نشریه پژوهش‌های علوم و فناوری چوب و جنگل
جلد بیستم و یکم، شماره سوم، ۱۳۹۳
http://jwfst.gau.ac.ir

ریزازدیادی گونه *Crataegus pseudoheterophylla* Pojark. در شرایط درون‌شیشه‌ای

فاطمه احمدلو[۱]، *مسعود طبری‌کوچکسرایی[۲]، پژمان آزادی[۳]، آیدین حمیدی[۴] و ابراهیم بیرامی‌زاده[۵]

[۱] دانشجوی دکتری جنگلداری دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه تربیت مدرس، نور، [۲]استاد دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه تربیت مدرس، نور، [۳]استادیار پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی ایران، کرج، [۴]استادیار مؤسسه تحقیقات ثبت و گواهی بذر و نهال، کرج، [۵]مربی پژوهشی و عضو هیأت علمی ایستگاه ملی تحقیقات گل و گیاهان زینتی محلات

تاریخ دریافت: ۹۲/۱/۱۹ ؛ تاریخ پذیرش: ۹۳/۷/۲۶

چکیده

زالزالک از تیره گل سرخ (Rosaceae) و از جمله درختانی است که دارای مصرف‌های دارویی و زینتی بوده و ارزش صادراتی دارد. در این تحقیق کلیه مراحل مربوط به ریزازدیادی گونه *Crataegus pseudoheterophylla* Pojark. شامل سترون‌سازی، استقرار، شاخه‌زایی و ریشه‌زایی مورد ارزیابی قرار گرفته است. نمونه‌برداری در فصل بهار و پاییز انجام و پس از ۳۰ دقیقه ضدعفونی سطحی با محلول اتانول ۷۰ درصد به‌مدت ۳۰ ثانیه و محلول سفیدکننده تجاری هیپوکلریت سدیم ۱/۵ و ۲ درصد به‌مدت زمان‌های ۱۰، ۱۵ و ۲۰ دقیقه سترون‌سازی شدند. محیط‌های کشت MS، WPM و DKW جهت استقرار اولیه مورد استفاده قرار گرفتند. آزمایش شاخه‌زایی در محیط‌های کشت MS و WPM و غلظت‌های مختلفی از هورمون‌های BAP و NAA و آزمایش ریشه‌زایی در غلظت‌های مختلفی از هورمون IBA صورت گرفت. نتایج مقایسه میانگین‌ها نشان داد که بهترین روش سترون در غلظت هیپوکلریت سدیم ۱/۵ درصد با مدت زمان ۱۵ دقیقه در فصل بهار و بهترین محیط جهت استقرار در محیط کشت MS با بزرگ‌ترین طول شاخه (۳/۵ سانتی‌متر) و بیش‌ترین درصد زنده‌مانی (۹۰/۳۳) حاصل شد. تیمار ۸ میلی‌گرم در لیتر BAP در ترکیب با ۲ میلی‌گرم در لیتر NAA با ۳۹/۳۳ عدد شاخه در هر نوساقه در محیط کشت MS بهترین تیمار شاخه‌زایی و تیمار ۱ میلی‌گرم در لیتر IBA با ۲۵ درصد ریشه‌زایی در محیط کشت MS ۱/۲ حاوی ۴۰ میلی‌گرم در لیتر PG بهترین تیمار ریشه‌زایی بود.

* مسئول مکاتبه: mtabari@modares.ac.ir

واژه‌های کلیدی: *Crataegus pseudoheterophylla* Pojark.، کشت جوانه، ریزازدیادی، هورمون BAP، هورمون NAA

مقدمه

جنس زالزالک (*Crataegus* L.) از طایفه Crataegeae، رده Spiraeoideae متعلق به خانواده رز (Rosaceae) است و پراکنش آن به‌طور عموم در مناطق معتدل نیم‌کره شمالی می‌باشد (پوتر و همکاران، ۲۰۰۷). در ایران حدود ۲۷ گونه (۲۲ گونه، ۵ هیبرید) از این جنس وجود دارد و از این تعداد ٤ گونه اندمیک، ۵ گونه نادر و ٤ گونه در حال انقراض است (خاتم‌ساز، ۱۹۹۲). میوه آن دارای خواص دارویی بوده و قابلیت خوراکی دارد. گل‌ها، برگ‌ها و میوه زالزالک سرشار از آنتی‌اکسیدانت و پلی‌فنل‌ها هستند و نه تنها در باغ‌ها، مزارع و حاشیه جاده‌ها استفاده می‌شود، بلکه به‌دلیل داشتن گل و میوه زینتی در فضای سبز شهری نیز کاربرد دارند. سازگاری بالایی به خشکی و سرما دارند و ضمن پوشش دادن مناطق نیمه‌خشک وسیع کشور بهترین پایه پیوند برای به، گلابی و سیب به‌کار می‌روند و از نظر خواص دارویی و ارزش صادراتی دارای اهمیت می‌باشند (نس و همکاران، ۲۰۱۲).

زالزالک‌ها به‌طور عموم از طریق بذر تکثیر می‌شوند ولی به‌دلیل دارا بودن میوه پارتنوکارپیک (تشکیل و رشد میوه بدون تلقیح تخمک‌ها) و یا گسترش آندوکارپ بدون لقاح بذر واقعی، جوانه‌زنی بذر آن‌ها مشکل است (بوجارسکا بورکوسکا، ۲۰۰۲). میوه‌های زالزالک کروی با اندوکارپ استخوانی و هسته‌های کوچک می‌باشد و این پدیده سبب می‌شود که جوانه‌زنی آن به‌میزان کم انجام شود (مظفریان، ۲۰۰٤). بیش‌تر بذرهای جنس زالزالک دارای خواب دوگانه بوده یعنی علاوه بر وقوع خواب فیزیکی (مقاومت مکانیکی پوسته)، دارای خواب جنین نیز می‌باشند و جوانه‌زنی آن‌ها ممکن است ۳-۲ سال طول بکشد و بذرشان از نظر رفتار انبارمانی ارتودکس می‌باشد (ایستا، ۲۰۰۸). این در حالی است که تاکنون گزارشی مبنی بر تکثیر جنس زالزالک از طریق قلمه و پیوند گزارش نشده است. در این راستا روش کشت در شیشه امکان رشد سریع و تولید با کیفیت بالای گیاهان را می‌دهد و ابزار مناسبی برای رسیدن به اهدافی است که در شرایط کشت در محیط طبیعی دست‌یابی به آن‌ها دشوار است و برای حفاظت ژرم‌پلاسم و بهبود ژنتیکی گونه‌ها مفید می‌باشد (نس و همکاران، ۲۰۱۲). همچنین 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 به‌دست آمده از والد با خلوص ژنتیکی همراه نیست (آل- ماناسراه، ۲۰۱۲). بنابراین برای رسیدن به یک ساختار ژنتیکی از درخت بالغ برگزیده و ازدیاد انبوه آن به روش‌های تکثیر غیرجنسی روی می‌آورند.

در این رابطه کشت جوانه به‌دست آمده از سرشاخه از جهت همسانی گیاه به‌دست آمده از کشت به والد آن اهمیت ویژه‌ای دارد (نس و همکاران، ۲۰۱۲). مطالعات متعددی در رابطه با کشت بافت خانواده Rosaceae در خارج از کشور انجام گرفته است. در رابطه با سترون‌سازی جوانه‌ها دژمبور و همکاران (۲۰۰۷) ریزنمونه‌های جنس *Prunus* sp. را با غلظت‌های مختلف هیپوکلریت سدیم گندزدایی نموده و نتیجه گرفتند که هیپوکلریت سدیم ۲/۵ درصد به‌مدت ۱۰-۵ دقیقه کم‌ترین آلودگی را دارند. در مرحله استقرار پاتی و همکاران (۲۰۰۶) روی خانواده Rosaceae و گنجی‌مقدم و همکاران (۲۰۰۸) و مهدویان و همکاران (۲۰۱۰) روی *Prunus mahaleb* L.، گزارش کردند که بهترین محیط کشت برای استقرار جوانه‌ها MS می‌باشد. در زمینه شاخه‌زایی ساقه و ریشه‌زایی نیز مطالعاتی روی گونه‌های مختلف جنگلی انجام گرفته است. از جمله میگویل و همکاران (۱۹۹۶) روی *Prunus dulcis* Mill.، مونا و همکاران (۱۹۹۹) روی *Prunus* sp. و گوکبونار (۲۰۰۷) روی *Crataegus* sp.، BAP را بهترین تنظیم‌کننده رشد در مرحله شاخه‌زایی معرفی کردند. لاپیچینو و آیرو (۲۰۰۹) برای تعیین بهترین غلظت تنظیم‌کننده رشد برای شاخه‌زایی ساقه، سرشاخه‌های شامل جوانه *C. monogyna* را در محیط کشت شامل ۵ غلظت BA[1] (۰، ۰/۵، ۱، ۲ و ٤ میلی‌گرم در لیتر) و ۲ غلظت IBA[2] (۰ و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر) کشت نمودند. نتایج آن‌ها نشان داد که بیش‌ترین شاخه‌زایی ساقه در محیط کشت MS (موراشیگ و اسکوگ، ۱۹٦۲) و در غلظت ۱ میلی‌گرم در لیتر BAP و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر IBA و طول ساقه ۳/۵ سانتی‌متر به‌دست آمد. با کشت سرشاخه‌های شامل جوانه *C. azarolus*، کابنی و همکاران (۲۰۱۰) در محیط کشت LP[3] تغییریافته و با ۳ غلظت BAP و CPPU[4] (۰/۲، ۰/٤ و ۰/۸ میلی‌گرم در لیتر) بیش‌ترین شاخه‌زایی را در غلظت ۰/٤ میلی‌گرم در لیتر و بیش‌ترین درصد ریشه‌زایی و تعداد ریشه را در محیط کشت LP همراه با ٤ میلی‌گرم در لیتر

