به‌نژادی گیاهان زراعی و باغی
دوره ۳ ■ شماره ۱ ■ بهار و تابستان ۱۳۹۴
صفحه‌های ۱-۱۲

تأثیر محیط کشت ریزنمونه و سیتوکینین‌های مختلف در ریزازدیادی کاج مطبق (*Araucaria excelsa*R.)

میترا تقی‌پور[۱]، رحیم حداد[۲]*، مریم قنادنیا[۳]

۱. کارشناس ارشد بیوتکنولوژی کشاورزی، گروه بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشکدهٔ فنی و مهندسی، دانشگاه بین‌المللی امام‌خمینی(ره)، قزوین
۲. دانشیار گروه بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشکدهٔ فنی و مهندسی، دانشگاه بین‌المللی امام‌خمینی(ره)، قزوین
۳. استادیار گروه بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشکدهٔ فنی و مهندسی، دانشگاه بین‌المللی امام‌خمینی(ره)، قزوین

تاریخ وصول مقاله: ۱۳۹۳/۰۷/۱۲ تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۴/۰۴/۱۶

چکیده

به‌منظور بررسی اثر محیط کشت، ریزنمونه و سیتوکینین‌ها بر کاج مطبق آزمایشی به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی در ۳ تکرار در دانشگاه بین‌المللی امام‌خمینی(ره) قزوین در سال ۱۳۹۲ اجرا شد. کاج مطبق (*Araucaria excelsa*) از خانوادهٔ آروکاریاسه[۱] و بومی جزیرهٔ نورفک در استرالیاست. این گیاه به‌منزلهٔ یک گیاه زینتی چوبی، ارزش تجاری زیادی دارد. ازآنجاکه این گیاه از طریق بذر تکثیر می‌شود، دستیابی به یک روش ریزازدیادی برای آن یکی از اهداف مهم در کشت بافت گیاهان چوبی به حساب می‌آید. به‌منظور بررسی تأثیر محیط کشت‌ها و سیتوکینین‌ها طی فرایند اندام‌زایی مستقیم برای القای جوانه‌های جانبی در ریزنمونه[۲]ها، از ۳ سیتوکینین مختلف (تیدیازرون[۳]، کاینتین[۴] و 2ip) و ۴ محیط کشت (WPM، BE، ½MS و TE) استفاده شد. ریزنمونهٔ ساقهٔ میانی بهترین ریزنمونه، 2ip به‌منزلهٔ بهترین هورمون در القای جوانه‌های جانبی و همچنین محیط TE و WPM بهترین محیط‌ها برای صفات بررسی‌شده و ریزازدیادی کاج مطبق هستند. نتایج همبستگی نیز نشان‌دهندهٔ همبستگی مثبت بین تعداد جوانه‌ها، طول جوانه‌ها و ۳ شاخص کلروفیل بررسی‌شده بودند. به‌طورکلی، تولید ریزساقه‌ها به نوع هورمون به‌کاررفته و محیط کشت بستگی دارد. نتایج ریشه‌زایی نشان داد که تنها هورمون BAP قادر به تولید ریشه در ریزساقه‌ها بود. لازم به یادآوری است که بررسی مقدار کلروفیل و همچنین تعیین بهترین محیط کشت، برای اولین‌بار در کاج مطبق گزارش می‌شود.

کلیدواژه‌ها: آروکاریا، اندام‌زایی، ریشه‌زایی، کلروفیل، هورمون.

1. Araucariaceae
2. Explant
3. Thidiazuron
4. Kinetin

* نویسنده مسئول Email: raheemhaddad@yahoo.co.uk

مقدمه

کاج مطبق (*Araucaria excelsa*R.) یک گیاه از خانوادهٔ *Araucariaceae* است. به‌طور معمول، کاج مطبق جزء گیاهان گلخانه‌ای محسوب می‌شود (۳). ازدیاد این گیاه از طریق بذر صورت می‌گیرد. گیاهچه‌های زیادی در بسیاری از گیاهان گونه‌های مخروطیان با موفقیت از طریق ریزنمونه‌های مختلف تکثیر شده‌اند. کاج مطبق به‌دلیل تقارن شاخساره‌هایش جزء گیاهان باارزش و زینتی است (۱۷). شایان ذکر است که منابع محدودی در مورد ریزازدیادی کاج مطبق و خانوادهٔ آروکاریاسه وجود دارد.

