مقاله پژوهشی

مجله سلول و بافت (علمی - پژوهشی)
جلد ۱۱، شماره ۳، پاییز ۱۳۹۹

تاثیر تنظیم‌کننده‌های رشد در کالوس‌زایی و باززایی گیاه زینتی زامی‌فولیا

ابراهیم بیرامیزاده [۱و۲]، علی آرمینیان Ph.D.*[۲]، آرش فاضلی Ph.D.[۲]

۱- گروه ژنتیک و بهنژادی، پژوهشکده گل و گیاهان زینتی،
موسسه تحقیقات علوم باغبانی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، محلات، ایران.
۲- دانشگاه ایلام، دانشکده کشاورزی، گروه زراعت و اصلاح نباتات، ایلام، ایران

* پست الکترونیک نویسنده مسئول:a.arminian@ilam.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۲/۷ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۹/۱۷

چکیده

هدف: هدف از این تحقیق، دسترسی به پروتکل تکثیر سریع و بهینه و زامی‌فولیا با کشت بافت می‌باشد.

مواد و روش‌ها: برای کالوس‌زایی و باززایی، دو آزمایش به‌صورت فاکتوریل بر پایه طرح کاملا تصادفی با ۳ تکرار در آزمایشگاه کشت بافت پژوهشکده ملی گل و گیاهان زینتی درسال ۱۳۹۷ انجام شد. در آزمایش اول جهت کالوس‌زایی فاکتورهای 2, 4-D (۰، ۱ ، ۲ و ۴ میلی‌گرم بر لیتر) و BA (۰، ۱ و ۲ میلی‌گرم بر لیتر) اعمال شد. در آزمایش دوم یا باززایی ریزنمونه‌ها، فاکتور NAA (۰و ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر) و BA (۰، ۰/۵ و ۱ میلی‌گرم بر لیتر) اعمال شد.

نتایج: نتایج کالوس‌زایی نشان داد که محیط MS تغییریافته با غلظت ۲ میلی‌گرم بر لیتر BA و یک میلی‌گرم برلیتر 2, 4-D بهترین کالوس را با ۸۵ درصد باززایی تولید نمود. در مرحله باززایی نیز غلظت ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر BA همراه با ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر NAA بیش‌ترین تعداد گیاهچه و غده (۹۰ درصد) را تولید نمود. سپس، تک گیاه‌چه‌های غده‌دار با موفقیت۹۰-۸۰ درصد در بستر کوکوپیت و پرلیت سازگار شدند.

نتیجه‌گیری: نتایج موفقیت‌آمیز بوده و می‌توان با فرمول‌هایی حاصله، کار کالوس‌زایی و باززایی زامی‌فولیا را انجام و به‌عنوان پروتکلی کاربردی جهت تکثیر تجاری این گیاه زینتی ارزش‌مند، پیشنهاد نمود.

واژگان کلیدی: اکسین، سیتوکینین، پرآوری، ریشه‌زایی، قطعات برگ

مقدمه

در طی قرن گذشته به‌دلیل گسترش اطلاعات بشر از فرایندهای بیولوژیکی و به‌کارگیری این اطلاعات در برنامه‌های به‌نژادی، افزایش زیادی در تولید اکثر گیاهان حاصل شده است. گل‌های زیبا و جذاب امروزی حاصل تلاش و شکیبایی به‌نژادگرانی است که از گذشته‌های دور به گزینش و دورگ‌گیری در میان گل‌ها و گیاهان زینتی پرداخته‌اند. هم‌چنین در فعالیت‌های مذکور تولید گیاهان متحمل به آفات، بیماری‌ها و تنش‌های محیطی مورد نظر بوده است. به‌نحوی که ضرورت به‌کارگیری روش‌های نوین ازقبیل کشت بافت‌های گیاهی برای حل بعضی از این موانع مطرح شده است. با استفاده از این روش می‌توان اقدام به تولید انبوه ژنوتیپ‌های یکسان و یا معرفی ژنوتیپ‌های جدید از طریق تنوع سوماکلونال نمود (۱).

خانواده Araceae یکی از خانواده‌های بزرگ و قدیمی گیاهان تک‌لپه است که به‌دلیل دارا بودن ویژگی‌های مورفولوژیکی جالب مثل کوچک‌ترین آنژیوسپرم به‌عنوان یکی از بزرگ‌ترین ساختارهای گیاهی و تولیدمثلی جهان مورد توجه قرار گرفته است. این خانواده شامل ۳۸۰۰ جنس در ۱۱۸ گونه هستند که در نواحی گرمسیری پراکنده هستند ولی در سایر مناطق با گستره دمایی مختلف نیز دیده می‌شوند. این گیاهان در شرایط اکولوژیکی مختلف از ارتفاع ۳۰۰۰ متری سطح دریا تا حالت شناور در آب یا غیرشناور و شرایط هوازی، به‌صورت بالارونده و یا زمینی رشد می‌نمایند. ساقه‌های این گیاهان می‌توانند به‌شکل ریزوم، غده و غیره دیده شوند. گیاهان این خانواده به‌دلیل داشتن کریستال‌های متنوع اگزالات کلسیم، دارا بودن اسپادیکس کوچک، گل‌های تک‌جنسی ودوجنسی، محافظت توسط اسپات و سلول‌های فاقد روغن‌های اتری از سایر خانواده‌ها متمایز هستند (۲). گیاه زامی‌فولیا با نام علمی *Zamioculcos zamiifolia* گیاهی چندساله، بومی آفریقای شرقی از خانواده آراسه می‌باشد که در مناطق جنگلی حاره‌ای و مرطوب با زمین‌های سخت رشد می‌کند. این گیاه دارای برگ‌های بزرگ و ساده و ریزوم‌های ضخیم افقی (با تشکیل غده) بوده و برگ‌های داخلی آن توانایی رشد در شرایط نور پایین را دارند. این گیاه به‌شدت تحمل بالایی به استرس خشکی و بیماری‌ها و آفات دارد. گیاهی است همیشه سبز، کندرشد با برگ‌های نسبتا باریک سبز براق و تیره به‌طول ۷ تا ۱۵سانتی‌متر گل‌های کوچک زردروشن متمایل به قهوه‌ای یا برنزی به‌طول ۵ تا ۷ سانتی‌متر، ارتفاع ۴۵ تا ۶۰ سانتی‌متر، ساقه زیرزمینی ضخیم و آب‌دار که معمولا در فصل تابستان تا اوایل پاییز رشد می‌کنند. متداول‌ترین راه تکثیر این گیاه از طریق تکثیر ریزوم و قلمه برگ می‌باشد که این روش‌ها بسیار زمان‌بر و طولانی بوده، لذا تهیه پروتکل تکثیر از طریق کشت بافت می‌تواند افزایش عمل‌کرد و کاهش هزینه تولید را به‌دنبال داشته باشد.