۱- بنزیل آدنین

۲- ایندول بوتیریک اسید

۱- Quoirin و Lepoivre، ۱۹۷۷

۲- فورکولورفنورون ۵- ایندول استیک اسید

IBA به‌مدت ۵ روز و یا ۸۰ میلی‌گرم در لیتر IBA برای ۱ روز و سپس انتقال به محیط کشت بدون هورمون به‌دست آوردند. نس و همکاران (۲۰۱۲) نیز سرشاخه‌های جمع‌آوری شده *C. aronia* L. را در ٤ نوع محیط کشت MS، WPM (لیوید و مک‌کاین، ۱۹۸۰)، DKW (دراور و کانیوکی، ۱۹۸٤) و NRM (نس و رید، ۲۰۰٤) (شامل ترکیبات ۱ میلی‌گرم در لیتر BAP و ۰/۰۱ میلی‌گرم در لیتر IBA) مقایسه نمودند. نتایج آن‌ها نشان داد که تولید شاخه به‌ترتیب ۵/۷، ٤/۲، ٤/۲ و ٤/۱ در NRM، MS، DKW و WPM و درصد ریشه‌زایی در محیط NRM ۱/۲ در غلظت ۰/۵ و ۱ میلی‌گرم در لیتر، ۸۰ درصد بوده است. ماهاریک و همکاران (۲۰۰۹) در بررسی ریشه‌زایی *C. sinaica* Boiss در محیط MS ۱/۲ و MS و با ٤ غلظت IBA و IAA[۱] در غلظت‌های (۰، ۰/۵، ۱ و ۲ میلی‌گرم در لیتر)، توانستند ۹ درصد ریشه‌زایی در محیط MS ۱/۲ همراه با ۱ میلی‌گرم در لیتر IBA به‌دست آورند. ریشه‌زایی *C. aronia* توسط آل- ماناسراه (۲۰۱۲) در غلظت‌هایی از ۰، ۰/۵، ۱ و ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر IBA، IAA و NAA در محیط کشت QL انجام شد ولی موفقیت آمیز نبود.

یکی از گونه‌های جنس زالزالک گونه *Crataegus pseudoheterophylla* Pojark. است که به‌دلیل پراکنش اکولوژیکی محدود آن، تجدید حیات طبیعی ضعیف و مشکلات تکثیر نهال در معرض تهدید قرار دارد. از طرفی به‌دلیل دشوار بودن جوانه‌زنی بذر و ریشه‌زایی قلمه آن، استقبال آن‌چنانی برای تکثیر آن در نهالستان‌های تولید نهال و یا مراکز تولید گیاهان صنعتی و زینتی وجود ندارد ضمن این‌که در داخل کشور گزارشی روی تکثیر غیرجنسی آن از طریق کشت درون‌شیشه‌ای نیز منتشر نشده است. بنابراین تکثیر این گونه در ردیف اولویت طرح‌های تحقیقاتی اداره کل منابع طبیعی استان مرکزی می‌باشد. از آن‌جا که توانایی ریزازدیادی این گونه برای اولین بار مورد ارزیابی قرار می‌گیرد، بنابراین ضرورت دارد روش سترون‌سازی، نوع محیط کشت و شاخه‌زایی آن تعیین گردد. این پژوهش با هدف رسیدن به پروتکل تکثیر، سترون‌سازی جوانه سرشاخه، استقرار ثانویه، شاخه‌زایی و ریشه‌زایی نوساقه این گونه را در شرایط کشت درون‌شیشه‌ای بررسی نموده تا نتایج آن مورد استفاده پژوهشگران و بخش‌های اجرایی و خصوصی کشور قرار گیرد.

مواد و روش‌ها

۳- ایندول استیک اسید

برای انجام این پژوهش از سر شاخه‌های یک‌ساله نیمه‌خشبی و واجد جوانه در حال رشد پایه‌های مادری گونه *Crataegus pseudoheterophylla* Pojark. با ویژگی‌های یکسان از نظر قطر و ارتفاع و مورفولوژی که بدون عیب و آثار تنش‌های محیطی باشند و از قسمت فوقانی تاج و رو به نور استفاده گردید. نمونه‌ها از روستای دو خواهران در شهرستان شازند، بخش مرکزی دهستان آستانه در فاصله ۸ کیلومتری از شازند با عرض جغرافیایی ۳۳ درجه و ۵۱ دقیقه و ٥٦ ثانیه شمالی و طول جغرافیایی ٤٩ درجه و ٢٤ دقیقه و ١٢ ثانیه شرقی جمع‌آوری گردید. متوسط ارتفاع منطقه ۲۲۰۰ متر، متوسط بارندگی ٥٦٨/٥٤ میلی‌متر، اقلیم منطقه نیمه‌مرطوب سرد و کوهستانی، بافت خاک لومی شنی تا لومی رسی شنی با اسیدیته ۸-۷/۸ و میزان هدایت الکتریکی عصاره اشباع خاک ۰/۵ میلی‌موس بر سانتی‌متر است (آقاخانی و متاجی، ۲۰۱۰).

آزمایش اول- سترون‌سازی جوانه‌های به‌دست آمده از سرشاخه: سر شاخه‌های جوان واجد جوانه در حال رشد درختان مادری گونه مورد پژوهش در بهار (اوایل خرداد) و پاییز (اوایل مهر) از منطقه مورد مطالعه برداشت شد و در بسته‌بندی‌های تمیز به‌وسیله فلاسک یخ به آزمایشگاه پژوهشکده تحقیقات گل و گیاهان زینتی محلات انتقال یافت؛ سپس جوانه‌های انتهایی و جانبی به اندازه ۱ سانتی‌متری از شاخه‌ها جدا شدند. ابتدا تمامی نمونه‌ها با آب و مایع ظرفشویی به‌مدت ۳۰ دقیقه ضدعفونی سطحی شده و با محلول اتانول ۷۰ درصد به‌مدت ۳۰ ثانیه و ۲ بار با آب دی‌یونیزه شستشو شده و سپس غوطه‌وری در محلول سفیدکننده تجاری هیپوکلریت سدیم ۱/۵ و ۲ درصد به‌مدت ۱۰، ۱۵ و ۲۰ دقیقه و ۵ قطره توئین ۲۰[1] (به‌منظور افزایش نفوذپذیری محلول) و ۳ بار شستشو با آب دی‌یونیزه شده در زیر لامینار فلو انجام گرفت (اینجارلیک، ۱۹۸۸). پس از ضدعفونی، نمونه‌ها در آب مقطر سترون شامل اسید اسکوربیک (۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر) قرار گرفت. انتهای قهوه‌ای قاعده جوانه‌ها قطع و زواید جانبی شاخه حذف و سپس کشت در محیط MS صورت گرفت. آزمایش به‌صورت فاکتوریل و با استفاده از رویه GLM و طرح با اندازه‌گیری تکراری[2]، تجزیه و تحلیل داده‌ها صورت پذیرفت. با توجه به معنی‌دار بودن آزمون کرویت موشلی[3]، فرض یکنواختی کوواریانس برقرار

1- Tween 20
1- Repeated Measure
2- Mauchly's

نمی‌باشد به همین منظور مقادیر اپسیلون گرین هوس- گیزر[1] مورد توجه قرار گرفت. آزمایش با ۳ تکرار ۱۰ شیشه‌ای که هر شیشه آن شامل ۵ جوانه بود و ۲ تیمار غلظت و مدت زمان هیپوکلریت سدیم و به‌طورکلی ٦۰ شیشه و ۳۰۰ ریز نمونه برای نمونه‌های تهیه شده از هر فصل انجام گرفت.