براساس پژوهش‌های انجام‌شده در سال ۱۹۸۸، تکثیر درون‌شیشه‌ای *Araucaria cunninghamii* و دیگر گونه‌های آروکاریاسه از طریق مریستم‌های جانبی بررسی شد و در محیط BM از مریستم‌های جانبی پنهان، جوانه‌های عمودگرا تولید شد که این فرایند برای چندین گونهٔ آروکاریا و نیز *Aghathsrobusta* موفقیت‌آمیز بود (۶). تولید کالوس از ریزنمونه‌های کاج مطبق (*Araucaria exelsa*L.) در شرایط درون‌شیشه‌ای به‌منظور باززایی گیاه کامل بررسی شد و پینه‌زایی در هر ۲ محیط کشت تنها در حضور پیکلورام و فقط در تاریکی مشاهده شد. اما در محیط کشت BM کالوس‌های بیشتری نسبت به محیط کشت MS تولید شد و میزان آن در ریزنمونه‌های ساقه نسبت به برگ زیادتر بود (۱). جنین‌زایی سوماتیکی در کاج مطبق (*Araucaria heterophylla*) بررسی شد. مناسب‌ترین محیط کشت کالوس‌زایی محیط ½MS حاوی ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D و ۱۰ میلی‌گرم در لیتر NAA و ۲ میلی‌گرم در لیتر کاینتین بود (۳).

از ساقه‌های افق‌گرا به‌منزلهٔ ریزنمونه در کشت بافت *Araucaria excelsa*R. Br. var. glauca استفاده کردند (۱۷). در این پژوهش، طی آزمایش‌های جداگانه ریزنمونه‌های گوناگون شامل ساقهٔ افق‌گرای انتهایی اولیه، ساقهٔ افق‌گرای انتهایی ثانویه و ساقهٔ افق‌گرای زیر انتهایی، تحت‌تأثیر تیمارهای BA (۰، ۳، ۶، ۱۲ و ۲۴ میکرومول)، TDZ (۰، ۰/۳، ۰/۶، ۱/۲و ۲/۴ میکرومول) و IBA و NAA (۱، ۲ و ۳ میکرومول)، بررسی شدند. نتایج نشان داد که ساقه‌های انتهایی اولیه و ثانویه واکنشی به تیمارهای هورمونی نشان ندادند. ریزنمونه‌های استفاده‌شده همچنان رشد افق‌گرایی خود را حفظ کردند که استفاده از محیط جامد یا مایع هیچ تأثیری در ریشه‌دهی نداشت (۱۷). گیاهچه‌های *Araucaria excelsa*R. Br. var. glauca تکثیریافته در شرایط درون‌شیشه از نظر یکنواختی ژنتیکی با انگشت‌نگاری RAPD ارزیابی شد (۱۷). نهال‌های سه‌سالهٔ کاج مطبق برای این پژوهش استفاده شد. نتایج نشان داد که گیاهچه‌های باززایی‌شده در شرایط درون‌شیشه به نهال‌های اولیه شبیه‌اند (۱۸). باززایی تعدادی از مخروطیان در شرایط *in vitro* مشکل است و این گیاهان نسبت به غلظت‌های سیتوکینین‌ها در محیط کشت حساس‌اند، اما باززایی چند گونه از جنس آروکاریا در چند پژوهش با استفاده از ریزنمونه‌های مختلف گزارش شده است (۱۹).

با توجه به مطالب فوق و پژوهش‌های انجام‌شده در سال‌های اخیر از ریزنمونهٔ ساقهٔ اصلی برای به‌دست آوردن فناوری کشت بافت این گیاه در این آزمایش استفاده شد. هدف پژوهش حاضر بررسی ریزازدیادی کاج مطبق با استفاده از تکنیک اندام‌زایی مستقیم (با استفاده از جوانه‌های جانبی) و تأثیر ۴ محیط کشت مختلف بر اندام‌زایی آن است.

مواد و روش‌ها

نهال‌های یکسالهٔ کاج مطبق از مؤسسهٔ پرورش گل حسنی واقع در چهارباغ کرج تهیه و برای اجرای آزمایش به آزمایشگاه کشت بافت گیاهی دانشگاه بین‌المللی

امام‌خمینی(ره) قزوین منتقل شد. به‌منظور ضد عفونی ریزنمونه‌ها ابتدا کل اندام هوایی گیاه به‌مدت ۵ ساعت زیر جریان آب شیر قرار گرفتند و گندزدایی سطحی شدند. سپس ساقهٔ اصلی جدا و برای ادامهٔ کار به زیر لامینرایرفلو منتقل شد. ریزنمونه‌ها ابتدا به‌صورت لحظه‌ای در الکل ۹۶ درصد فرو برده شدند و بعد از شست‌وشو با آب مقطر استریل به‌مدت ۱۵ دقیقه در محلول هیپوکلرید سدیم ۳ درصد حاوی توین ۲۰ قرار گرفتند. سپس ۴ بار هر یک به‌مدت ۵ دقیقه در آب مقطر استریل غوطه‌ور و آبکشی شدند. به اندازهٔ ۵ میلی‌متر از قسمت‌های انتهایی گیاه به‌دلیل انسداد احتمالی آوندها بر اثر تماس با مواد ضد عفونی کننده، بریده شدند و در آخر ریزنمونه‌های آماده‌شده به طول ۰/۷ـ ۱ سانتی‌متر تقسیم شدند.