جهت ریزازدیادی گیاه زامی‌فولیا از نمونه اولیه برگ در محیط کشت MS (۳) حاوی ۲۰ میلی‌گرم بر لیتر بنزیل آدنین (6-BA) و ۰/۰۲ میلی‌گرم بر لیتر آلفا نفتالین استیک اسید (NAA) جهت ساقه‌زایی استفاده شده که نتایج مفید و قابل توجهی به‌همراه داشته است. هم‌چنین بنا به گزارشات، ریشه‌زایی ساقه‌ها نیز در محیط حاوی ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر اندول ۳ بوتریک اسید (IBA) انجام شده است (۴). جهت کالوس‌زایی گیاه زامی‌فولیا از بافت کاس‌برگ و برگ‌چه در محیط MS ۱/۲ به‌همراه ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر میواینوزیتول، ۰/۲ میلی‌گرم بر لیتر بنزیل آدنین BA، ۴ میلی‌گرم بر لیتر 2,4-D (۲و۴-دی‌کلروفنوکسی‌استیک اسید)، ۲۰ گرم‌برلیتر ساکارز و ۳ گرم‌برلیتر آگار استفاده گزدیده است. کشت‌ها پس از ۴/۵ هفته به محیط ساقه‌زایی شامل محیط MS ۱/۲ به‌همراه ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر میواینوزیتول، ۱ میلی‌گرم بر لیتر BA، ۴۰ گرم بر لیتر ساکارز و ۳ گرم بر لیتر آگار منتقل شده است (۵). در آزمایش دیگری اثر نوع و جهت ریزنمونه‌ها در واکنش به هورمون‌های رشد گیاهی در ریزازدیادی گیاه زامی‌فولیا صورت گرفته و نتایج نشان داده که بهترین پاسخ به هورمون و تولید گیاهچه در کالوس‌های دارای جنین در محیط حاوی هورمون 2, 4-D صورت گرفته است (۶).

هم‌چنین باکتی و همکاران (۷) در کشت درون شیشه‌ای گیاه آگلونما، از جوانه‌های جانبی اولیه و برگ‌های جوان در محیط کشت MS با مقدار مختلف تنظیم‌کننده‌های رشد (BA و 2, 4-D) در غلظت‌های ppm ۵، ۱۰، ۱۵، ۲۰ استفاده کردند. اگرچه کشت درون‌شیشه‌ای آگلونما می‌تواند نتایج خوبی داشته باشد ولی در چنین آزمایشاتی ساقه یا کالوس تشکیل نشده است (۷). بنا به‌گزارشی، در کشت درون شیشه‌ای قطعات ساقه با جوانه‌های جانبی آگلونما درغلظت‌های مختلف 6-BA برای تولید ساقه نیز استفاده شده و نتایج آن نشان داده که غلظت‌های پایین BA (۱/۵ میلی‌گرم بر لیتر) مناسب بوده و تیمار محیط MS همراه ۰/۱– ۰/۰۵ میلی‌گرم بر لیتر NAA و ۲/۵ میلی‌گرم

بر لیتر BA برای تکثیر جوانه‌ها با ضریب تکثیر ۴/۱ در هر ماه مناسب بوده است. ریشه‌زایی گیاه‌چه‌ها در محیط MS ۱/۲ با ۰/۵-۰/۲ میلی‌گرم بر لیتر NAA به‌صورت نرمال انجام شده است (۸).

دیر و همکاران (۹) نیز اثر ترکیب و غلظت‌های مختلف تنظیم‌کننده‌های رشد بر روی شاخه‌زایی ریزنمونه‌های نوک شاخه *S. cannifolium* در محیط کشت MS را بررسی نموده و مشخص نمودند که شاخه‌زایی به‌شدت تحت تاثیر نوع و غلظت سیتوکینین قرار داشته و محیط کشت حاوی ۳-۱ میلی‌گرم برلیتر BA باعث بیش‌ترین شاخه‌زایی می‌شود. در همین گزارش، وقتی اکسین همراه با سیتوکنین به محیط کشت اضافه شد، تعداد شاخه‌های تولید شده در هر ریزنمونه افزایش یافت. بیش‌ترین تعداد شاخه نیز در محیط کشت حاوی ۳ میلی‌گرم بر لیتر BA و ۱ میلی‌گرم بر لیتر IBA به‌دست آمد. بنا به‌همین گزارش، از غلظت‌های مختلف MS و ساکارز برای تحریک شاخه‌زایی استفاده شده و مشاهده شد که غلظت کامل MS و ۳۰ گرم بر لیتر ساکارز برای کشت نوک شاخه *S. cannifolium* مناسب بوده است (۹).

چان و همکاران (۱۰) نیز در یک تحقیق برروی گونه‌های گیاهی زینتی از خانواده Araceae (خانواده زامی‌فولیا)، به‌نامهای *Alocasia sanderina*, *Colocasia antiquorum*, *Gonatanthus pumilus*, *Syngonium podophylum*. در محیط کشت MS، تاثیر تنظیم-کننده‌های رشدی BA (غلظت ۲ میلی‌گرم بر لیتر) و IBA (۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر) را در القای شاخساره و ریشه‌زایی این گونه‌ها بررسی نموده و به‌خوبی تا مرحله بلوغ و سازگاری با محیط ادامه داده و به نتایج مثبتی درخصوص تکثیر برخی از گونه‌های این خانواده دست یافتند.

مواد و روش‌ها

تهیه مواد گیاهی: در این تحقیق، برای انجام آزمایشات کشت بافت، قطعات برگی گیاه زینتی زامی‌فولیا مورد استفاده قرار گرفته و کلیه مراحل آزمایش در آزمایشگاه کشت بافت پژوهشکده ملی گل و گیاهان زینتی محلات در سال ۱۳۹۷ انجام گرفت (شکل ۱).

شکل ۱: نمونه گیاهی زامی‌فولیا

ضدعفونی مواد گیاهی: ابتدا برگ‌های سالم از بوته بالغ برداشت شده و به آزمایشگاه منتقل شدند. سپس برای نفوذ بیش‌تر مواد ضدعفونی‌کننده برگ‌ها به قطعات حدود ۲×۲ سانتی‌متری تقسیم شده و در محلول آب و مایع ظرفشویی به‌مدت ۳۰ دقیقه غوطه‌ور شد. سپس نمونه‌های برگی به‌مدت ۳۰ ثانیه در الکل ۷۰ درصد قرار گرفته و بعد از شست‌وشو با آب مقطر به‌ظرف حاوی هیپوکلریت ۱ درصد (w/v) به‌همراه Tween 20 به‌مدت ۲۰ دقیقه منتقل شدند. در ادامه، شست‌وشو در سه مرحله (۵، ۱۰، ۱۵ دقیقه) در زیر دستگاه لامینار انجام شد. قطعات برگی استریل شده در زیر لامینار به قطعات ۱×۱ سانتی‌متری حاوی رگ‌برگ اصلی تقسیم و پس از حذف حاشیه‌ها در ظروف حاوی محیط کشت، کشت شدند.