آزمایش دوم- مرحله استقرار ثانویه: ۱ ماه بعد از استقرار اولیه و تعیین بهترین تیمارهای سترون‌سازی، ۳ نوع محیط کشت MS، DKW (با ساکارز ۳ درصد) و WPM (با ساکارز ۲ درصد) و با آگار ۰/۷ درصد شامل سیتوکینین BAP (۰/۵ میلی‌گرم در لیتر) و NAA[2] (۰/۰۵ میلی‌گرم در لیتر) آماده گردید (بونگا و آدرکاس، ۱۹۹۲). آزمایش با ۱۰ شیشه که هر شیشه آن شامل ۵ جوانه بود و ٦ تکرار و تعداد کل ۳۰۰ ریزنمونه در هر تیمار محیط کشت و ۱۸۰ شیشه و ۹۰۰ ریزنمونه در کل استفاده گردید. قرارگیری کشت‌ها در شرایط خاص اتاق رشد با فتوپریود ۱٦ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی و حرارت ۲۵ درجه و تشعشع لامپ‌های فلورسنت ۳ هزار لوکس قرار گرفت. واکشت جوانه‌ها هر ماه یک‌بار و یادداشت‌برداری پس از ۳ واکشت ماهیانه (در کل، ۳ ماه) براساس رشد طولی شاخه‌ها، درصد زنده‌مانی، اندازه برگ و تعداد برگ سالم نمونه انجام گرفت (کومار راجش، ۲۰۰۲؛ انصار و همکاران، ۲۰۰۹). آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی و مقایسه میانگین‌ها با آزمون تجزیه واریانس یک‌طرفه انجام گردید. تجزیه واریانس در تعداد برگ سالم با آزمون کروسکال والیس[3] برای مقایسه کلی و مقایسه میانگین‌ها با آزمون من‌ویتنی یو[4] انجام گرفت.

آزمایش سوم- شاخه‌زایی[5] نوساقه: نمونه‌هایی که رشد کافی داشتند به محیط کشت شاخه‌زایی منتقل شدند. در این مرحله از محیط‌های MS و WPM به همراه جیبرلیک اسید[6] با غلظت ۲ میلی‌گرم در لیتر استفاده شد. تیمارهای آزمایش در جدول ۱ آورده شده است. صفات تعداد برگ نکروزه شده، ارتفاع گیاهچه و شاخه‌های جانبی هر ٤ هفته یک‌بار و در مجموع برای ۳ ماه اندازه‌گیری شد. آزمایش به‌صورت فاکتوریل و طرح کاملاً تصادفی و با دو عامل محیط کشت و ترکیب هورمونی و میانگین‌ها با آزمون دانکن تجزیه و تحلیل شد. آزمایش شامل ۲٤ تیمار و ۳ تکرار و هر تکرار شامل ۵ ریزنمونه و ۷۲ شیشه و ۳٦۰

3- Greenhouse-Geisser

٤- نفتالین استیک اسید

5- Kruskal-Wallis
6- Mann-Wihtney U
1- Proliferation
2- GA3

ریزنمونه برای هر تیمار محیط کشت و در کل ۱٤٤ شیشه و ۷۲۰ ریزنمونه برای کل تیمارها بود.

جدول ۱- غلظت هورمون‌های به‌کار برده شده بر حسب میلی‌گرم در لیتر در آزمایش شاخه‌زایی.

BAP (۰، ۱، ۲، ۳، ٤، ٥، ٦، ۷ و ۸) و NAA (۰، ۰/٥، ۱و ۲)

آزمایش چهارم- ریشه‌زایی نوساقه: برای ریشه‌زایی، واکشت شاخه‌های با طول ۲-۱/٥ سانتی‌متری در محیط کشت MS بدون هورمون برای ۱ ماه انجام شد. سپس شاخه‌ها به محیط کشت MS ۱/۲ با غلظت‌های ۰، ۱، ۲، ۳ و ٤ میلی‌گرم در لیتر IBA به همراه ٤۰ میلی‌گرم در لیتر PG[۱] با ۱/٥ درصد ساکارز و ۷ گرم در لیتر آگار به‌مدت ۱ هفته در تاریکی در اتاق رشد و سپس در معرض فتوپریود ۱٦ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی و حرارت ۲٥ درجه و تشعشع لامپ‌های فلورسنت ۲ هزار لوکس قرار گرفتند. واکشت شاخه‌ها هر ماه یک‌بار و یادداشت‌برداری پس از ٥ واکشت ماهیانه براساس درصد ریشه‌زایی و تعداد ریشه انجام گرفت. آزمایش در قالب طرح کامل تصادفی و مقایسه میانگین‌ها با آزمون تجزیه واریانس یک‌طرفه انجام گردید.

نتایج

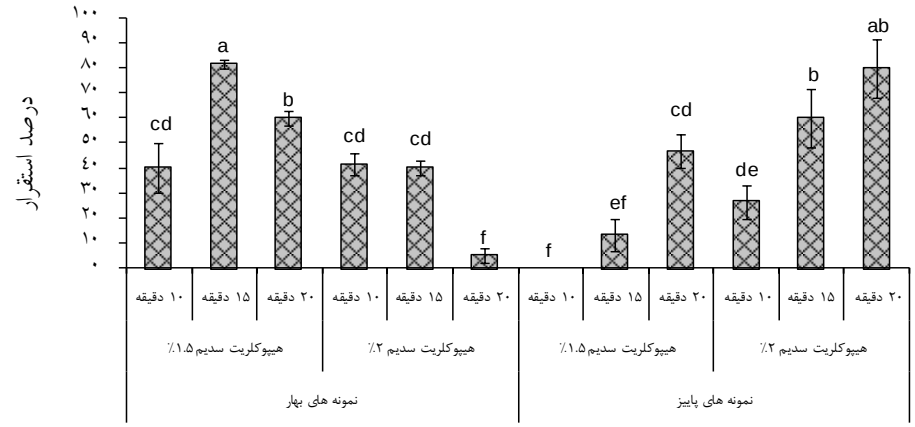
آزمایش اول- سترون‌سازی جوانه‌های به‌دست آمده از سرشاخه: نتایج تجزیه واریانس نشان می‌دهد که مدت زمان تیمار بر درصد استقرار اولیه ریزنمونه‌های سالم و درصد آلودگی ریزنمونه‌ها معنی‌دار است (جدول ۲). درصد آلودگی در اثر متقابل غلظت هیپوکلریت سدیم و مدت زمان تیمار اختلاف معنی‌دار آماری را نشان نداد (جدول ۲). مقایسه میانگین‌ها نشان می‌دهد که بیش‌ترین درصد استقرار ریزنمونه‌های سالم در غلظت هیپوکلریت سدیم ۱/٥ درصد با مدت زمان ۱٥ دقیقه در فصل بهار بود. در غلظت هیپوکلریت سدیم ۱/٥ درصد با مدت زمان ۱۰ دقیقه در فصل پاییز، گیاهچه‌ای استقرار نیافت (شکل ۱). کم‌ترین میزان درصد آلودگی در غلظت هیپوکلریت سدیم ۲ درصد (شکل ۲) و مدت زمان ۲۰ دقیقه در فصل بهار بود (شکل ۳).

۳- فلوروگلوسینول

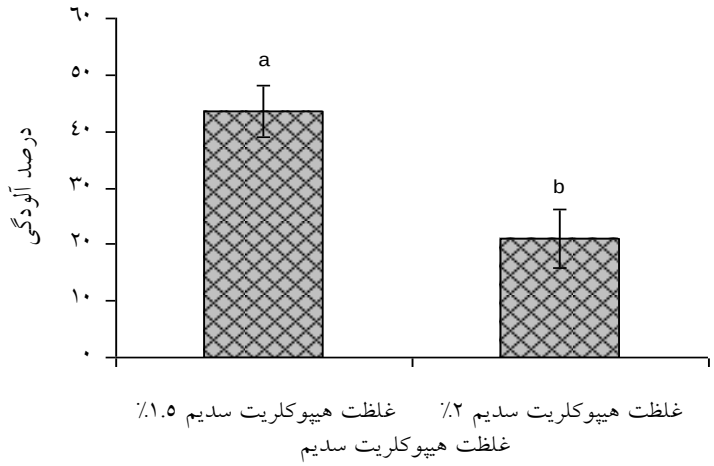
جدول ۲- تجزیه واریانس درصد استقرار اولیه ریزنمونه‌های سالم و درصد آلودگی جوانه‌ها در تیمارهای مختلف سترون‌سازی در محیط کشت MS.

