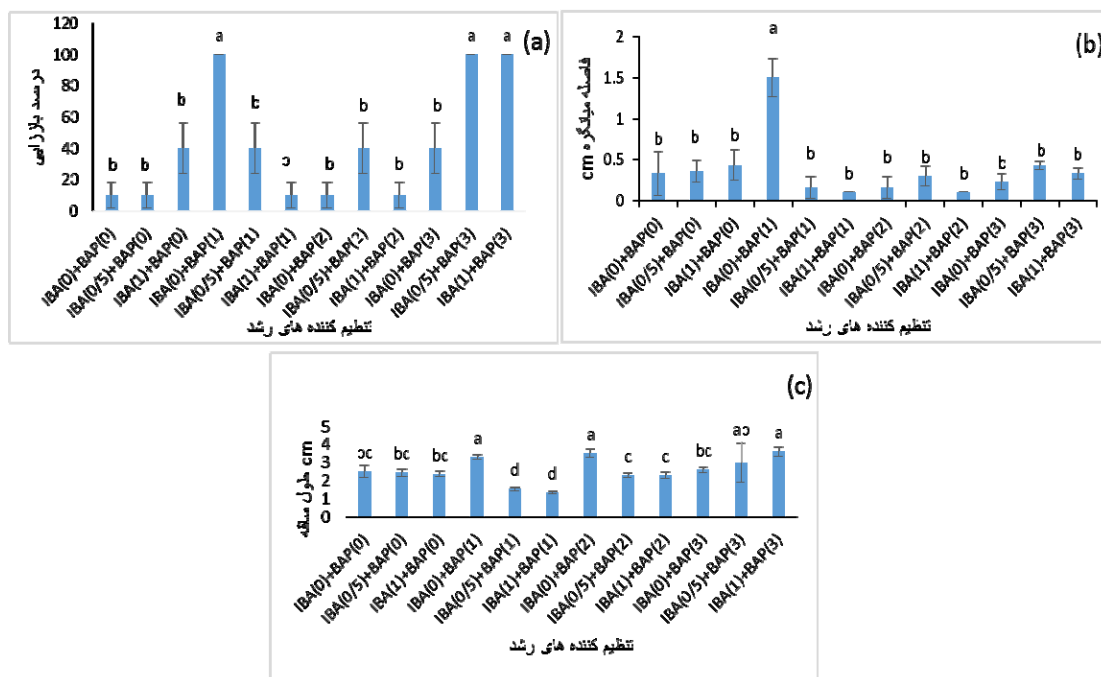
| فاصله میانگره | میانگین مربعات | | | | درجه آزادی | منابع تغییرات |
|---------------------|--------------------|---------------------|--------------------|----------------------|------------|---------------|
| | تعداد گره | درصد باززایی | تعداد شاخه فرعی | طول ساقه | | |
| ۰,۱۲ ^{**} | ۶,۳۲ ^{**} |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

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

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

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

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



نمودار ۱- 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 ($P \leq 0.05$).

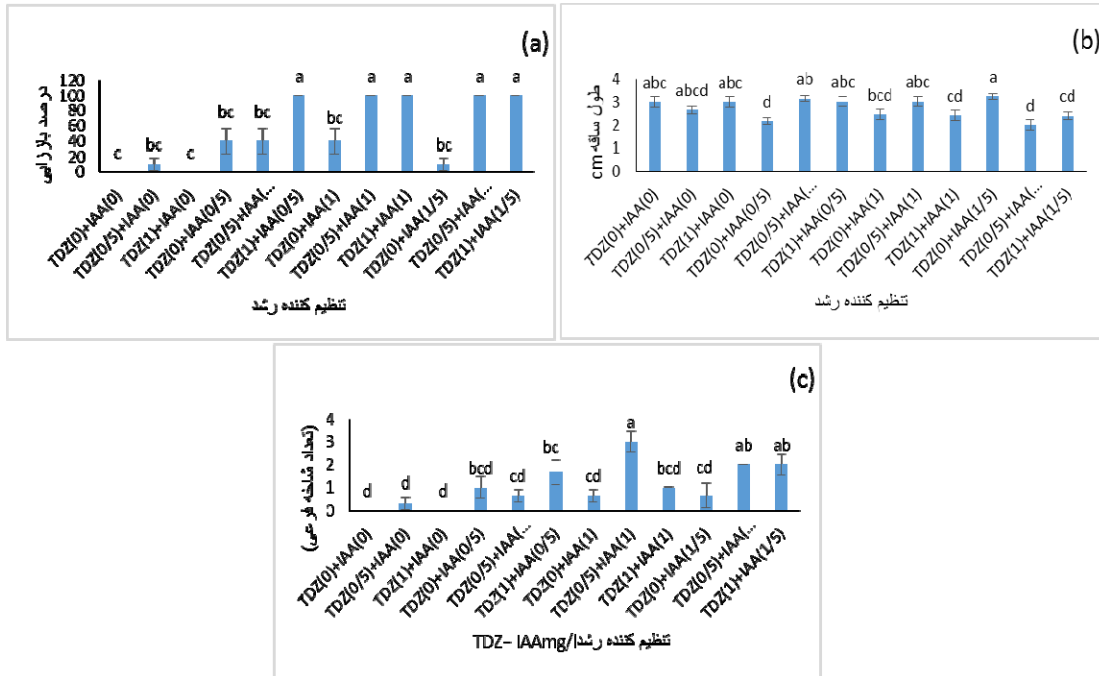
بررسی ریشه‌زایی بر روی محیط کشت MS : به‌منظور بررسی ریشه‌زایی نمونه‌ها، آزمایش‌هایی در حضور IBA و NAA انجام پذیرفت. کاربرد منفرد هر یک از این دو اکسین منجر به ریشه‌زایی نگردید که از ذکر جداول مربوطه خودداری می‌گردد. همانگونه که در جدول ۴ مشاهده می‌گردد، کنش متقابل بین این دو اکسین از تأثیر معنی داری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