طراحی آزمایش و محیط کشت بافت: این تحقیق در قالب دو آزمایش مستقل به‌صورت فاکتوریل بر پایه طرح کاملا تصادفی با ۳ تکرار در آزمایشگاه کشت بافت انجام گرفت. در آزمایش اول به‌منظور القای کالوس‌زایی فاکتورهای آزمایشی شامل تنظیم‌کننده رشد 2, 4-D با ۴ سطح (۰، ۱ ، ۲ و ۴ میلی‌گرم بر لیتر) و BA در سه سطح (۰، ۱ و ۲ میلی‌گرم بر لیتر) مورد بررسی قرار گرفتند. در آزمایش دوم، به‌منظور باززایی ریزنمونه‌ها، فاکتورهای آزمایشی NAA با دو سطح (۰و ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر) و BA با سه سطح (۰، ۰/۵ و ۱ میلی‌گرم بر لیتر) مورد بررسی قرار گرفتند. در هر شیشه تعداد ۴ ریزنمونه کشت شد. محیط کشت پایه مورد استفاده در این آزمایش MS تغییر یافته (ماکرو) بود. مقدار ۳۰ گرم بر لیتر ساکارز به‌همراه ۷ گرم بر لیتر آگار نیز به محیط کشت اضافه شد. هم‌چنین pH محیط کشت با استفاده از NaOH یک نرمال برروی عدد ۵/۷ تنظیم شد. به‌منظور توزیع یکنواخت محیط کشت، ظروف شیشه‌ای قبل از توزیع به‌مدت یک دقیقه داخل اتوکلاو و در دمای حدود ۱۱۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد تا آگار آن‌ها به‌خوبی حل شود. پس از خروج از اتوکلاو، ارلن حاوی محیط کشت برروی هات‌پلیت هم‌زده شد تا یکنواخت شد. سپس به‌میزان ۳۰ تا ۴۰ میلی‌لیتر محیط کشت در هر ظرف شیشه‌ای توزیع شد. ظروف شیشه‌ای پس از بستن درب به‌مدت ۲۰ دقیقه در اتوکلاو (دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد و فشار ۱/۲ اتمسفر) استریل شد. جهت جلوگیری از خطای احتمالی در طی مراحل اتوکلاو محیط‌های کشت به‌مدت ۱۰-۷ روز در اتاق تاریک با شرایط دمایی معمولی نگه‌داری شدند تا در صورت بروز آلودگی حذف شدند.

استقرار مواد گیاهی: ریزنمونه‌های ضدعفونی شده برگ در زیر لامینار به‌چندین قطعه ۱×۱ سانتی‌متری تقسیم و هر قطعه حاوی رگ‌برگ اصلی برروی محیط کشت قرار گرفت. سپس ظروف حاوی ریز نمونه به اتاق رشد منتقل و در شرایط تاریکی نگه‌داری شدند. هر هفته به‌طور مستمر کشت‌ها کنترل شده و در صورت مشاهده آلودگی روی محیط کشت حذف شدند. دو ماه بعد از کشت با ظهور کالوس-های مناسب، واکشت مجدد نمونه‌ها به قفسه‌های نوری منتقل شدند تا در صورت مناسب بودن باززایی انجام شود.

شرایط اتاق رشد: پس از آماده‌سازی و کشت ریزنمونه‌ها، کلیه ظروف حاوی قطعات برگی به اتاق رشد با دمای ۲۴ درجه سانتی‌گراد در شرایط تاریکی نگه‌داری شدند. ظروف حاوی کالوس در همان اتاق رشد با شدت نور حدود ۲۵۰۰ لوکس که توسط لامپ‌های فلورسنت تامین می‌شد نگه‌داری شد.

شاخص‌های مورد ارزیابی: بعد از گذشت یک ماه و به‌دنبال ظهور کالوس‌ها، صفاتی ازجمله درصد کالوس‌زایی و حجم کالوس با استفاده از روش استاندارد هوکر و نی‌برز (۱۱) ارزیابی شده و ۲ ماه بعد از انتقال به شرایط نوری و ظهور گیاه‌چه، صفات درصد تولید گیاه‌چه، تعداد گیاه‌چه و برگ، تعداد غده کامل و رشد ریشه (برای باززایی از کالوس) یادداشت‌برداری شد (شکل ۲).

آزمایش باززایی کالوس‌ها: کالوس‌ها پس از ظهور و رسیدن به‌حجم یک سانتی‌متری از نظر اندازه و کیفیت، جهت باززایی و تولید گیاه (اندام زایی) به محیط کشت جدید یا MS تغییر یافته همراه با NAA (۰، ۰/۵ و ۱ میلی‌گرم بر لیتر) و BA (۰، ۰/۵ و ۱ میلی‌گرم بر لیتر) منتقل شد. ساکارز مورد استفاده ۳۰ گرم بر لیتر و pH محیط برروی ۵/۷ تنظیم شد. کلیه محیط‌های این مرحله نیز در ظروف شیشه‌ای ۲۵۰ سی‌سی تهیه شد و مقدار ۷ گرم بر لیتر آگار مورد استفاده قرار گرفت. صفاتی که در این مرحله یادداشت‌برداری شدند شامل درصد تولید گیاه‌چه، تعداد برگ، تعداد غده کامل و رشد ریشه بود.

آنالیز آماری

محاسبات آماری داده‌های حاصل از آزمایش با استفاده از نرم افزارهای SPSS v.25 و R انجام شد و برای رسم نمودارها و گراف‌ها از برنامه Excel استفاده شد. مقایسات میانگین تیمارها نیز با آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح ۱درصد انجام شد.

نتایج

آزمایش کالوس‌زایی

نتایج تجزیه واریانس نشان داد که اثرات اصلی غلظت‌های مختلف هورمون 2, 4-D و BA و هم‌چنین اثرات متقابل آن‌ها بر درصد، و حجم کالوس(زایی) اثر معنی‌داری ($p\leq ۰/۰۵$) داشت (جدول ۱).

جدول ۱: تجزیه واریانس غلظت‌های مختلف تنظیم‌کننده‌های رشد 2, 4-D و BA بر کالوس‌زایی زامی‌فولیا

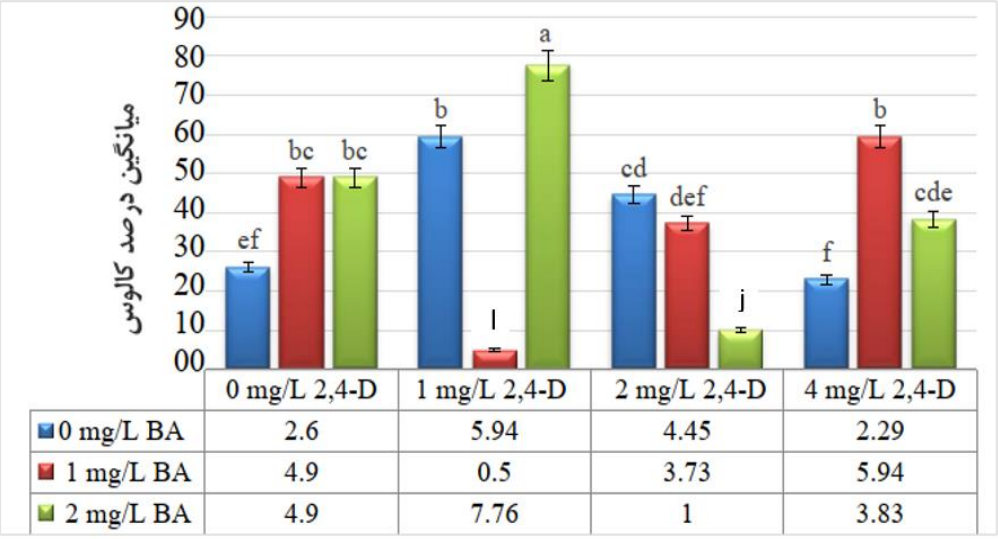
منابع تغییر	درجه آزادی	میانگین مربعات	
		درصد کالوس	حجم کالوس
2,4-D	۳	۱۸/۰۱**	۰/۳۶**
BA	۲	۱۲/۸۲**	۰/۱۲*
2,4-D×BA	۶	۵/۷۰**	۰/۳۶**
خطا	۲۴	۰/۸۲	۰/۰۳۶
ضریب تغییرات(٪)		۱۹/۵۶	۱۳/۸۱