منبع تغییرات	متغیر وابسته	میانگین مربعات (MS)	F	Sig.
غلظت هیپوکلریت سدیم	درصد استقرار اولیه ریزنمونه‌های سالم	۳٤/۰۲۸	۰/۱۵۹	۰/۷۱^{ns}
	درصد آلودگی	٤٥٥٦/۲٥	٤٤/۹۳۸	۰/۰۰۳**
مدت زمان تیمار	درصد استقرار اولیه ریزنمونه‌های سالم	٤٦۱۱/٥٥۲	۱۷/۳	۰/۰۰۱**
	درصد آلودگی	۹۱۲۷/۳٤۸	٤٦/۸۹۱	۰/۰۰۰**
غلظت هیپوکلریت سدیم	درصد استقرار اولیه ریزنمونه‌های سالم	٥۷٦٤/۳٦٤	۲۱/٦۰۳	۰/۰۰۰**
× مدت زمان تیمار	درصد آلودگی	٤٦۷/٦۷	۲/٤۰۳	۰/۱۳٦^{ns}

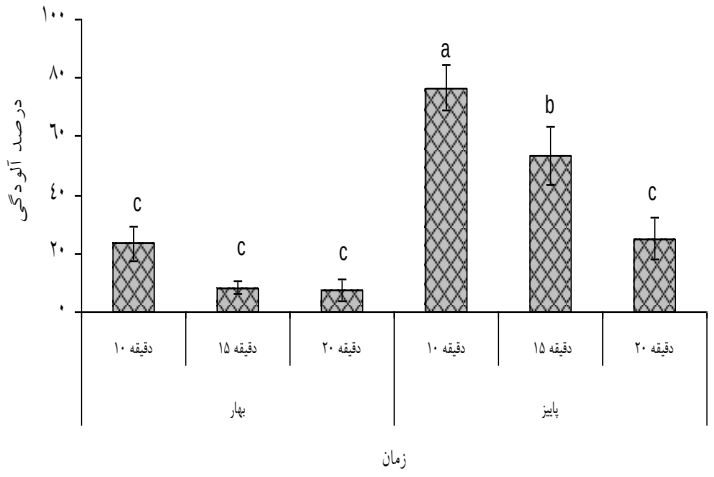
* معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد، ** معنی‌دار در سطح احتمال ۱ درصد و ^{ns} غیرمعنی‌دار.



شکل ۱- میزان درصد استقرار اولیه ریزنمونه‌های سالم در تیمارهای اثر متقابل زمان و غلظت هیپوکلریت سدیم.



شکل ۲- میزان درصد آلودگی ریزنمونه‌ها در غلظت‌های مختلف هیپوکلریت سدیم.



شکل ۳- میزان درصد آلودگی ریزنمونه‌ها در مدت زمان‌های مختلف.

آزمایش دوم- استقرار ثانویه: نتایج تجزیه واریانس معنی‌داری تمامی پارامترهای اندازه‌گیری شده را نشان می‌دهد. بیش‌ترین طول شاخه، درصد زنده‌مانی و اندازه برگ در محیط کشت MS و بیش‌ترین تعداد برگ سالم در محیط کشت WPM وجود دارد (جدول ۳).

جدول ۳- تجزیه واریانس و مقایسه میانگین شاخص‌ها در محیط‌های کشت مختلف (MS، WPM و DKW) در آزمایش استقرار ثانویه.

پارامترها	طول شاخه (سانتی‌متر)		زنده‌مانی (درصد)		اندازه برگ (سانتی‌متر)		تعداد برگ سالم	
تجزیه	F	Sig.	F	Sig.	F	Sig.	X^2	P
واریانس	۳٦۰/۸۵	۰/۰۰۰**	۲٦۸/٤٤	۰/۰۰۰**	۸۷۵/۰۸۱	۰/۰۰۰**	۱۵۸/۵۰۱	۰/۰۰۰**
MS	۳/۵(۰/۰۵)^a		۹۰/۳۳(۳/٦)^a		٤/۸۹(۰/۰۵)^a		٤/۱۲(۰/۱۳)^b	
WPM	۲/۲(۰/۰۳)^b		٤۲/۰۸(۲/۲)^b		۲/۳٤(۰/۰۲)^c		٤/۸(۰/۱۳)^a	
DKW	۲(۰/۰٤)^c		۲۷/۵۷(۲/٦)^c		۳/۷۲ (۰/۰۵)^b		۳/٤(۰/۱۲)^c	

اعداد داخل پرانتز اشتباه معیار هستند.

حروف مختلف در ستون بیانگر معنی‌دار بودن میانگین‌ها در سطح احتمال ۰/۰۵ درصد است.

آزمایش سوم- شاخه‌زایی نوساقه: نتایج تجزیه واریانس نشان می‌دهد که اثرات تیمار محیط کشت و غلظت هورمونی و اثر متقابل آن‌ها روی شاخص‌های اندازه‌گیری شده معنی‌دار است (جدول ٤). مقایسه میانگین‌ها در اثر متقابل تیمار محیط کشت و تیمار غلظت هورمونی نشان می‌دهد که بیش‌ترین تعداد برگ نکروزه شده در تیمار ۱، شاخه‌زایی در تیمار ۲٤ و طول شاخه در تیمار ۲۳ در محیط کشت MS وجود دارد (جدول ۵). شمایی از تیمارهای ۱ و ۲٤ در محیط کشت MS در شکل‌های ٤ و ۵ آورده شده است.

جدول ٤- تجزیه واریانس تعداد برگ نکروزه شده، طول شاخه و شاخه‌زایی در تیمارهای محیط کشت و غلظت هورمونی و اثر متقابل آن‌ها.

منبع تغییرات	متغیر وابسته	میانگین مربعات (MS)	F	Sig.
	تعداد برگ نکروزه شده	۳۷۸/۵۱۹	۲۹/۰۱۷	۰/۰۰۰**
محیط کشت	شاخه‌زایی	۲۸۵/۳۹۱	۳۹۷/۵۰۹	۰/۰۰۰**
	طول شاخه	٦/٤۸۲	۱۳/۰۸۵	۰/۰۰۰**
	تعداد برگ نکروزه شده	۱۸۰/٦۰٤	۱۳/۸٤۵	۰/۰۰۰**
غلظت هورمونی	شاخه‌زایی	۱۲۹/۷۲۲	۱۸۰/٦۸۵	۰/۰۰۰**
	طول شاخه	۱/۸٦٤	۳/۷٦۳	۰/۰۰۰**
	تعداد برگ نکروزه شده	۲۳/۹٤٦	۱/۸۳٦	۰/۰۱۸*
محیط کشت × غلظت هورمونی	شاخه‌زایی	٦٦/۹۷۸	۹۳/۲۹	۰/۰۰۰**
	طول شاخه	۰/۸۲۲	۱/٦۵۸	۰/۰٤۱*

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

جدول ۵- مقایسه میانگین تعداد برگ نکروزه شده، طول شاخه و شاخه‌زایی در تیمارهای اثر متقابل محیط کشت و غلظت هورمونی.