نتایج مقایسه میانگین داده‌های این آزمایش نشان داد که بیشترین درصد ریشه‌زایی و تعداد ریشه و طول ریشه مربوط به تیمار ۱٫۵ میلی گرم برلیتر IBA و ۱٫۵ میلی گرم برلیتر NAA بود (نمودار ۴). تیمارهای ترکیبی (۱) NAA + IBA(۱) 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 ۱/۲ MS نیز بکار رفته و

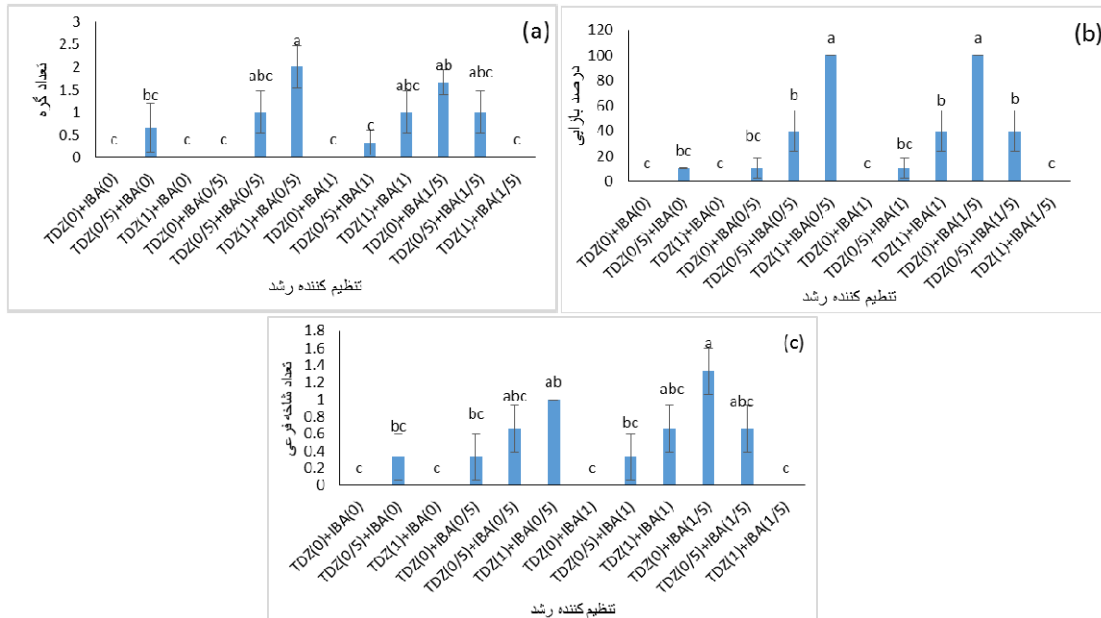
در بررسی ترکیب دو تنظیم‌کننده IAA و TDZ، ترکیب تیماری (۱) TDZ + IAA(۰٫۵)، (۰٫۵) TDZ + IAA(۱)، (۱) TDZ + IAA(۱٫۵) اگرچه نسبت به سایر تیمارها منجر به عکس‌العمل بهتری از لحاظ درصد باززایی و تعداد شاخه فرعی برخوردار بوده اما در سطح ۵ درصد با یکدیگر تفاوت معنی‌دار ندارند (نمودار ۲c و ۲a). ترکیب تیمارهای مختلف TDZ و IAA در اکثر موارد از لحاظ طول ساقه با یکدیگر مشابهت آماری در سطح ۵ درصد دارند (نمودار ۲b). در بررسی کنش متقابل TDZ و IBA، ترکیب تیماری (۱) TDZ + IBA(۰٫۵) اگرچه بیشترین تأثیر را بر صفت تعداد گره داشته اما از لحاظ آماری (۰٫۵٪) با تیمارهایی همچون (۰) TDZ + IBA(۱٫۵) یا (۰٫۵) TDZ + IBA(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 (۰) TDZ + IBA(۱٫۵) و (۱) TDZ + IBA(۰٫۵) از لحاظ درصد باززایی و تعداد شاخه فرعی در سطح احتمال ۵ درصد مشاهده نمی‌گردد.