* و ** به‌ترتیب معنی‌دار در سطوح ۵ و ۱ درصد

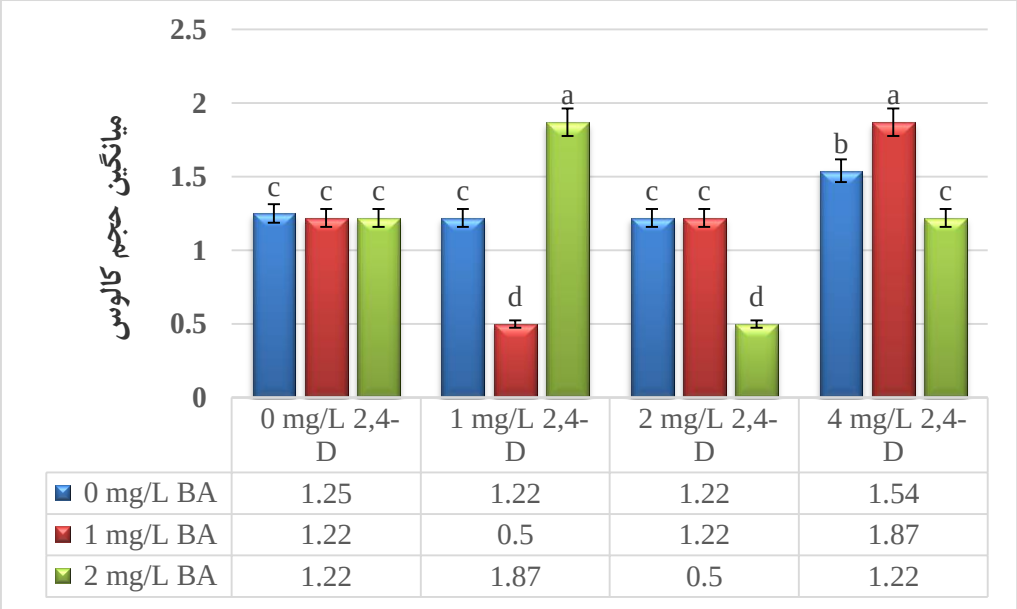
مقایسه میانگین اثر اصلی 2, 4-D به‌روش آزمون چند دامنه‌ای دانکن برای درصد کالوس‌زایی نشان داد که بیش‌ترین درصد کالوس در غلظت ۱ میلی‌گرم بر لیتر و کم‌ترین درصد کالوس در غلظت ۴ میلی‌گرم بر لیتر 2, 4-D به‌دست آمد (شکل ۲). نتایج مقایسه میانگین اثرات اصلی هورمون 2, 4-D بر حجم کالوس نیز نشان داد که بیش‌ترین میزان این صفت در غلظت ۱ میلی‌گرم بر لیتر 2, 4-D به‌دست آمد (شکل ۳). نتایج سایر تحقیقات انجام گرفته نیز نقش موثر 2, 4-D بر کالوس‌زایی را تائید نموده و با نتایج به‌دست آمده در این تحقیق هم‌خوانی دارد (شکل ۲، ۳). مقایسه میانگین اثرات اصلی BA بر درصد کالوس‌زایی نشان داد که بیش‌ترین درصد کالوس‌زایی در غلظت ۲ میلی‌گرم بر لیتر هورمون BA و کم‌ترین درصد آن در غلظت صفر (شاهد) 2, 4-D به‌دست آمده است (شکل ۳).

نتایج مقایسه اثرات متقابل 2, 4-D و BA بر درصد کالوس، حجم کالوس به‌روش آزمون چنددامنه‌ای دانکن نشان داد که مصرف هم‌زمان یک میلی‌گرم بر لیتر 2, 4-D و ۲ میلی‌گرم بر لیتر BA بهترین نتیجه و بیش‌ترین درصد کالوس را تولید نموده و مصرف هم‌زمان یک میلی‌گرم بر لیتر از هرکدام از این دو هورمون، کم‌ترین درصد تولید کالوس را درپی داشت (شکل ۲). هم‌چنین عدم مصرف 2, 4-D و

مصرف یک میلی‌گرم بر لیتر BA و هم‌چنین یک میلی‌گرم بر لیتر 2, 4-D و ۲ میلی‌گرم بر لیتر BA اثرات یکسان و مطلوبی را بر درصد حجم کالوس تولیدی نشان داده (شکل ۳) که با نتایج حاصله از تحقیقات صورت گرفته دیگر (۵) مطابقت داشت.



شکل۲: اثر سطوح مختلف 2, 4-D و BA بر درصد کالوس‌زایی در زامی‌فولیا



شکل ۳: اثر سطوح مختلف 2, 4-D و BA بر حجم کالوس در زامی‌فولیا

آزمایش باززایی نتایج نشان داد که غلظت‌های مختلف NAA و BA بر درصد تولید و تعداد صفات گیاهچه و برگ، تعداد غده کامل و رشد ریشه اثر معنی‌داری در سطح ۵ و ۱ درصد داشته است (جدول ۲).

جدول ۲: تجزیه واریانس غلظت های مختلف NAA و BA در باززایی زامی‌فولیا

منابع تغییر	درجه آزادی	میانگین مربعات			
		درصد تولید گیاهچه	تعداد برگ	تعداد غده کامل	رشد ریشه
NAA	۱	۲۳/۰۳**	۰/۸۷**	۰/۴۶**	۰/۶۵**

BA	۲	۲۱/۸۵**	۰/۲۶**	۰/۳۸**	۰/۲۱**
NAA*BA	۲	۴/۴۶**	۰/۲۸**	۰/۴۶**	۰/۱۱*
Error	۱۳	۰/۸۶	۰/۰۴	۰/۰۲	۰/۰۲
CV (٪)		۱۷/۴۸	۱۳/۶۲	۱۰/۰۹	۱۰/۶۲