محیط کشت	تیمارها	غلظت هورمونی (میلی‌گرم در لیتر)	تعداد برگ نکروزه شده	شاخه زایی (تعداد)	طول شاخه (سانتی‌متر)
MS	۱	بدون هورمون	۲۲/۶۷(۲/۰۲)^{a}	۰/۰۰(۰/۰۰)^{i}	۲/۳(۰/۲)$^{g-i}$
	۲	NAA (0.5)	۱۷/۶۷(۲)$^{a-c}$	۰/۰۰(۰/۰۰)^{i}	۲/۷۸(۰/۲۳)$^{d-i}$
	۳	NAA (1)	۲۲(۲/۵۲)^{ab}	۰/۰۰(۰/۰۰)^{i}	۳/۱۸(۰/۳۳)$^{b-i}$
	٤	BAP (1)	۱۱(۱/۵۷)$^{c-h}$	۰/۳۳(۰/۰۰)^{hi}	۲/۳۷(۰/۲۵)$^{f-i}$
	۵	BAP (1) + NAA (0.5)	۱۲/۳۳(۱/۷٦)$^{c-f}$	۰/۰۰(۰/۰۰)^{i}	۲/۵۲(۰/۲)$^{e-i}$
	٦	BAP (1) + NAA (1)	۱۱/٦۷(۱/۷۳)$^{c-g}$	۰/۰۰(۰/۰۰)^{i}	۱/۹۱(۰/۱۸)^{i}
	۷	BAP (2)	۱۲/۳۳(۱/۷٦)$^{c-f}$	۰/٦۷(۰/۰۵)$^{g-i}$	۲/۸۳(۰/۲٤)$^{c-i}$
	۸	BAP (2) + NAA (0.5)	۱۳/٦۷(۱/۸)$^{c-e}$	۰/۰۰(۰/۰۰)^{i}	۳/۳(۰/۳۲)$^{a-i}$
	۹	BAP (2) + NAA (1)	۹(۱/٤٤)$^{d-k}$	۰/٦۷(۰/۰۵)$^{g-i}$	۳/٤(۰/۳٤)$^{a-h}$
	۱۰	BAP (3)	۸/٦۷(۱/٤)$^{d-l}$	۰/۳۳(۰/۰۰)^{hi}	۳/۱(۰/۳)$^{b-i}$
	۱۱	BAP (3) + NAA (0.5)	۸/٦۷(۱/٤)$^{d-l}$	۰/٦۷(۰/۰۵)$^{g-i}$	۲/۰۳(۰/۲)^{hi}
	۱۲	BAP (3) + NAA (1)	۱٤/٦۷(۱/۸)^{cd}	۰/۰۰(۰/۰۰)^{i}	۳/٤۳(۰/۳٤)$^{a-h}$
	۱۳	BAP (4)	۱۰/٦۷(۱/۳)$^{c-i}$	۰/٦۷(۰/۰۵)$^{g-i}$	۳/٤(۰/۳٤)$^{a-h}$
	۱٤	BAP (4) + NAA (0.5)	۸/٦۷(۱/٤)$^{d-l}$	۲(۰/۲)$^{e-g}$	۳/۳۷(۰/۳٤)$^{a-h}$
	۱۵	BAP (4) + NAA (1)	۱(۰/۰۷)^{m}	۱/۳۳(۰/۰۸)$^{f-i}$	۳/۸۷(۰/٤)$^{a-e}$
	۱٦	BAP (5)	۱/٦۷(۰/۳)$^{k-m}$	۰/۳۳(۰/۰۰)^{hi}	۲/۸۳(۰/۲٤)$^{c-i}$
	۱۷	BAP (5) + NAA (0.5)	۱(۰/۰۷)^{m}	۰/٦۷(۰/۰۵)$^{g-i}$	۳/۳(۰/۳۲)$^{a-i}$
	۱۸	BAP (5) + NAA (1)	۱(۰/۰۷)^{m}	۲(۰/۲)$^{e-g}$	۳/۷۷(۰/۳٤)$^{a-f}$
	۱۹	BAP (6)	۱/٦۷(۰/۳)$^{k-m}$	۱/۳۳(۰/۰۸)$^{f-i}$	۳/٤(۰/۳٤)$^{a-h}$
	۲۰	BAP (6) + NAA (0.5)	۰/٦۷(۰/۱)^{m}	۳(۰/۲۵)^{e}	۳/۳۷(۰/۳٤)$^{a-h}$
	۲۱	BAP (6) + NAA (1)	۰/٦۷(۰/۱)^{m}	٤/۳۳(۰/۳۵)^{d}	٤/۱(۰/۳۷)$^{a-d}$
	۲۲	BAP (6) + NAA (2)	۱(۰/۰۷)^{m}	٤/٦۷(۰/۳۷)^{d}	٤/۲۷(۰/٤۲)$^{a-c}$
	۲۳	BAP (7) + NAA (2)	۱(۰/۰۷)^{m}	۱٤/۳۳(۲/٤)^{b}	٤/٦۷(۰/٤)^{a}
	۲٤	BAP (8) + NAA (2)	۰/۳۳(۰/۰۰)^{m}	۳۹/۳۳(۳/۳۵)^{a}	٤/۳۷(۰/٤)^{ab}

ادامه جدول ۵-

محیط کشت	تیمارها	غلظت هورمونی	تعداد برگ نکروزه شده	شاخه زایی (تعداد)	طول شاخه (سانتی‌متر)
WPM	۱	بدون هورمون	۱۶(۱/۹)$^{b-d}$	۰/۰۰(۰/۰۰)^{i}	۲/۳(۰/۲۳)$^{g-i}$
	۲	NAA (0.5)	۱۵/۶۷(۱/۹)$^{b-d}$	۰/۰۰(۰/۰۰)^{i}	۲/۷۸(۰/۲۳)$^{g-i}$
	۳	NAA (1)	۹/۶۷(۱/٤)$^{d-j}$	۰/۰۰(۰/۰۰)^{i}	۳/۱۸(۰/۳۱)$^{b-i}$
	٤	BAP (1)	۹/۶۷(۱/٤)$^{d-j}$	۰/۰۰(۰/۰۰)^{i}	۲/۳۷(۰/۲۲)$^{f-i}$
	٥	BAP (1) + NAA (0.5)	٦/۳۳(۰/۸)$^{e-m}$	۰/۰۰(۰/۰۰)^{i}	۲/۵۲(۰/۲۳)$^{e-i}$
	٦	BAP (1) + NAA (1)	۵/۶۷(۰/۷)$^{f-m}$	۰/۰۰(۰/۰۰)^{i}	۱/۹۱(۰/۱۵)^{i}
	۷	BAP (2)	۷(۰/۸)$^{e-m}$	۰/۰۰(۰/۰۰)^{i}	۲/۸۳(۰/۲)$^{c-i}$
	۸	BAP (2) + NAA (0.5)	٦/۳۳(۰/۸)$^{e-m}$	۰/۰۰(۰/۰۰)^{i}	۳/۳(۰/۳)$^{a-i}$
	۹	BAP (2) + NAA (1)	۷(۰/۸)$^{e-m}$	۰/۰۰(۰/۰۰)^{i}	۳/٤(۰/۳)$^{a-h}$
	۱۰	BAP (3)	٤/۶۷(۰/۵)$^{g-m}$	۰/۰۰(۰/۰۰)^{i}	۳/۱(۰/۳)$^{b-i}$
	۱۱	BAP (3) + NAA (0.5)	۳/۶۷(۰/۳)$^{h-m}$	۰/۳۳(۰/۰۰)^{hi}	۲/۰۳(۰/۱۸)^{hi}
	۱۲	BAP (3) + NAA (1)	۳/۶۷(۰/۳)$^{h-m}$	۰/۰۰(۰/۰۰)^{i}	۳/٤۳(۰/۳)$^{a-h}$
	۱۳	BAP (4)	۱/۳۳(۰/۰۹)$^{l-m}$	۰/۳۳(۰/۰۰)^{hi}	۳/٤(۰/۳)$^{a-h}$
	۱٤	BAP (4) + NAA (0.5)	۲/۶۷(۰/۲)$^{j-m}$	۰/۰۰(۰/۰۰)^{i}	۳/۳۷(۰/۳)$^{a-h}$
	۱۵	BAP (4) + NAA (1)	۳/۳۳(۰/۳)$^{i-m}$	۰/۳۳(۰/۰۰)^{hi}	۳/۸۷(۰/٤)$^{a-e}$
	۱٦	BAP (5)	۱/۶۷(۰/۱)$^{k-m}$	۰/۰۰(۰/۰۰)^{i}	۲/۸۳(۰/۲)$^{c-i}$
	۱۷	BAP (5) + NAA (0.5)	۱(۰/۰۷)^{m}	۰/۰۰(۰/۰۰)^{i}	۳/۱۷(۰/۳)$^{b-i}$
	۱۸	BAP (5) + NAA (1)	۱(۰/۰۷)^{m}	۱(۰/۰۷)$^{f-i}$	۳/۱۷(۰/۳)b^{-i}
	۱۹	BAP (6)	۱/۶۷(۰/۳)$^{k-m}$	۱(۰/۰۷)$^{f-i}$	۲/۹۷(۰/۲۷)$^{b-i}$
	۲۰	BAP (6) + NAA (0.5)	۱(۰/۰۷)^{m}	۱(۰/۰۷)$^{f-i}$	۳/۳۷(۰/۳)$^{a-h}$
	۲۱	BAP (6) + NAA (1)	۰/۶۷(۰/۱)^{m}	۱/۶۷(۰/۳)$^{e-h}$	۳/۵۳(۰/۳)$^{a-g}$
	۲۲	BAP (6) + NAA (2)	۱(۰/۰۷)^{m}	۰/۶۷(۰/۲)$^{g-i}$	۲/۳۳(۰/۲)$^{f-i}$
	۲۳	BAP (7) + NAA (2)	۱/۳۳(۰/۰۹)$^{l-m}$	۲/۳۳(۰/٤۵)^{ef}	۲/۶۷(۰/۲)$^{d-i}$
	۲٤	BAP (8) + NAA (2)	۰/۶۷(۰/۱)^{m}	٦/۳۳(۰/۸)^{c}	۳/۲(۰/۲۸)$^{b-i}$

اعداد داخل پرانتز اشتباه معیار هستند. حروف مختلف در ستون بیانگر معنی‌دار بودن میانگین‌ها در سطح احتمال ۰/۰۵ درصد است.

شکل ٤- شمایی از گیاهچه‌های تیمار بدون هورمون (نکروزه شده) در محیط کشت MS.

شکل ٥- شمایی از گیاهچه‌های تیمار ٨ mg/l BAP + ٢ mg/l NAA در محیط کشت MS.

آزمایش چهارم- ریشه‌زایی نوساقه: نتایج تجزیه واریانس اختلاف معنی‌دار آماری درصد ریشه‌زایی و تعداد ریشه را در تیمارهای مختلف هورمونی IBA نشان می‌دهد (جدول ٦). بیش‌ترین درصد ریشه‌زایی و تعداد ریشه در تیمار ٢ (١ میلی‌گرم در لیتر IBA) وجود دارد. در غلظت‌های بیش‌تر از ٢ میلی‌گرم در لیتر به‌تدریج برگ‌ها نکروزه و سبب مرگ گیاهچه شد (جدول ٦). شمایی از گیاهچه‌های ریشه‌دار شده در غلظت ١ و ٢ میلی‌گرم در لیتر در شکل‌های ٦ و ٧ آورده شده است.