زایی را در سطح احتمال ۵ درصد تحت تأثیر خود قرار داده است.

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-



نمودار ۲- تأثیر 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 ($P \leq 0.05$).

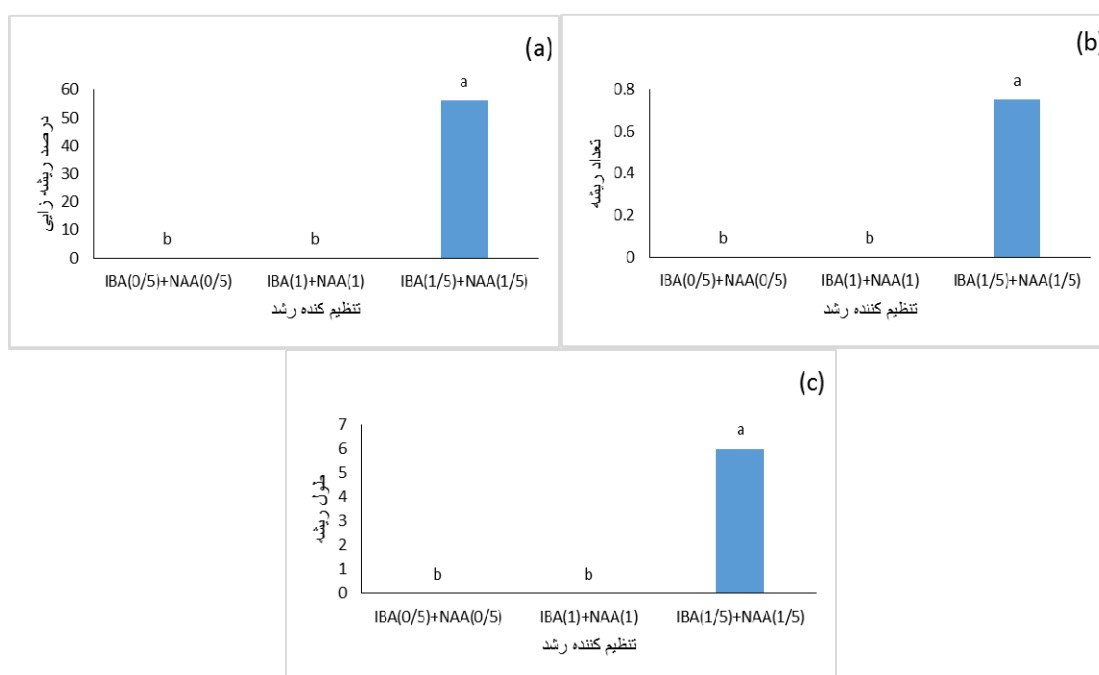


نمودار ۳- تأثیر تنظیم کنندگان رشد گیاهی (TDZ+IBA) بر تعداد گره (a)، درصد باززایی (b) و تعداد شاخه فرعی (c) گیاه زالزالک. مقادیر، میانگین ۳ تکرار بوده و حروف نامشابه بیانگر اختلاف معنی دار می باشد ($P \leq 0.05$).