* و ** به ترتیب معنی دار در سطوح ۵ و ۱ درصد

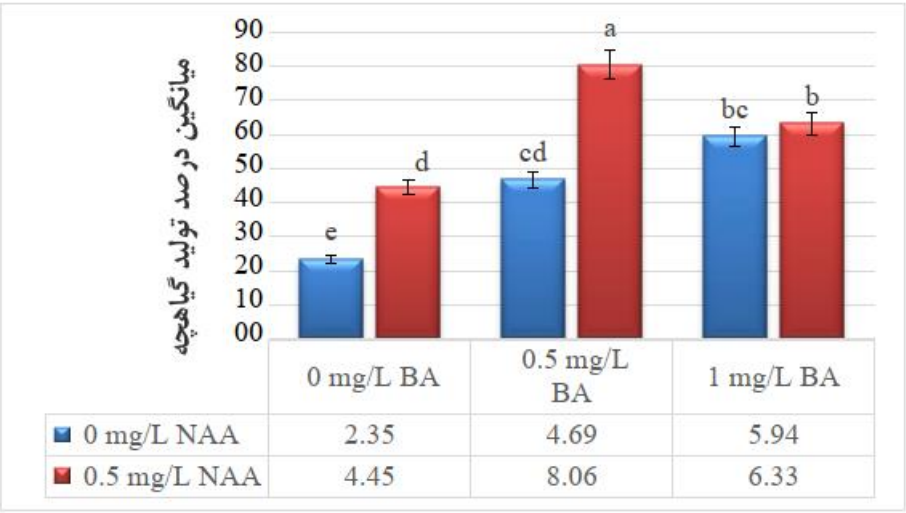
نتایج نشان داد که بیش‌ترین درصد تولید و تعداد گیاه‌چه و برگ، تعداد غده کامل و میزان رشد ریشه با کاربرد ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر NAA و کم‌ترین درصد این صفات در غلظت صفر میلی‌گرم بر لیتر NAA (شاهد) به‌دست آمد (جدول ۳). هم‌چنین نتایج مقایسه میانگین اثرات اصلی BA به‌روش آزمون دانکن نشان داد که بیش‌ترین درصد تولید گیاه‌چه، تعداد گیاه‌چه و برگ، تعداد غده کامل و رشد ریشه در غلظت ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر BA و کم‌ترین مقدار این صفات در غلظت صفر میلی‌گرم بر لیتر BA (شاهد) به‌دست آمد (جدول ۳).

جدول ۳: مقایسه میانگین غلظت‌های مختلف NAA و BA در باززایی زامی‌فولیا

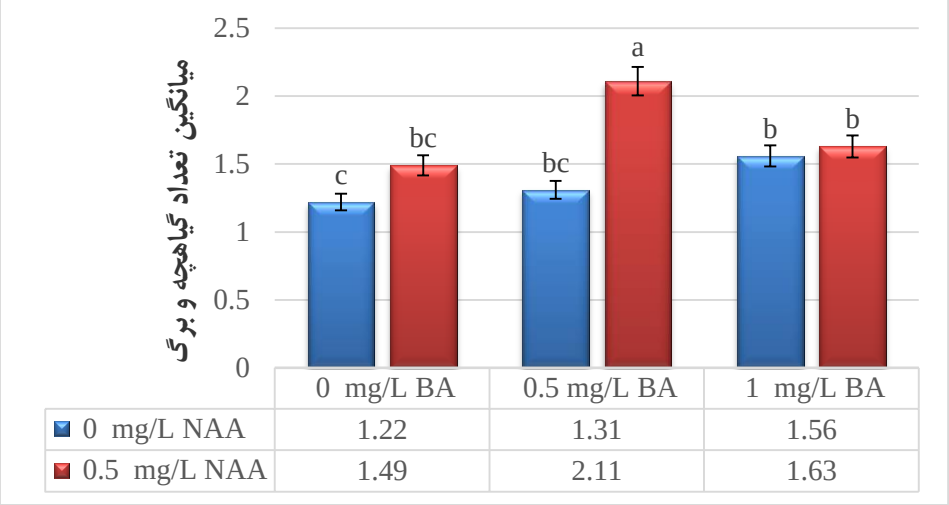
فاکتور/تنظیم‌کننده رشد	سطوح فاکتورها (mg/L)	درصد تولید گیاهچه	تعداد برگ	تعداد غده کامل	رشد ریشه
NAA	صفر	۴/۳۲b	۱/۳۶b	۱/۲۵b	۱/۲۵b
	۰/۵	۶/۲۸a	۱/۷۴a	۱/۵۲a	۱/۵۸a
BA	۰/۰	۳/۴۰b	۱/۱۳b	۱/۲۲b	۱/۲۶b
	۰/۵	۶/۳۷a	۲/۶۳a	۱/۶۳a	۱/۵۹a
	۱/۰	۶/۱۰a	۱/۸۸b	۱/۳۱b	۱/۳۹b

میانگین‌های دارای حروف مشابه از نظر آماری، تفاوت غیرمعنی‌دار دارند.

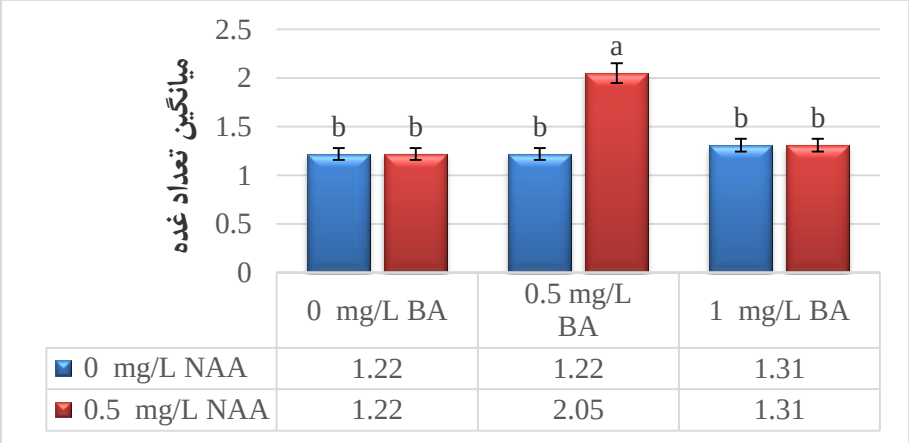
مقایسه میانگین اثرات متقابلNAA و BA بر درصد تولید گیاه‌چه، تعدادگیاه‌چه و برگ، تعداد غده کامل و رشد ریشه به‌روش دانکن انجام شد و نشان داد که مصرف هم‌زمان ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر NAA و ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر BA بهترین نتیجه و بیش‌ترین درصد تولید گیاه‌چه، تعدادگیاه‌چه و برگ، تعداد غده کامل و رشد ریشه را درپی داشت (شکل‌های ۴، ۵، ۶ و ۷). نتایج این تحقیق با نتایج به‌دست آمده توسط هپینگ و پنگ (۴) مطابقت داشت. هم‌چنین غده‌ها در محیط باززایی، ریشه‌زایی نموده و لذا نیازی به تیمار ریشه‌زایی نبود و گیاه‌چه-ها به‌راحتی مراحل سازگاری را طی نمودند (شکل ۸).