جدول ٦- تجزیه واریانس و مقایسه میانگین درصد ریشه‌زایی و تعداد ریشه در تیمار هورمونی IBA.

تیمارها	۱	۲	۳	٤	٥	میانگین مربعات (MS)	F	Sig.
درصد ریشه‌زایی	۰/۰۰(۰/۰۰)^{c}	۲٥(۱/۸)^{a}	۹/٦۷(۰/۷)^{b}	۰/۰۰(۰/۰۰)^{c}	۰/۰۰(۰/۰۰)^{c}	۳٥۸/٥۷	٦٥/٥۹	۰/۰۰۰**
تعداد ریشه	۰/۰۰(۰/۰۰)^{c}	۲/٦۷(۰/۳۳)^{a}	۱/۳۳(۰/۳۳)^{b}	۰/۰۰(۰/۰۰)^{c}	۰/۰۰(۰/۰۰)^{c}	٤/۲۷	۳۲	۰/۰۰۰**
تعداد برگ نکروزه شده	۲/٦۷(۰/۳۳)^{b}	۰/۰۰(۰/۰۰)^{b}	۱/۳۳(۰/۳۳)^{b}	۱۰/٦۷(۱/٤٥)^{a}	۹/٦۷(۱/۲)^{a}	۷۳/۲۷	۳۲/۳۲	۰/۰۰۰**

** معنی‌دار در سطح احتمال ۱ درصد، اعداد داخل پرانتز اشتباه معیار هستند. حروف مختلف در ستون بیانگر معنی‌دار بودن میانگین‌ها در سطح احتمال ۰/۰٥ درصد است.

تیمار ۱: بدون هورمون، تیمار ۲: ۱ میلی‌گرم در لیتر IBA، تیمار ۳: ۲ میلی‌گرم در لیتر IBA، تیمار ٤: ۳ میلی‌گرم در لیتر IBA، تیمار ٥: ٤ میلی‌گرم در لیتر IBA.

شکل ٦- شمایی از گیاهچه ریشه‌دار شده در تیمار ۱ میلی‌گرم در لیتر IBA.

شکل ۷- شمایی از گیاهچه ریشه‌دار شده در تیمار ۲ میلی‌گرم در لیتر IBA.

بحث

تکثیر درختان از طریق کشت بافت در آینده می‌تواند با سرعتی متناسب با سرعت تخریب برای کشت و تجدید حیات دوباره جنگل‌ها مورد استفاده قرار گیرد. آن‌چه باعث برتری این روش بر سایر روش‌ها می‌باشد سرعت تکثیر و امکان کاربرد آن در مورد گیاهان بالغ مسن است. اندام‌زایی از طریق کشت جوانه موفق‌ترین و آسان‌ترین روش ممکن می‌باشد. جوانه بالقوه توانایی تکثیر و تولید اندام‌های جدید را دارد و به همین دلیل از ثبات ژنتیکی کافی برخوردار بوده و کم‌ترین مقدار تغییرات ژنتیکی در تکثیر با این روش دیده می‌شود (کابنی و همکاران، ۲۰۱۰).

آزمایش اول- سترون‌سازی جوانه‌های به‌دست آمده از سرشاخه: در این پژوهش ریزنمونه‌ها پاسخ معنی‌داری نسبت به اعمال تیمارهای سترون‌سازی نشان دادند به‌طوری‌که در نمونه‌های بهار درصد استقرار اولیه و درصد آلودگی با استفاده از محلول ضدعفونی‌کننده هیپوکلریت سدیم در غلظت زیاد (۲ درصد) و مدت زمان‌های طولانی کاهش ولی در نمونه‌های پاییز درصد استقرار افزایش و درصد آلودگی کاهش یافت. اتانول با حذف لایه مومی سطح کوتیکول سبب می‌شود محلول ضدعفونی‌کننده قدرت نفوذ و تأثیر بیش‌تری بر بافت نمونه داشته باشد (اینجارلیک، ۱۹۸۸). در نمونه‌های بهاره با

استفاده از هیپوکلریت سدیم ۲ درصد (v/v) اگرچه آلودگی کنترل شد ولی درصد سوختگی ریزنمونه‌ها افزایش یافت. دژمپور و همکاران (۲۰۰۷) دریافتند که در گونه‌های خانواده Rosaceae وجود لایه‌های محافظ پوششی (فلس مانند) روی جوانه‌ها و وضعیت فیزیولوژیکی حاکم بر بافت‌ها و خفتگی جوانه‌های پاییزه امکان کاربرد غلظت‌های بالاتر مواد سترون‌کننده را فراهم می‌کند. این در حالی است که در ریزنمونه‌های برداشت شده در بهار به‌دلیل رشد فعال جوانه‌ها و نبود پوسته‌های محافظ در اطراف آن‌ها، سرعت نفوذ محلول‌های ضدعفونی‌کننده در بافت آن‌ها زیاد بوده، به‌نحوی‌که غلظت‌های زیاد محلول به پوسیدگی و مرگ بافت‌ها منجر شده و غلظت‌های کم تأثیری بر حذف آلودگی‌های ریزنمونه ندارد. این مهم می‌تواند دلیلی باشد بر نتایج این پژوهش زیرا جوانه‌های بهاره دارای پوشش نرمی بودند که با ضعیف‌ترین تیمارهای استریل آسیب دیدند. بنابراین باید به‌میزان غلظت ماده استریل‌کننده در زمان کاشت ریزنمونه‌های بهاره توجه خاصی مبذول داشت. پیشنهاد می‌شود برای کاهش میزان درصد آلودگی جوانه‌های پاییزه از سایر محلول‌های ضدعفونی‌کننده از جمله پراکسید هیدروژن[1]، دکونکس یا نانو سیلور با غلظت‌های مختلف استفاده گردد.

آزمایش دوم- استقرار ثانویه: مرحله استقرار مهم‌ترین مرحله در کشت درون‌شیشه‌ای می‌باشد. در این پژوهش در مرحله استقرار، طول شاخه، درصد زنده‌مانی و اندازه برگ در محیط کشت MS نسبت به WPM و DKW بیش‌تر بود. گنجی‌مقدم و همکاران (۲۰۰۸) روی *Prunus mahaleb* و نس و همکاران (۲۰۱۲) روی *C. aronia* L. نیز به نتایج مشابه دست یافتند. در حالی‌که در نتایج مهدویان و همکاران (۲۰۱۰) روی *P. mahaleb* محیط کشت DKW بهترین محیط استقرار بود به‌طوری‌که با مقایسه غلظت‌های یونی گزارش کردند که یون‌های کلسیم، منگنز، منیزیم، روی، بر، مس، نیکل، آهن، سولفات و فسفات در محیط DKW نسبت به MS بیش‌تر بود که این موضوع می‌تواند به نقش حیاتی این یون‌ها در متابولیسم و رشد گیاه مربوط باشد. همچنین، بونگا و آدرکاس (۱۹۹۲) با مقایسه قدرت یونی محیط‌های کشت MS؛ DKW و WPM پی بردند که قدرت یونی محیط کشت‌های DKW و MS مشابه است ولی قدرت یونی محیط کشت WPM کم‌تر از نصف هر یک از آن‌ها است و همچنین میزان یون کلسیم در محیط کشت DKW حدود ۳ برابر دو محیط کشت دیگر می‌باشد. بنابراین می‌توان بیان نمود که احتمالاً مقدار ترکیبات موجود در محیط کشت DKW برای استقرار و رشد گونه مورد پژوهش نامناسب می‌باشد که با نتایج کومار راجش (۲۰۰۲) روی *Crataegus oxyacantha* Linn.

1- H_2O_2

نیز همخوانی دارد. بونگا و آدرکاس (۱۹۹۲) بیان کردند استفاده از ترکیبات محیط کشت MS به‌ویژه با توجه به غلظت ویتامین‌ها در آن جهت تکثیر خانواده Rosaceae مناسب‌ترین محیط می‌باشد. از طرفی، ساکارز ۳ درصد نسبت به ساکارز ۲ درصد برای استقرار ریزنمونه شرایط مناسب‌تری را برای شروع رشد و مورفوژنز جوانه‌ها و برگ‌ها، فعالیت‌های فتوسنتزی و توسعه سلولی فراهم می‌کند که برتری محیط کشت MS را نسبت به WPM نشان می‌دهد (پاتی و همکاران، ۲۰۰۶). همچنین، عنصر ید با افزایش تجزیه آنزیمی اسیدهای آلی مانند اسیدهای بیوتین و فولیک در گیاهچه‌ها، رشد ساقه را افزایش می‌دهد که فقط در محیط کشت MS وجود دارد (انصار و همکاران، ۲۰۰۹) و می‌تواند دلیلی دیگر بر افزایش رشد ساقه در محیط کشت MS این پژوهش باشد. همچنین احتمالاً اندازه برگ در محیط کشت MS به‌دلیل توازن بهتر عناصر نسبت به دو محیط دیگر بیش‌تر بود. میزان نیتروژن بر رشد و توسعه برگ‌ها مؤثر بوده و کمبود آن در محیط کشت باعث کوچک بودن اندازه برگ می‌شود (کومار راجش، ۲۰۰۲). این نتایج همگی بیانگر واکنش متفاوت گونه‌ها به نوع محیط کشت و ترکیبات به‌کار رفته در آن می‌باشد.