ابتدا به‌منظور تعیین بهترین قسمت ساقه برای تولید گیاهچه‌های جدید، یک طرح کاملاً تصادفی با ۳ تکرار که شامل ۳ ریزنمونه در هر تکرار بود، طراحی شد. نمونه‌ها که شامل ۳ قسمت ساقه (بالایی، میانی و پایینی) بودند در محیط MS که حاوی۰/۵ میکرومولار هورمون کاینتین بود، به‌مدت ۲ ماه در اتاق رشد با فتوپریود ۱۶ ساعت روشنایی تحت دمای ۲۵°C قرار گرفتند. ریزنمونه‌ها هر ۳ هفته یک‌بار واکشت شدند. بعد از ۸ هفته یادداشت‌برداری از صفات انجام شد.

بعد از انتخاب بهترین ریزنمونه، به‌منظور تأثیر محیط کشت‌های مختلف بر میزان ساقه‌زایی، طول ساقه‌ها و مقدار سبزینگی ریزساقه‌های تولیدشده، ۴ محیط کشت مختلف (۱۳) ½MS، (۲۳)TE، (۱۲) WPM و (۲۵) BM در این آزمایش بررسی شد. این آزمایش به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۳ تکرار که هر تکرار شامل ۳ ریزنمونه بود وتحت‌تأثیر ۳ سیتوکینین مختلف کاینتین (۰/۷۵ میکرومولار (۰/۱۶ mg))، 2ip (۰/۵ میکرومولار (۰/۱ mg)) و تیدیازرون (۰۰۲/ میکرومولار (۰/۰۰۴ mg)) قرار داشتند، طراحی شد. هر ۴ محیط حاوی ۳۰ گرم در لیتر ساکارز و ۸ گرم در لیتر آگار (Agar-Agar Merck) بودند. اسیدیتهٔ محیط‌های کشت قبل از اتوکلاو کردن و افزودن آگار با اسید کلریدریک بین ۵/۷ـ ۵/۸ تنظیم شد. درنهایت نمونه‌ها، به‌مدت ۲ ماه در اتاق رشد با فتوپریود ۱۶ ساعت روشنایی تحت دمای ۲°C ± ۲۵ قرار گرفتند.

برای بررسی دقیق‌تر تفاوت رنگ در ریزساقهٔ تولیدشده، از سنجش میزان کلروفیل استفاده شد. به‌منظور استخراج کلروفیل، یک گرم بافت برگ در ازت مایع با استفاده از هاون به‌خوبی پودر شده و به آن ۳ میلی‌لیتر بافر Tris-HCl ۵۰۰mM با اسیدیتهٔ ۷ حاوی ۱mM سدیم دی اتیل دی تیو کاربامات[1] اضافه شد. سپس ۲۰۰ میلی‌لیتر از بافت برگی و بافر استخراج به ۸۰۰ میلی‌لیتر استون سرد اضافه و به‌مدت یک ساعت در دمای ۲۰°C- انکوبه شد و بعد در ۱۳ هزار دور در دقیقه به‌مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شد و از عصارهٔ بالایی برای اندازه‌گیری میزان کلروفیل کل، کلروفیل a و کلروفیل b در طول موج‌های A=۴۴۵ و B=۴۶۳ نانومتر توسط اسپکتروفتومتر استفاده شد. کلروفیل کلیهٔ نمونه‌ها در ۳ تکرار اندازه‌گیری شد و اعداد به‌دست‌آمده در فرمول‌های زیر برحسب (µg/ml) محاسبه شد (۴):

کلروفیل a= (12.7×B)–(2.96×A) (۱)

کلروفیل b= (22.9×A)–(4.68× B) (۲)

کلروفیل کل= (20.2×A)+(8.02×B) (۳)

پس از گذشت ۳ ماه، ریزساقه‌های[2] تولیدشده به‌منظور تولید ریشه به محیط‌های ریشه‌زایی منتقل شدند. بدین منظور، محیط کشت ½MS حاوی ۴ سطح BAP و IAA (۰، ۲، ۴ و ۸ میکرومول در لیتر که معادل ۰، ۰/۳۵، ۰/۷ و