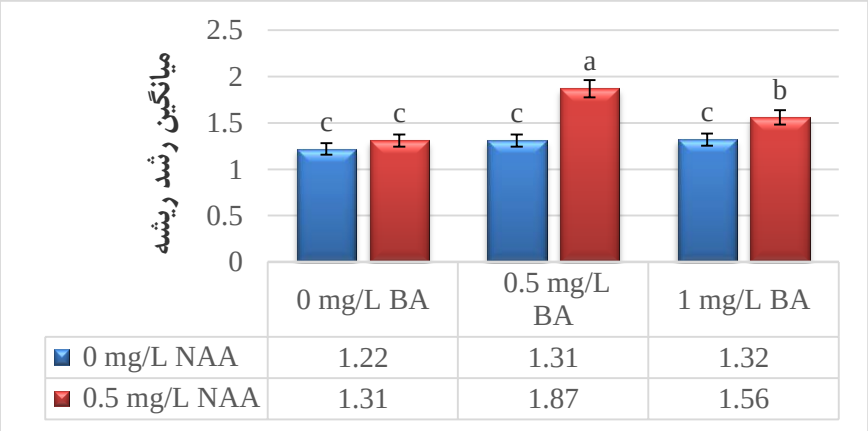
شکل ۴: مقایسه درصد تولید گیاه‌چه در زامی‌فولیا تحت اثرات سطوح مختلف BA و NAA



شکل ۵: مقایسه تعداد گیاه‌چه و برگ در زامی‌فولیا تحت اثرات مختلف سطوح BA و NAA



شکل ۶: مقایسه تعداد غده در زامی‌فولیا تحت اثرات مختلف سطوح BA و NAA



شکل ۷: مقایسه رشد ریشه در زامی‌فولیا تحت اثرات مختلف سطوح BA و NAA

شکل ۸: مراحل کالوس زایی و باززایی و سازگاری گیاه زامی فولیا

بحث

کالوس‌زایی

همان‌طور که ذکر شد گیاه زامی‌فولیا از گیاهان زینتی نسبتا جدید و ارزش‌مند است که به‌دلیل کند رشدی و محدود بودن زمان تکثیر گل‌خانه‌ای، ازدیاد این گیاه از طریق روش‌های مرسوم با مشکلات زیادی همراه است. طولانی شدن فرآیند تکثیر، سبب افزایش چشم‌گیر قیمت این گیاه شده است. قسمت‌های تکثیری همانند برگ‌چه‌ها و قطعات برگی و یا محور برگ آن فقط یک شاخ‌ساره در هر واحد تکثیری (propagule) را در روش‌های مرسوم ازدیاد این گیاه، تولید می‌کنند. پرآوری این گیاه با استفاده از تکنیک کشت بافت، یک روش سریع جهت دست‌یابی به تعداد انبوه گیاه با ساختار ژنتیکی یکسان است. تکثیر با استفاده از کشت بافت منجر به کاهش هزینه تولید و حذف بیماری‌ها در زمان کوتاه می‌شد. تولید کالوس در روش کشت بافت اهمیت زیادی دارد و در تکثیر گیاه زامی‌فولیا یکی از مهم‌ترین مراحل ریز ازدیادی محسوب می‌شد. ریز نمونه‌های برگ و دم‌برگ گیاه زامی‌فولیا در محیط MS ۱/۲ کشت شده و مشخص شد که تنظیم‌کننده‌های رشد BA (۰/۲ میلی‌گرم بر لیتر) و 2, 4-D(میلی‌گرم بر لیتر) مناسب‌ترین سطوح هورمونی برای مرحله کالوس‌زایی بود (۵). در این رابطه، پاپافاتیون و مارتینی (۶) در مطالعه ریز ازدیادی زامی‌فولیا از محیط کشت MS و تنظیم‌کننده‌های BA و 2, 4-D برای کالوس‌زایی استفاده کردند که باعث تولید سلول‌های شبیه‌جنین رویشی شد که سپس منتج به باززایی شد. آن‌ها هم‌چنین از ترکیب BA وNAA برای باززایی استفاده نمودند که باعث تولید ریشه‌های غده‌ای شده است و کلیه نتایج حاصل از کالوس‌زایی و باززایی این آزمایش در نتایج حاصل از تحقیق این مقاله نیز تایید شد. هم‌چنین در این رابطه در تحقیقی دیگر به نقش و تاثیر هورمون‌هایی همانند 2, 4-D، BAA و NAA اشاره شده، بطوریکه وانیزه‌کانتون و لئون‌هارت (۵) با اعمال هورمون‌های 2, 4-D و BA در باززایی زامی‌فولیا نتیجه گرفتند که پروتوکل آن‌ها جهت باززایی این گیاه زینتی مفید بوده و می‌توان گیاهان زامی‌فولیای تتراپلوئید را در شرایط درون شیشه به‌دست آورد. البته موضوع دیگری که بایستی به‌آن توجه نمود این‌که تاکنون تحقیقی در رابطه با جهت و موقعیت ریزنمونه‌های برگچه زامی‌فولیا

در تکثیر درون شیشه این گیاه مشاهده نشد. هم‌چنین نکته مهمی که بایستی خاطر نشان ساخت توجه به نسبت هورمون‌های ریشه‌زایی یعنی اکسین به ساقه‌زایی یعنی سیتوکینین در آزمایشات کالوس‌زایی و باززایی مهم است. در تحقیق حاضر نسبت بالای سیتوکینین به اکسین منجر به تولید نوساقه (شاخساره) شده و هم‌چنین نسبت بالای اکسین به سیتوکینین، منجر به تولید ریشه‌چه شد (۱/۸۷ به ۱/۳۱ در شکل ۷). البته سطوح یکسان این دو هورمون، باعث افزایش تشکیل کالوس می‌شد. به‌طوری‌که در شکل ۴ افزایش مقدار اکسین (NAA) از صفر به ۰/۵ میلی‌گرم، منجر به افزایش مقدار تولید گیاهچه از ۲/۳۵ به ۴/۴۵ درصد شد. هم‌چنین در همین جدول افزایش میزان اکسین از صفر به ۰/۵ به‌همراه افزایش سیتوکینین از صفر به ۰/۵ منجر به بیش‌ترین درصد تولید گیاه‌چه (۸/۰۶) شد. لذا نتیجه گرفته می‌شود که نه‌تنها افزایش فیتوهورمون اکسین بلکه افزایش سیتوکینین نیز برای تولید گیاه‌چه ضرورت دارد. در این رابطه اذعان شده که آزمایش‌های کلاسیک کشت بافت گیاهی نشان داده است که در معرض قرار گرفتن کشت سلول به نسبت بالای اکسین به سیتوکینین، باعث تشکیل ریشه می‌شود و نسبت اکسین به سیتوکینین پایین نیز منجر به بازسازی شاخه‌ها می‌شود. در تحقیقی که توسط صیادی‌نژادی و صادقی (۱۲) برروی زامی‌فولیا صورت گرفت مشاهده شد که بیش‌تری میزان یا درصد کالوس‌زایی، کوتاه‌ترین زمان به کالوس رفتن و بیش‌ترین وزن کالوس در محیط کشتی به‌دست آمد که شامل ۲ میلی‌گرم بر لیتر AB و یک میلی‌گرم بر لیتر AAN نمونه‌های برگی به‌دست آمد که تا حدودی نتایج حاضر را تایید می‌کند. هرچند در آن آزمایش غلظت‌های هورمونی بیش‌تری اعمال شده است.