آزمایش سوم- شاخه‌زایی نوساقه: مرحله شاخه‌زایی نوساقه در این پژوهش تحت‌تأثیر محیط کشت و غلظت هورمون‌های تنظیم‌کننده رشد بود. در این پژوهش محیط کشت MS شاخه‌زایی بیش‌تری نسبت به WPM داشت. محیط کشت MS در مقایسه با WPM غنی از پتاسیم است که به‌دلیل نقشی که در رشد و توسعه سلول، تورژسانس سلولی، باز و بسته شدن سلول‌ها و در نتیجه حفظ آب گیاهچه و سنتز ساکارز دارد میزان فتوسنتز را افزایش داده و تعداد شاخه بیش‌تری را تولید می‌کند. از طرفی میزان کلرید در محیط کشت WPM بیش‌تر است که به‌دلیل کاهش جذب و انتقال عناصر تغذیه‌ای، میزان شاخه‌زایی و رشد گیاه را کاهش می‌دهد (لاپیچینو و آیرو، ۲۰۰۹).

در این پژوهش مشخص گردید مقادیر بالاتر BAP و NAA برای شاخه‌زایی *Crataegus pseudoheterophylla* Pojark. مناسب‌تر است. بیش‌ترین میزان شاخه‌زایی (۳۹/۳۳ عدد) بدون تشکیل کالوس در ترکیب ۸ میلی‌گرم در لیتر BAP و ۲ میلی‌گرم در لیتر NAA به‌دست آمد. ماهاریک و همکاران (۲۰۰۹) نیز با استفاده از ترکیب ۵ میلی‌گرم در لیتر BAP و ۲ میلی‌گرم در لیتر NAA شاخه‌زایی را به حدود ۲۲ عدد بدون تشکیل کالوس رساندند و بیان نمودند که غلظت BAP بالای ممکن است در ریزازدیادی برخی گونه‌های چوبی مشکلی ایجاد نمی‌کند. گوکبونار (۲۰۰۷) نیز گزارش کرد که در محیط کشت بدون BAP، ریزنمونه‌ای استقرار نیافت و تعداد شاخه‌ها

در محیط کشت شامل سطوح بالای BAP نسبت به سطوح کم آن به‌طور معنی‌داری بیش‌تر بود. در حضور BAP شاخه‌زایی در پای شاخساره‌ها انجام می‌شود ولی این شاخساره‌های جانبی از نوع محوری بوده و به‌ندرت از شاخساره‌های نابه‌جا هستند (مونا و همکاران، ۱۹۹۹). نقش BAP در شکستن غالبیت انتهایی و تحریک رشد شاخساره‌های جدید است؛ بنابراین، با افزایش غلظت BAP در محیط، شاخه‌زایی افزایش می‌یابد که بیانگر نتایج این پژوهش می‌باشد. غلظت‌های بالای NAA اثرات مثبت BAP را خنثی نموده و باعث تشکیل کالوس می‌شود. همچنین، افزایش غلظت هورمون NAA سبب حذف ترکیبات فنولی می‌شود و این اثر ممکن است به‌دلیل اکسیداسیون ترکیبات فنولی توسط آنزیم اکسین اکسیداز باشد که فعال‌کننده این آنزیم، غلظت‌های بالای NAA می‌باشد (باسی و کاسیو، ۱۹۹۱). در این پژوهش نسبت هورمون BAP به هورمون NAA نیز تأثیرگذار بود. به‌طوری‌که باسی و کاسیو (۱۹۹۱) گزارش کردند که نسبت مناسب ترکیب هورمونی اکسین و سیتوکینین در محیط کشت برای رسیدن به گیاه کامل مؤثر می‌باشد، به‌طوری‌که ترکیب مناسب اکسین و سیتوکینین سبب القا تقسیم سلولی و تمایز سلولی و موجب اندام‌زایی می‌گردد. لیبلی و همکاران (۱۹۹۰) و میگویل و همکاران (۱۹۹٦) روی *Prunus dulcis* Mill. مشاهده کردند که هیچ مورد شاخه‌زایی در محیط کشت بدون NAA صورت نگرفت.

نوع گونه، زمان نمونه‌گیری و سایر عوامل محیطی مانند شرایط پرورش درخت و یا حتی کیفیت متفاوت مواد مورد استفاده در محیط کشت می‌تواند در کشت بافت گیاهی مؤثر باشد.

آزمایش چهارم- ریشه‌زایی نوساقه: در این پژوهش بیش‌ترین درصد ریشه‌زایی و تعداد ریشه در محیط کشت شامل ۱ میلی‌گرم در لیتر IBA با ۱ هفته قرار گرفتن در تاریکی به‌دست آمد. در هفته اول که اکسین توسط بافت گیاه جذب می‌شود اگر در برابر نور قرار گیرد اکسیده و بی‌اثر می‌گردد بنابراین تاریکی برای تمامی تیمارها اعمال گردید. آنی‌رود و کانوار (۲۰۰۸) ریشه‌زایی *Pyrus pyrifolia* را با استفاده از تیمارهای NAA و IBA و ترکیبی از هر دو هورمون در غلظت‌های ۰/۱۲۵، ۰/۲۵، ۰/۵، ۱ و ۲ و همین‌طور تیمارهای هورمونی بالا در ترکیب با PG در غلظت‌های ۰، ٤۰، ۸۰ و ۱٦۰ میلی‌گرم در لیتر در محیط MS ۱/۲ را مورد بررسی قرار دادند. بیش‌ترین میزان ریشه‌زایی (۸٦/۲۹ درصد) و تعداد ریشه (۱۳/۱ عدد) در ترکیب ۱٦۰ میلی‌گرم در لیتر PG و ۰/۲۵ میلی‌گرم در لیتر NAA+IBA به‌دست آمد. تفاوت درصد ریشه‌زایی با این پژوهش می‌تواند به‌دلیل تفاوت سطح هورمون‌های درونی، حساسیت به سطوح مختلف IBA، ژنوتیپ و پتانسیل تولید ریشه باشد. IBA به‌طور معمول برای

تحریک آغازش ریشه در کشت درون‌شیشه‌ای به سبب تأثیر بر توسعه سلولی، بزرگ شدن سلول‌ها و تقسیم بافت مورد استفاده قرار می‌گیرد. تمایز آغازین‌های ریشه از سلول‌های پارانشیم فلوئم[1] بستگی به نوع و غلظت اکسین مورد استفاده دارد تا قادر باشند به علایم و سیگنال‌های ارگانوژنیک پاسخ دهند.

در این پژوهش از PG در غلظت ٤٠ میلی‌گرم در لیتر نیز استفاده شد. PG یک ترکیب فنلی است که ریشه‌زایی را در برخی گونه‌های متعلق به خانواده Rosaceae و در حضور اکسین به‌دلیل توسعه بافت گزیلم و کلروپلاست و یا افزایش سطوح IAA از طریق اکسیداز کردن و یا پراکسیداز نمودن IAA افزایش می‌دهد (گنجی‌مقدم و همکاران، ۱۳۸۷). در نتایج ریشه‌زایی این پژوهش، افزایش غلظت IBA (در غلظت‌های ۳ و ٤ میلی‌گرم در لیتر) سبب نکروزه شدن و مرگ گیاهچه شد که با نتایج ماهاریک و همکاران (۲۰۰۹) روی *C. sinaica* هم‌خوانی دارد. غلظت بالای اکسین به‌دلیل رقابت در اتصال روی محل‌های گیرنده، بازدارنده رشد هستند، زیرا افزایش غلظت، احتمال اشغال محل‌های گیرنده به‌وسیله مولکول‌هایی که تا حدودی به‌هم چسبیده‌اند را افزایش می‌دهد و از این طریق باعث تأثیر کم‌تر کمپلکس هورمون اکسین می‌شوند (آل- ماناسراه، ۲۰۱۲). در این پژوهش پس از ۵ واکشت ماهیانه ریشه‌زایی مشاهده گردید. در پژوهش نس و همکاران (۲۰۱۲) روی *C. aronia* بعد از ۲ سال واکشت کردن گیاهچه‌ها ریشه‌زایی حاصل شد.