1. Sodium diethylditiocorbamat
2. Microshoots

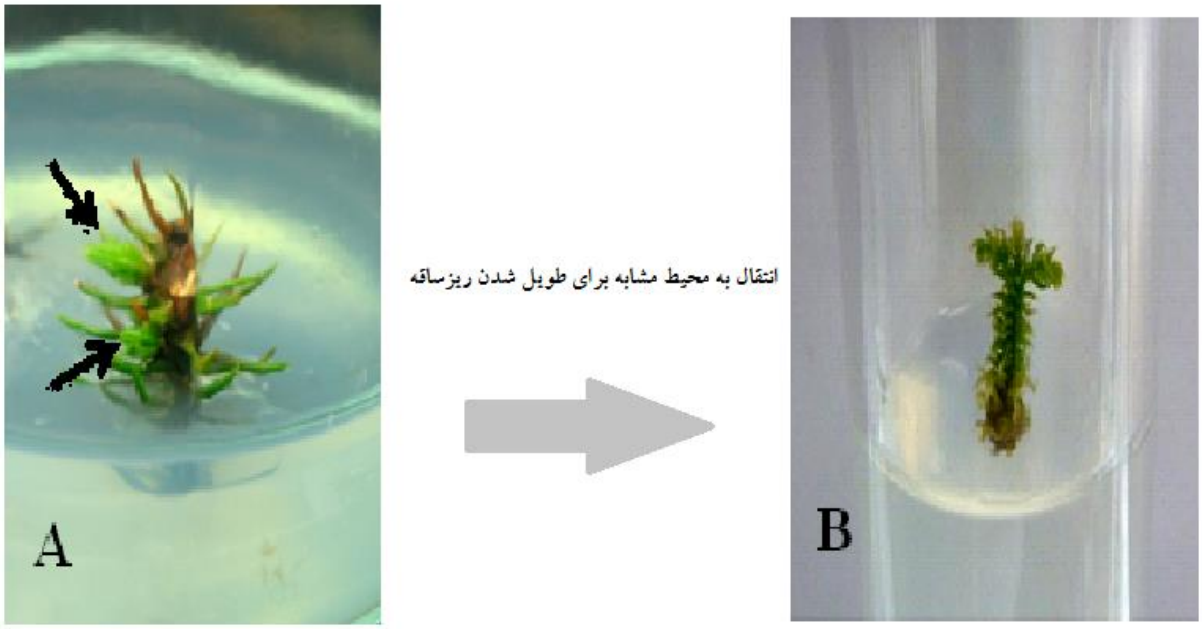
۱/۴ میلی‌گرم IAA و صفر، ۰/۴۵، ۰/۹ و ۱/۸ میلی‌گرم در لیتر BAP بود) تیمار و در قالب طرح کاملاً تصادفی اجرا شد. نمونه‌ها در دمای ۲۵°C و فتوپریود ۱۶ ساعت روشنایی اعمال شد. نمونه‌ها هر ۴ هفته یک‌بار واکشت شدند. تجزیهٔ داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار Excel و SPSS 16.0 انجام شد. مقایسهٔ میانگین داده‌ها با استفاده از آزمون چنددامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ۵ درصد انجام شد.

نتایج و بحث

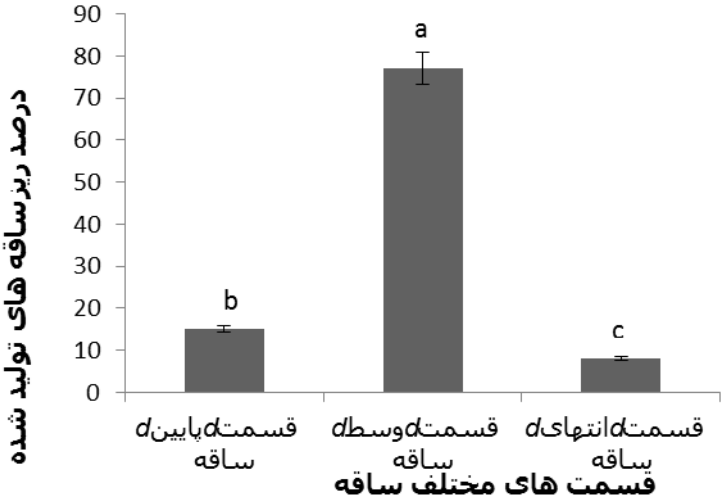
اثر ریزنمونه

در این بررسی، بعد از گذشت ۸ هفته تعداد نمونه‌هایی که تولید ریزساقه کرده بودند را در هر تیمار (هر یک از ریزنمونه‌ها به‌منزلهٔ یک تیمار در نظر گرفته شدند.) شمارش شدند و براساس نتایج به‌دست‌آمده از بین ریزنمونه‌های آزمایش‌شده، قسمت وسط به‌منزلهٔ بهترین ریزنمونه شناخته شد (شکل ۱). به‌طور دقیق‌تر می‌توان گفت قسمت میانی ساقه و بعد از آن قسمت پایینی ساقه هر کدام به‌ترتیب با ۷۷ و ۱۵ درصد ساقه‌زایی به‌منزلهٔ بهترین ریزنمونه شناخته شدند ولی قسمت انتهای ساقه یعنی قسمت نزدیک به مریستم کمترین درصد جوانه‌زنی را داشت (شکل ۲).

واکنش‌های گوناگون ریزنمونه‌های مختلف یک گونه به محیط غذایی یکسان می‌تواند به‌دلیل شرایط درون‌سلولی ویژهٔ یک ریزنمونه ازجمله نوع و میزان هورمون‌های رشدی درون گیاه و غیره باشد (۲۰). باززایی در ریزنمونه‌های گرفته‌شده از بافت‌های بالغ گیاهان چوبی نسبت به بافت‌های جوان آن با موفقیت کمتری انجام شد. این موضوع می‌تواند به‌دلیل تغییرات فراوانی که از نظر فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی در مرحلهٔ انتقال از جوانی به بلوغ در این گیاهان رخ می‌دهد باشد. هورمون‌های گیاهی و غلظت آن‌ها نقش مهمی در پاسخ ریزنمونه‌ها به اندام‌زایی و تغییرات فازی طی ریزازدیادی گیاه دارند (۸).