البته میزان بالای اکسین نیز سمیت را به‌همراه دارد. همان‌طور که به‌میان آمد، با افزایش میزان اکسین در برخی موارد، همانند افزایش از یک به ۲ میلی‌گرم در لیتر برای 2, 4-D، درصد و حجم کالوس‌زایی نیز کاهش معنی‌داری پیدا نمود. شاید این نتیجه را به سمیت یا اثرات منفی کالوس به مقادیر زیادتر اکسین نسبت داد. هم‌چنین میزان بالاتر اکسین از نوع 2, 4-D منجر به موتاسیون یا جهش می‌شد. دراین خصوص گزارش شده است که کاربرد مقادیر بالای اکسین، مستقیما باعث ممانعت از رشد ساقه‌چه‌ها شده به‌طوری‌که چنین غلظت‌هایی جریانات سیتوپلاسمی را مختل نموده و در حدی هست که چنین موادی سمیت داشته باشند (۱۳). ازآن‌جا که سطح اکسین در بافت‌های مریستم شاخ‌ساره بسیار بالا است، مشخص نیست که چگونه نسبت اکسین کم به سیتوکینین باعث تولید مجدد شاخساره‌ها می‌شود (۱۴). همین گزارش می‌افزاید که افزایش و توزیع اکسین به‌جای کم، توسط سایتوکینین تحریک می‌شود و اکسین یا اکسین برون‌زا که مستقیما استفاده می‌شود، برای بازسازی شاخه‌ها ضروری است. البته بنا به‌همین گزارش، گزارش شده که سیتوکینین‌ها تمایز سلولی را در منطقه انتقال مریستم ریشه القا می‌کنند.

باززایی

همان‌طور که اشاره شد، در این تحقیق در محیط باززایی از کالوس، ریشه و گیاه‌چه تولید شد که این موضوع در مقایسه با نتایج محققین دیگر که یک مرحله برای تولید شاخساره و یک مرحله مجزا برای تولید ریشه استفاده می‌کردند، باعث کاهش زمان و افزایش کیفیت و کمیت گیاه تولیدی شده و هزینه تولید را کاهش می‌دهد. در کل در این تحقیق، در سطح صفر از سیتوکینین BA، افزودن اکسین NAA از صفر به ۰/۵ میلی‌گرم‌درلیتر، منجر به افزایش تولید گیاهچه شد ولی بیش از آن تاثیر چندانی را بر افزایش گیاه‌چه نداشت. هم‌چنین افزایش BA از ۰/۵ به یک میلی‌گرم در لیتر باعث کاهش درصد گیاه‌چه و تعداد برگ و تعداد غده و رشد ریشه شد. در این خصوص، گزارش شده که با به‌کار بردن یک گرم در لیتر کینتین و ۰/۱ گرم در لیتر NAA باعث افزایش تولید ریشه در کشت بافت زامی‌فولیا شد هرچند در بعضی موارد، اضافه نمودن اکسین، سبب تسریع رشد گیاه‌چه می‌شد. به‌علاوه این‌که اکسین‌ها مسئول القای غده و ریشه هستند (۱۵). براساس همین گزارش، NAA اثر محرک بر تشکیل ریشه داشته و به‌نظر می‌رسد که به‌تنهایی باعث ممانعت از تشکیل شاخساره شود. البته دلیل افزایش طول ریشه‌چه نسبت به افزایش سیتوکینین از نوع کینتین هنوز ناشناخته باقی مانده است.

همان‌طور که گفته شد، در آزمایش باززایی، به‌استثنای اعمال NAA و BA در افزایش رشد ریشه که در سطح شاهد BA، تفاوتی بین به‌کار بردن سطوح صفر و ۰/۵ از NAA نبود، افزایش BA از ۰/۵ به یک میلی‌گرم، منجر به افزایش رشد ریشه شد. لذا به‌نظر می‌رسد که افزایش دوز هر کدام از این هورمون‌ها همانند محرکی عمل نموده ولی این افزایش رشد ریشه در سطح ۰/۵ از هورمون BA بیش‌تر بوده و احتمالا افزایش بیش‌تر سیتوکینین BA از ۰/۵ به یک اثر ممانعت کنندگی بر تاثیر NAA داشته و رشد کم‌تری را درپی داشته است. لذا

بای در به‌کار بردن این فیتوهورمون‌ها، به نسبت دقیق آن‌ها جهت نتیجه بهتر، دست یافت. در مورد میانگین تولید گیاه‌چه و برگ و غده نیز اعمال بیش از ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر از سیتوکینی BA باعث افزایش این صفات نبود که احتمالا به برهمکنش این دو هورمون برمی‌شد. البته همانند بحث کالوس‌زایی، در این‌جا یعنی در بحث باززایی نیز چنین اثرات متقابلی مشاهده شد که مشابه با این، گزارش شده است که اصطلاح "ممانعت‌کننده رقابتی" در مورد ترکیبات کشت بافت وجود داشته و به‌عنوان نمونه برخی از اسیدهای آمینه در غلظت‌های نسبتا کم ممانعت‌کننده رشدی بوده و این پدیده به‌ویژه زمانی مشاهده می‌شود که ترکیبی از دو یا چند اسیدآمینه به محیط کشت افزوده شوند که در این‌جا اثر ممانعت‌کنندگی، به‌دلیل اثرات رقابتی یک ترکیب با دیگری رخ می‌دهد. حتی اثر متقابل بور با اکسین نیز در ریشه‌زایی قلمه‌ها مشاهده شده است (۱۶). همچنین لتهام (۱۷) مشاهده نمود که میواینوزیتول با سیتوکینین در جهت القای تقسیم سلولی ریزنمونه‌های آوندی هویج برهمکنش داشتند.

نتیجه‌گیری/

از آن‌جایی‌که اساس همه آزمایش‌های انتقال ژن (۱۸) و اصلاح درون شیشه‌ای و اصلاح به‌روش جهش، و حتی تولید بذور مصنوعی (۱۹) تحقیقات بر روی کشت بافت گیاهان می‌باشد، هم‌چنین با توجه به این‌که تکثیر گیاه زامی‌فولیا به‌صورت قلمه‌ای و تقسیم ریزوم زمان‌بر بوده و صرفه اقتصادی ندارد، لذا تکنیک کشت بافت در تکثیر این گیاه مهم زینتی، اهمیت زیادی داشته و نه‌تنها به‌منظور تکثیر تجاری، بلکه به‌منظور تهیه مواد اولیه برای آزمایش‌های انتقال ژن و اصلاح درون شیشه‌ای و اصلاح به‌روش پرتوتابی نیز به‌کار گرفته می‌شود. لذا در تحقیق حاضر کالوس‌زایی و باززایی این گیاه زینتی مورد بررسی قرار گرفت. هم‌چنین از آن‌جایی‌که فیتوهورمون‌هایی ازجمله اکسین و سیتوکینین در کنترل فرایندهای مختلف و اساسی گیاه همانند رشد، نمو و تنظیم پاسخ به محرک‌های محیطی نقش کاربردی دارند، روشن شده است که هر کدام از این هورمون‌ها قادرند با تنظیم سطوح دیگر بر فرآیندهایی همانند اندام‌زایی تاثیرگذار باشند، لذا این تحقیق با هدف بررسی تاثیر این فیتوهورمون‌ها، انجام گرفت. نتایج آزمایش کالوس‌زایی نشان داد که محیط پایه MS تغییر یافته همراه با غلظت ۲ میلی‌گرم بر لیتر BA به‌همراه یک میلی‌گرم بر لیتر 2, 4-D قادر است بهترین کالوس با خاصیت باززایی بالا را در برداشته باشد. در مرحله باززایی از کالوس نیز، غلظت ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر NAA بیش‌ترین تعداد گیاهچه و غده باززایی شده را تولید نمود.