جدول ۵- نتایج تجزیه واریانس اثر متقابل IBA*NAA بر درصد ریشه زایی، تعداد ریشه و طول ریشه در کشت درون شیشه قطعات گره ساقه گیاه زالرالک در محیط MS

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

** معنی دار بودن در سطح ۵ درصد و ۱ درصد.

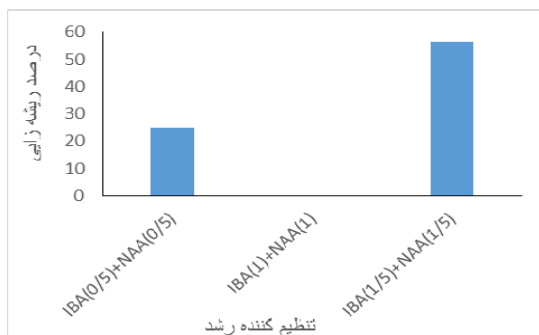


نمودار ۴- تاثیر تنظیم کننده رشد گیاهی IBA+ NAA در محیط MS بر درصد ریشه زایی (a)، تعداد ریشه (b) و طول ریشه (c) گیاه زالرالک. مقادیر میانگین ۳ تکرار بوده و حروف نامشابه بیانگر اختلاف معنی دار می باشد ($P \leq 0.05$).

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 زالرالک در محیط MS ۱/۲

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

ns و ** به ترتیب نشان دهنده عدم معنی دار بودن، معنی دار بودن در سطح ۵ درصد و ۱ درصد.



نمودار ۵- 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 ($P \leq 0.05$).

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 تک‌گره گیاه زالزالک و رشد و تکثیر و پرآوری گیاهچه-های زالزالک در محیط MS نشان داده شده است. این مراحل شامل کشت تک‌گره در محیط بدون تیمار و سپس پرآوری گیاهچه‌ها در بهترین محیط هورمونی حاوی BAP و IBA و پس از آن ریشه‌زایی گیاهچه‌های حاصل در محیط MS حاوی هورمونهای IBA و NAA و در نهایت مقاوم سازی گیاهچه‌های ریشه‌دار شده زالزالک در محیط گلخانه می‌باشد.



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

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

بحث

در پژوهش حاضر اثرات تنظیم کننده‌های مختلف رشد در محیط کشت MS بر روی تکثیر ساقه و ریشه‌زایی گیاه زالزالک ارزیابی شدند. نتایج این پژوهش نشان داد که در آزمون اول باززایی محیط کشت‌های حاوی IBA به همراه

با غلظت ۳ میلی‌گرم بر لیتر باعث ایجاد بیشترین باززایی (۱۰۰٪) شد که با نتایج تحقیق Lapichino و همکاران و Nas و همکاران بر روی گیاه زالزالک مطابقت داشت (۲۱ و ۱۳).

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 تأیید 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 مورد استفاده، 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 تأثیر مثبتی بر روی باززایی داشته باشد ولی همان‌طور که در آزمایش اول مشاهده شد، ترکیب IBA به همراه BAP نیز نتایج موثری در باززایی به همراه 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 به همراه 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) به همراه IBA (۱ میلی‌گرم بر لیتر) مشاهده گردید و استفاده از TDZ سبب تولید بیشترین شاخه فرعی شد.

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

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 annum L.* بهترین رشد طولی شاخساره‌ها در محیط کشت MS حاوی ۳ میلی‌گرم در لیتر BAP و ۱ میلی‌گرم 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 شاخساره‌های جدید می‌باشد (۴). بنابراین، با افزایش غلظت BAP در محیط، شاخه‌زایی افزایش می‌یابد که موید نتایج این پژوهش می‌باشد. در تحقیقی که در سال ۲۰۰۷ توسط Gokbunar و همکاران بر روی 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

آغازین‌های ریشه بستگی به نوع و غلظت اکسین مورد استفاده 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 بازرایی 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.

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 (۳). 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 کننده IBA برای ریشه‌زایی در زالزالک ضروری است، بطوری‌که مطلوب‌ترین نتایج در حضور این تنظیم‌کننده رشد گیاهی اتفاق افتاده است. IBA بطور معمول 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

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 بازرایی چهار نوع کنار (*Ziziphus spp.*) در کشت درون شیشه ای. مجله پژوهش های گیاهی ۳۰: ۳: ۷۵۱-۷۳۵
3. Ahmadloo, f., Tabari Kouchaksaraei, m., Azadi, p., Hamidi, a., Beiramizadeh, e., 2014, Micropropagation of *Crataegus pseudoheterophylla* POJARK Via *in vitro* culture, *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., Ejtehad, 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.), *Dendrobology*, 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 hawthorn (*Crataegus* sp), University of Kahramanmaraş 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 Journal 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, Nasiennictwo lessne (The Forest Seeds), Instytut Badawczy Les'nictwa. 521p.

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

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

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

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

³Dept. 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 hybridization, 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 *Crataegus 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 Thidiazuran for 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