شکل ۱. A) ایجاد ریزساقه از ریزنمونهٔ ساقهٔ میانی در محیط حاوی کاینتین؛ B) طویل‌شدن و تشکیل گیاهچه‌های قوی در محیط مشابه



شکل ۲. درصد ساقه‌زایی در کشت قسمت‌های مختلف ساقهٔ کاج مطبق

طی گزارشی که در سال ۲۰۰۴ دربارهٔ تأثیر ترکیبات نمکی مختلف، منابع کربن مختلف، سیتوکینین‌ها و اکسین‌ها در ساقه‌زایی کاج با استفاده از ریزنمونهٔ کوتیلدون منتشر شد بیشترین تعداد ساقه‌ها در طول ریزنمونه‌های کوتیلدونی و به‌طور عمده در قسمت انتهایی کوتیلدون (نزدیک به بخش هیپوکوتیل) در تمام محیط‌های حاوی سیتوکینین و اکسین به‌وجود آمد (۲۲). نتیجهٔ آزمایش حاضر با نتیجهٔ پژوهش فوق مطابقت ندارد. این تفاوت می‌تواند ناشی از اختلاف سن ریزنمونه‌های استفاده‌شده در این دو آزمایش باشد. دلیل دیگر این تفاوت را می‌توان به اختلافات ژنوتیپی نسبت داد، به‌طوری‌که دیگر پژوهشگران نیز به این نتیجه رسیدند که توسعه و تمایز ساقه به‌شدت تحت‌تأثیر ژنوتیپ درختان است (۷).

تأثیر عوامل مختلف در ساقه‌زایی

با توجه به نتایج تجزیهٔ واریانس فرایند ساقه‌زایی هر ۳ عامل سیتوکینین‌ها، محیط و اثر متقابل این دو در صفات بررسی‌شده مؤثر بودند که در ادامه هر یک از این عوامل بررسی شدند (جدول ۱).

جدول ۱. تجزیهٔ واریانس آنزیم‌ها و تعداد جوانه طی فرایند ساقه‌زایی

منابع تغییرات	درجهٔ آزادی	میانگین مربعات				
		تعداد جوانه در هر ریزنمونه	طول جوانه	مقدار کلروفیل کل	کلروفیل a	کلروفیل b
محیط	۳	۸/۱۳*	۷/۱۷ ns	۳۴/۰۱**	۳۰/۱۵**	۸۰/۹**
هورمون	۳	۲۱/۸**	۲۴۹/۷۵**	۸۹/۴**	۱۸۴/۴**	۲۶۶**
هورمون× محیط	۹	۱/۲۶ ns	۶/۹۸ ns	۹/۹۶**	۱۰/۱۲**	۲۰/۹**
Error	۳۲	۲/۱۵ ns	۱۵/۹ ns	۰/۴۶ ns	۰/۶۴ ns	۱/۰۱ ns
Total	۴۸	–	-	-	–	–
C.V%	–	۲۶	۳۳	۲۱	۱۲	۳۹

** معنادار بودن در سطح احتمال ۱ درصد ns غیرمعنادار

اثر سیتوکینین‌ها

بررسی منابع در مورد ساقه‌زایی گیاهان چوبی به‌ویژه بازدانگان نشان می‌دهد که هورمون تیدیازرون، کاینتین و 2ip بیشترین کاربرد را در ساقه‌زایی داشته‌اند (۶، ۲۰، ۱۰ و ۱۷). با توجه به نتایج به‌دست‌آمده هورمون 2ip بیشترین تأثیر را در مورد صفات تعداد و طول جوانه‌ها و مقدار کلروفیل کل داشت، اما در مورد صفات کلروفیل a و b هورمون کاینتین مناسب‌تر بود (جدول ۲).

جدول ۲. مقایسهٔ میانگین دانکن تأثیر هورمون‌ها در تعداد جوانه، طول جوانه و مقدار کلروفیل جوانه‌های تولیدشده

تیمار	تعدا جوانه در هر ریزنمونه	میانگین طول جوانه‌ها (mm)	مقدار کلروفیل کل (µg/ml)	مقدار کلروفیل a (µg/ml)	مقدار کلروفیل b (µg/ml)
۰/۷۵ میکرومول کاینتین	۲/۶۶ ±۰/۴ab	۸/۴۲± ۱/۰ab	۵/۱ ± ۰/۲ b	۹/۱۱±۰/۲۳a	۱۱/۱± ۰/۳a
۰/۵ میکرومول 2ip	۳/۳۳ ±۰/۴۲a	۱۱ ± ۱/۱ a	۶/۵۵ ±۰/۴a	۸/۶۳±۰/۲a	۹/۵۶±۰/۲b
۰/۰۲۲میکرومول تیدیازرون	۱/۵۹ ±۰/۳ b	۵/۴ ± ۰/۲ b	۲/۸± ۰/۲ c	۵/۰۱±۰/۱b	۵/۲۵ ±۰/۴ c
شاهد	۰/۲۵ ±۰/۰۴ c	۰/۴۲ ±۰/۰۵c	۰/۳۲±۰/۰۵d	۰/۶۵±۰/۱b	۰/۶۳ ±۰/۰۴ d

مطابق آزمون دانکن، میانگین‌های دارای حروف مختلف بیانگر اختلاف معنادار در سطح احتمال ۵ درصد هستند.