تشکر و قدردانی

نویسندگان برخود لازم می‌دانند که از پژوهشکده ملی گل و گیاهان زینتی محلات بابت اجرای این پروژه قدردانی نمایند.

منابع

1. Krishna H, Alizadeh M, Sigh D, Singh U, et al. Somaclonal variations and their applications in horticultural crops improvement. Biotech.2016; 6(54): 1-18.

2. Henriquez CL, Arias T, Pires JC, Croat TB, et al. Phylogenomics of the plant family Araceae. Mol Phyl Evol. 2014; 75(1): 91-102.

3. Murashinge T, Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiolia Plantarum. 1962; 15(3): 473-497.

4. Heping S, Peng L. Plantlet regeneration from leaf explants of Zamioculcas zamiifolia. Acta Hort Sinica. 2003; 30(5): 621-622.

5- Vanzie-Canton SD, Leonhardt KW. In vitro callus induction and plantlet regeneration protocol developed for the oryzalin treatment of *Zamioculcas zamiifolia* (Lodd.) Engl. (Araceae). Proceedings of the VI International Symposium on New Floricultural Crops. 2007; 813: 201-208.

6. Papafation M, Martini AN. Effect of position and orientation of leaflet explants with respect to plant growthregulators on micropropagation of *Zamioculca szamiifolia* Engl. (ZZ). Scientia Horticulturae. 2009; 120: 115-120.

7. Bakti C, Murgayanti A, Mubarok S. Aglaonema micropropagation by in vitro culture. Micropropagasi *Aglaonema secara* in vitro. Indonesian Agr Res. 2011; 28(2): 121.

8. Shijun, Z, Rulan, J, Hougao, Z. Stufy on rapid propagation of *Aglaonema commutatum* cv. Golden Jewelry. Chinese Agricultural Sciences Bulletin.2004; 20(4): 39.

9. Deeir YH, Hahn EJ, Peak KY. In vitro flowering of *Spathiphyllum cannifolium*: influence of gibberllic acid, culture type and sucrose concentration. ISHS Acta Horticulture725: V International Symposium on in vitro Culture and Horticultural Breeding. 2006.

10. Chan L-K, Tan CM, Chew GS. Micropropagation of the *Araceae* ornamental plants. ISHS Acta Horticulturae 616: I International Symposium on Acclimatization and Establishment of Micropropagated Plants. 2003; 616; 383-390.

11. Hooker MP, Nabors MW. Callus initiation, growth and organogenesis in sugar beet (*Beta vulgaris*), PFL Physiol. 1977; 54: 237-246.

12. Sayadi Nejad M, Sadeghi SM. Optimization of callus production and regeneration of Zamiifolia (*Zamioculcas zamiifolia*). J. Hort. Sci. (Agricultural Sciences and Technology).2019; 33(3): 405-415.

13. Thimann KV. Auxins and the inhibition of plant growth. Biol. Rev. 1938;14(3): 314-337.

14. Kakani A. Molecular and biochemical role of auxin and cytokinin in dedifferentiation and organogenesis of Arabidopsis. 2009. Ph.D. Thesis, Mississippi State University, Mississippi, USA.

15. Prathibha BR, Nirmala KS, Satyanarayana BN, Anithe P, et al. Induction of multiple shoots in Zamioculcas *zamiifolia* Engl. under in vivo condition. Int. J. Chem. Stud. 2018; 6(6): 667-671.

16. George EF, Hall MA, De Klerk G. Plant propagation by tissue culture- 3rd Ed. The Background. 2008; 504 p.

17. Letham DS. Regulation of cell division in plant tissues. XII. A cytokinin in plant extracts: isolation and interaction with other growth regulators. Phytochem. 1966; 5: 269-286.

18. Dini Torkamani MR, Abaspour N, Jafari M, Samadi A. Induction and optimization of hairy root growth condition for *Valeriana officinalis* L. through inoculation by *Agrobacterium rhizogenes*. J Cell Tissue (JCT). 2014; 5(1): 23-30.

19. Majd A, Zandi N, Arbabian S, Sharifnia F. The comparative study of synthetic seed production of two Crataegus species by meristem culture and somatic embryos methods. J. Cell Tissue (JCT). 2016; 7(2): 121-129.

Journal of Cell & Tissue (JCT)
Autumn 2020; 11(3) *Original Article*

Impact of growth regulators on callus formation and regeneration of ornamental plant zamiifolia

Beyramizadeh E[1] Ph.D., Arminian A[2*] Ph.D., Fazeli A[1] Ph.D.,

1. National Institute of Ornamental Plants (NIOP), Horticultural Science Research, Agricultural Research, Education and Development, Mahallat, Iran
2. Agronomy and Plant Breeding Department, Agricultural faculty, Ilam University, Ilam, Iran.

* Email corresponding author: a.arminian@ilam.ac.ir

Received: 26 Apr .2020 Accepted: 7 Dec. 2020

Abstract

Aim: This study aimed to access the rapid and improved propagation protocol production of Zamifolia plant using tissue culture.
Material and Methods: For callus formation and regeneration, two independent factorial experiments were carried out in a completely randomized design with 3 replications in the tissue culture laboratory of the National Research Institute of Flowers and Ornamental Plants in 2018. In the first experiment, to induce callogenesis, 2,4-D (0, 1, 2, and 4 mg/l) and BA (0, 1 and 2 mg/l) were used. In the second experiment, or regeneration of explants, NAA (0 and 0.5 mg/l) and BA (0, 0.5, and 1 mg/l) were applied.
Results: The results of the callogenesis experiment showed that a modified basal MS medium with concentration of 2 mg/l BA and 1 mg /l 2,4-D produced the best callus with 85% regeneration. At the regeneration stage of the callus, 0.5 mg/l BA and 0.5 mg NAA produced the highest number of seedlings and regenerated tubers (90%). Subsequently, single tuber seedlings were successfully adapted to 80%-90% in the cocopeat and perlite substrates.
Conclusion: The results were successful and could be possible to achieve the callogenesis and regeneration of Zamifolia plant with the formula presented and recommend as practical a protocol for commercial micropropagation of this valuable ornamental plant.
Keywords: Auxin, cytokinin, proliferation, rooting, leaf piecess