این پژوهش با دست‌یابی به پروتکل استقرار و میزان بالای شاخه‌زایی (تا ٤٠ شاخه بر ریزنمونه) گونه *C. pseudoheterophylla* Pojark.، امکان انجام سایر طرح‌های تحقیقاتی برای تجاری‌سازی این پروتکل را فراهم می‌نماید. نظر به کسب ۲۵ درصد ریشه‌زایی، ضروری است به‌منظور تکثیر تجاری و به‌دست آوردن پروتکل ریشه‌زایی گونه این پژوهش، تیمارهای مختلفی با انواع هورمون‌هایی ریشه‌زایی و محیط‌های کشت در دستور پژوهش سایر پژوهشگران قرار گیرد.

سپاسگزاری

نویسندگان از سرکار خانم اکرم صفری مسئول آزمایشگاه پژوهشکده تحقیقات گل و گیاهان زینتی محلات و آقای غلامرضا گودرزی معاونت محترم پژوهشی مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی اراک به سبب همکاری در اجرای این پژوهش سپاسگزاری می‌نمایند.

1- Phloem

منابع

1.Aghakhani, S. and Metaji, A. 2010. The study of ecological and seriate structure of Markazi province jungles (Case study: Shazand city oak jungles). Plant Ecophysiology (Arsanjan Branch). 1: 3. 54-62. (In Persian)

2.Al-Manasrah, W.S. 2012. In vitro propagation of *Crataegus aronia* L. and secondary metabolites detection. M.Sc. Thesis. Palestine Polytechnic University. Deanship of Higher Studies and Scientific Research. Master Program of Biotechnology. 99p.

3.Anirudh, T. and Kanwar, J.S. 2008. Micropropagation of 'Wild pear' *Pyrus pyrifolia* (Burm F.) Nakai. II. Induction of Rooting. Not. Bot. Hort. Agrobot. Cluj. 36: 2. 104-111.

4.Ansar, A., Touqeer, A., Nadeem, A.A. and Ishfaq, A.H. 2009. Effect of different media and growth regulators on in vitro shoot proliferation of olive cultivar 'moraiolo'. Pak. J. Bot. 41: 2. 783-795.

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

6.Bonga, J.M. and Aderkas, P.V. 1992. In vitro Culture of Trees. Kluwer Academic Publishers. 236p.

7.Bujarska-Borkowska, 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. and Tonelli, M. 2010. Improved micropropagation of azarole (*Crataegus azarolus* L.). Propagation of Ornamental Plants. 10: 1. 9-13.

9.Dejempor, G., Garigoriyan, V., Majidi, A. and Asgharzadeh, N.A. 2007. Sterilization, establishment and proliferation of some *Prunus* interspesific hybrids for in vitro culture. J. Hort. Sci. Technol. 8: 3. 164-174. (In Persian)

10.Driver, J.A. and Kuniyuki, A.H. 1984. In vitro propagation of Paradox walnut root stocks (*J. hindisii* × *J. regia*). Hort. Sci. 9: 507-509.

11.Enjarlic, F. and Lardet, L. 1988. Contamination of primary culture in tropical areas. Acta Horticulturae. 225: 57-65.

12.Gangi Moghadam, E., Bolandi, A.R. and Anahid, S. 2008. Micropropagation of four selected dwarf mahaleb (*Prunus mahaleb* L.) genotypes. Pajouhesh & Sazandegi. 79: 54-61. (In Persian)

13.Gökbunar, L. 2007. In vitro micropropagation of howthorn (*Crataegus* sp.). M.Sc. Thesis. kahramanmaras sutcu imam university institute of natural and applied science. 42p.

14.Iapichino, G. and Airò, M. 2009. Multiplication of *Crataegus monogyna* by in vitro culture of nodal segments. ISHS Acta Horticulturae 812: III International Symposium on Acclimatization and Establishment of Micropropagated Plants.

Pp: 135-140.
15.ISTA [International Seed Testing Association]. 2008. Annexe to chapter seed health testing methods. 199p.
16.Khatamsaz, M. 1992. Flora of Iran: Rosaceae. Research Institute of Forests and Rangelands. 6: 241-267.
17.Kumar Rajesh, B.L.D. 2002. Micropropagation of hawthorn (*Crataegus oxyacantha* Linn.) through shoot tip culture. Ind. J. Hort. 59: 4. 435-439.
18.Leblay, C., Chevreau, E. and Raboin, L.M. 1990. Adventitious shoot regeneration from in vitro leaves of several pear cultivars (*Pyrus communis* L.). Plant Cell Tissue and Organ Culture. 25: 99-105.
19.Lloyd, G. and McCown, B. 1980. Commercially feasible micropropagation of mountain laural (*Kalmla latlfolia*) by use of shoot tip cultures. Combined Proceedings. International Plant Propagators' Society. 30: 421-427.
20.Maharik, N., Elgengaihi, S. and Taha, H. 2009. In vitro mass propagation of the endangered Sinai howthorn *Crataegus sinaica* Boiss. Inter. J. Acad. Res. 1: 1. 24-29.
21.Mahdaviyan, M., Bouzari, N. and Abdollahi, H. 2010. Effects of culture media and growth regulators on proliferation and rooting of a vegetative mahaleb rootstock (SL-64). Seed Plant Improv. J. 1: 1-26. 15-26. (In Persian)
22.Miguel, C.M., Druart, P. and Oliveira, M.M. 1996. Shoot regeneration from adventitious buds induced on juvenile and adult almond (*Prunus dulcis* Mill.) explants. In Vitro Cellular Developmental. Biology Plant. 32: 148-153.
23.Mozaffarian, V. 2004. Trees and shrubs of Iran. Farhang-e Moaser Press. 1003p. (In Persian)
24.Muna, A., Ahmad, A., Mahmoud, K. and Abdul-Rahman, K. 1999. In vitro propagation of a semi-dwarfing cherry rootstock. Plant Cell. Tissue and Organ Culture. 59: 203-208.
25.Murashige, T. and Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissue culture. Physiologia Plantarum. 15: 473-597.
26.Nas, M. and Read, P.E. 2004. A hypothesis for the development of a defined tissue culture medium of higher plants and micropropagation of hazelnuts. Scientia Horticulturae. 101: 189-200.
27.Nas, M.N., Gokbunar, L., Sevgin, N., Aydemir, M., Dagli, M. and Susluoglu, Z. 2012. Micropropagation of mature *Crataegus aronia* L., a medicinal and ornamental plant with rootstock potential for pome fruit. J. Plant Growth Reg. 67: 1. 57-63.
28.Pati, P.K., Rath, S.P., Sharma, M., Sood, A. and Ahuja, P.S. 2006. In vitro propagation of rose-a review. Biotechnology Advances. 24: 1. 94-114.
29.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. and Campbell, C.S. 2007. Phylogeny and Classification of Rosaceae. Plant Systematics and Evolution. 266: 5-43.

30.Quoirin, M. and Lepoivre, P. 1977. Elude de milieux adaptes aux cultures in vitro de Prunus. Acta Horticulturae. 78: 437-442.

Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources
J. of Wood & Forest Science and Technology, Vol. 21 (3), 2014
http://jwfst.gau.ac.ir

Micropropagation of *Crataegus pseudoheterophylla* Pojark. via *in Vitro* Culture

F. Ahmadloo[1], *M. Tabari Kouchaksaraei[2], P. Azadi[3], A. Hamidi[4] and E. Beiramizadeh[5]

[1]Ph.D student of Forestry, Faculty of Natural Resources, Tarbiat Modares University, Noor,
[2] Prof., Faculty of Natural Resources, Tarbiat Modares University, Noor,
[3]Assistant Prof., Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran, Karaj,
[4]Assistant Prof., Seed and Plant Certification and Registration Institute, Karaj,
[5]Research Instructor and Scientific Board Member, National Research Center of Ornamental Plants, Mahallat
Received: 04/08/2013; Accepted: 10/18/2014

Abstract

Crataegus from Rosaceae family is a tree which has medical, ornamental and commercial utilizations. Study was conducted for evaluation micropropagation of *Crataegus pseudoheterophylla* Pojark. Including sterilization, establishment, proliferation and rooting. For disinfection, explants were taken in spring and autumn and rinsed under running tap water for 30 min then dipped in 70% ethanol for 30 s followed by immersion in ClONa 1.5% and 2% for 10, 15 and 20 minutes. MS, WPM and DKW media were used for initial establishment. Proliferation was conducted on MS and WPM media supplemented with different concentrations of BAP and NAA and rooting of shoots was done in 1/2 MS medium supplemented with different concentrations of IBA. Results indicated that the best method of sterilization was obtained in ClONa 1.5% for 15 minutes in spring and the best medium of establishment was obtained on MS medium with maximum shoot length (3.5 cm) and the survival rate (90.33 percent). The best treatment for proliferation was 8 mg / l BAP plus 2 mg / l NAA with 39.33 shoot numbers on MS medium supplemented with 40 mg / l PG.

Keywords: *Crataegus pseudoheterophylla* Pojark., Bud culture, Micropropagation, BAP, NAA

* Corresponding Authors; Email: mtabari@modares.ac.ir