این نتیجه در مورد صفات تعداد جوانه و طول آن‌ها با نتایج دیگر پژوهش‌ها مطابقت دارد (۱۷). استفاده از ۰/۵ میکرومولار 2ip بیشترین اثر مثبت را روی تعداد جوانه‌ها و طول آن‌ها دارد (۱۷). همچنین غلظت ۴/۹ میکرومول 2ip منجر به تولید ۱/۶۲ جوانه در *Pinushelderichii* شده است (۲۱). بعد از 2ip، سیتوکینین کاینتین و سپس تیدیازرون تأثیر مثبتی در ایجاد جوانه‌ها داشتند. این نتیجه با بعضی از گزارش‌ها که تیدیازرون را بسیار مؤثر می‌دانستند متفاوت است که این موضوع می‌تواند به‌دلیل نوع ریزنمونه، شرایط فیزیولوژیکی گیاه مادری و القای بیان ژن توسط سیتوکینین‌ها باشد که نقش مهمی در تشکیل ساقهٔ جانبی دارند. استفاده از ۶ میکرومول تیدیازرون سبب تولید بیشترین ساقه‌زایی در کاج سفید می‌شود (۲۴). همچنین تیدیازرون به‌منزلهٔ یکی از اجزای مهم محیط‌های کشت به‌منظور القای باززایی تعدادی از گونه‌های گیاهی معرفی شد (۱۴). به‌منظور بررسی اثر تیدیازرون در ایجاد ساقه‌های جانبی و نابجا از سرشاخه‌های جوان کاج مدیترانه‌ای، غلظت‌های مختلف تیدیازرون به‌کار گرفته شد (۱۰). کاربرد ۴۴/۴ میکرومول تیدیازرون به‌مدت ۶ روز در محیط DCR و واکشت ریزنمونه‌ها در محیط عاری از هورمون و غنی‌شده با زغال فعال سبب تولید ۱۷ـ ۱۹ ساقهٔ جانبی در محور جنینی شد. به‌طورکلی، این نتیجه حاصل شد که تیدیازرون مؤثرترین هورمون در القای اندام‌زایی در کاج مدیترانه‌ای بود (۱۰). به‌منظور دستیابی به یک پروتکل برای کشت بافت *Ston pine* L. از جوانه‌های جانبی گیاه به‌منزلهٔ ریزنمونه استفاده شد (۷). در این آزمایش از متاتوپلین، تیدیازرون و BAP در غلظت‌های مختلف استفاده کردند که نتایج نشان داد که استفاده ۱/۵ میکرومولار تیدیازرون بهترین نتیجه را در توسعه و تمایز ساقه‌ها (۵۹ درصد) داشت (۱۴). جوانه‌های جوان سطوح متفاوت از بازه‌های سیتوکینین در مقایسه با جوانه‌های بالغ دارند و به همین علت، کاربرد سیتوکینین بیرونی ممکن است سبب تحریک و تقویت دوبارهٔ جوانه‌های بالغ و تمایز جوانه‌های جوان شود (۲۷).

اثر محیط کشت

ازآنجاکه گونه‌های گیاهی نیازهای تغذیه‌ای متفاوتی دارند و موفقیت کشت بافت گیاهی به‌منزلهٔ یک روش تکثیر گیاه تا حد زیادی تحت‌تأثیر ترکیب محیط کشت استفاده می‌شود، از ۴ محیط کشت متفاوت استفاده شد. نتایج تجزیهٔ واریانس نشان داد که تفاوت معناداری بین ۴ محیط استفاده‌شده در مورد بیشتر صفات بررسی‌شده وجود دارد و فقط میانگین طول ریزساقه‌ها تحت‌تأثیر محیط قرار نداشت به‌طوری‌که نتایج مقایسهٔ میانگین نشان داد که در محیط WPM تعداد جوانه‌های تولیدشده که منجر به تولید ریزساقه‌ها شدند از سایر محیط‌ها بیشتر بود. محیط‌هایی که نیترات کمتری دارند برای تولید کالوس در کاج مطبق مؤثرتر است. زیرا در بیشتر سوزنی‌برگان برای مطالعات کشت بافت از محیط کشت‌های دارای نیترات پایین استفاده می‌شود (۱). به نظر می‌رسد که این نتیجه در مورد تولید ریزساقه از جوانه‌های کاج مطبق نیز درست باشد. به‌طوری‌که در محیط‌های WPM و TE که نیترات آمونیوم کمتری (۴۰۰ میلی‌گرم در لیتر) در مقایسه با محیط BM (۶۰۴ میلی گرم درلیتر) و ½MS (۸۲۵ میلی‌گرم در لیتر) دارند تعداد بیشتری جوانه تولید شد (جدول ۳).

اثر متقابل محیط در سیتوکینین‌ها

براساس نتایج مقایسهٔ میانگین در محیط WPM و TE حاوی هورمون 2ip بیشترین تعداد جوانه تولید می‌شود هرچند که تعداد جوانه‌ها در محیط WPM بیشتر است اما این تفاوت معنادار نیست و هر دو طبق مقایسهٔ میانگین دانکن در یک کلاس قرار می‌گیرند (جدول ۴). نکتهٔ درخور توجه تولید تعداد محدود جوانه در محیط WPM عاری از هورمون می‌تواند بیانگر تأثیر مثبت و اثرگذار این محیط کشت باشد. تأثیر سیتوکینین‌ها در ریزازدیادی به‌خوبی در گونه‌های کاج بررسی شده است (۱۲). محیط کشت، شرایط کشت و مقدار سیتوکینین‌های به‌کار برده‌شده، فرایند اندام‌زایی را تحت‌تأثیر قرار می‌دهد. فاکتورهای دیگری ازقبیل غلظت، نوع کاربرد و زمان نگهداری ریزنمونه‌ها در اندام‌زایی آن‌ها مؤثر است. در مورد شاخص کلروفیل کل و کلروفیل a محیط WPM حاوی کاینتین بیشترین تأثیر را داشت در صورتی که در شاخص کلروفیل b محیط TE حاوی 2ip بیشترین تأثیر را ایجاد کرد. لازم به ذکر است که به‌طورکلی، گیاهان تولیدشده در محیط WPM نسبت به سایر محیط‌ها سبزتر و قوی‌تر بودند که این نتیجه با نتایج چندین پژوهش که در سال‌های گذشته در مورد تأثیر سیتوکینین در مقدار کلروفیل انجام شده است، مطابقت دارد (۹، ۱۱ و ۲۷).

جدول ۳. مقایسهٔ میانگین تأثیر نوع محیط کشت در تعداد جوانه و مقدار کلروفیل جوانه‌های تولیدشده

محیط	تعداد جوانه در هر ریزنمونه	مقدار کلروفیل کل (µg/ml)	مقدار کلروفیل a (µg/ml)	مقدار کلروفیل b (µg/ml)
½MS	۱/۱±۰/۰۵[b]	۲/۳۵±۰/۰۶[c]	۴/۸۳±۰/۳[b]	۴/۴±۰/۱۳[c]
BE	۱/۶±۰/۲۵[b]	۲/۲۲±۰/۱[c]	۴/۸۳±۰/۱[b]	۴/۵±۰/۱۳[c]
WPM	۳±۰/۴۳[a]	۴/۵۷±۰/۱۹[b]	۷/۰۲±۰/۲۵[a]	۸/۱۳±۰/۳[b]
TE	۲/۲±۰/۲۵[ab]	۵/۶۳±۰/۱[a]	۷/۳۷±۰/۱۵[a]	۹/۵۳±۰/۲۳[a]

مطابق آزمون دانکن، میانگین‌های دارای حروف مختلف بیانگر اختلاف معنادار در سطح احتمال ۵ درصد هستند.

جدول ۴. مقایسهٔ میانگین اثر متقابل (محیط × هورمون) محیط MS، BE، WPM و TE تحت تیمارهای کاینتین، تیدیازرون و 2ip

نوع محیط کشت	هورمون	تعداد جوانه در هر ریزنمونه	مقدار کلروفیل کل(µg/ml)	مقدار کلروفیل a (µg/ml)	مقدار کلروفیل b (µg/ml)
WPM	Kin	۳/۶۷ ±۰/۶ ab	۱۲/۵ ±۲/۳a	۱۴/۸۴ ±۱/۱ a	۸/۴۴ ±۰/۴۸ ab
WPM	2ip	۴/۶۷ ±۰/۶ a	۷/۸۴ ±۱/۸ c	۹/۰۸ ±۱/۰ d	۵/۱±۰/۴۵ d
WPM	TDZ	۲/۶۷ ±۰/۲ bca	۵/۱۸ ±۱/۶ d	۶/۱ ±۰/۸۵ e	۳/۴۶ ±۰/۴ e
WPM	free	۱ ±۰/۲bc	۲/۵۸ ±۱/۱e	۲/۵۳ ±۰/۸ e	۱/۳ ±۰/۲ f
TE	Kin	۳ ±۰/۸ ab	۱۰/۱۶ ±۲/۱b	۱۲/۸۴ ±۰/۸ b	۷/۵۳ ±۰/۵ bc
TE	2ip	۴/۳۴ ±۰/۶ a	۱۰/۷ ±۲/۳ b	۱۵/۳۸ ±۱/۱ a	۹/۴۸ ±۰/۴۸ a
TE	TDZ	۱/۳۳ ±۰/۲ bc	۸/۶۲ ±۱/۸ c	۹/۹ ±۰/۸۵ cd	۵/۵۴ ±۰/۵ d
TE	free	۰±۰c	۰±۰f	۰±۰g	۰±۰g
BE	Kin	۳ ±۰/۸ ab	۸/۷۵ ±۲/۰ c	۴/۸ ±۰/۸ e	۱/۲۱ ±۰/۲ eg
BE	2ip	۲ ±۰/۵ abc	۷/۷۲ ±۱/۸ c	۱۰/۹۳ ±۰/۸۵ c	۶/۷ ±۰/۵ c
BE	TDZ	۱/۳۳ ±۰/۱ bc	۲/۸۸ ±۱/۱ e	۲/۲۵ ±۰/۸ f	۰/۹۶ ±۰/۲ eg
BE	free	۰±۰c	۰±۰f	۰±۰g	۰±۰g
½MS	Kin	۱ ±۰/۱ bc	۵/۰۳ ±۱/۶ d	۵/۷۸ ±۰/۸۵ e	۳/۲۴ ±۰/۴ e
½MS	2ip	۲/۳۳ ±۰/۶abc	۰/۲۲ ±۰/۱ e	۹/۰۸ ±۰/۹d	۴/۹۲ ±۰/۵ d
½MS	TDZ	۱ ±۰/۱ bc	۳/۳۷ ±۱/۵ e	۲/۷۸ ±۰/۸ f	۱/۲۵ ±۰/۲ eg
½MS	free	۰±۰c	۰±۰f	۰±۰g	۰±۰g

مطابق آزمون دانکن، میانگین‌های دارای حروف مختلف بیانگر اختلاف معنادار در سطح احتمال ۵ درصد هستند.

حداقل ۲ میلی‌گرم در لیتر کاینتین سبب تولید سبزینگی در کالوس‌ها شد و براساس مشاهدات پیشنهاد کردند که رشد کالوس‌ها و سنتز کلروفیل و مقدار پروتئین محلول به وسیلهٔ نسبت کاینتین و ساکارز در محیط کشت کنترل می‌شود (۹). بیشترین مقدار کلروفیل در محیط کشت حاوی زآتین حاصل شد (۲۶). در بررسی تأثیر سیتوکینین در تغییر مقدار کلروفیل برگ‌های سیب در محیط کشت، نتایج پژوهش‌ها نشان داد نوع سیتوکینین‌ها در تعیین مقدار کلروفیل مؤثر است (۹).

همبستگی بین صفات

بررسی همبستگی پیرسون نشان داد که بین صفت‌های بررسی‌شده در این پژوهش همبستگی مثبت و بسیار معناداری وجود دارد یعنی با افزایش تعداد جوانه‌ها، طول آن‌ها نیز افزایش پیدا می‌کند و شاخص کلروفیل نیز افزایش می‌یابد (جدول ۵). این مطلب با توجه به گزارش دیگر پژوهشگران که اشاره به این موضوع داشتند که سیتوکینین‌ها اثر مثبتی بر روی نسبت کلروفیل دارند و کاینتین به‌منزلهٔ مؤثرترین سیتوکینین در افزایش مقدار کلروفیل بود و سبب افزایش چشمگیر مقدار کلروفیل در مقایسه با تیمار شاهد شد، قابل توجیه است (۱۳).

جدول۵. ضرایب همبستگی بین میانگین تعداد جوانه‌ها، طول جوانه‌ها و مقدار کلروفیل

صفات	تعداد جوانه در هر ریزنمونه	میانگین طول جوانه‌ها	مقدار کلروفیل کل	مقدار کلروفیل a	مقدار کلروفیل b
تعداد جوانه در هر ریزنمونه	۱				
میانگین طول جوانه‌ها	۰/۶۷**	۱			
مقدار کلروفیل کل	۰/۵۵**	۰/۵۳**	۱		
مقدار کلروفیل a	۰/۶۸**	۰/۶۴**	۰/۸۸**	۱	
مقدار کلروفیل b	۰/۶**	۰/۵۷**	۰/۹۹**	۰/۹۴**	۱

** معنادار بودن در سطح احتمال ۱ درصد

ریشه‌زایی

با نوجه به نتایج تجزیهٔ واریانس فرایند ریشه‌زایی اثر هورمون‌ها در ریشه‌زایی معنادار شد (جدول۶). از بین تیمارهای به‌کاررفته در این آزمایش، تنها تیمار ۸ میکرومولار BAP سبب تولید ریشه شد (شکل۳). لازم به یادآوری است که در ۲ ماه ابتدایی هیچ‌گونه ریشه‌ای حاصل نشد و فقط در انتهای ریزساقه‌ها زوائد غده‌مانندی شکل گرفت که در ماه سوم پریموردیای ریشه از آن‌ها خارج شد و به‌طور متوسط طی یک ماه ریشه‌هایی به طول ۱ـ ۱/۵ سانتی‌متر تولید کردند. اندام‌زایی در شرایط *in vitro* شامل یک سری وقایع پیچیده است که یک سلول و یا گروهی از سلول‌ها در پاسخ به محرک‌های خارجی و داخلی مانند هورمون‌های گیاهی دستخوش تغییرات می‌شوند. بسیاری از مطالعات پایه‌ای بر روی ریشه‌دهی در حال حاضر در شرایط *in vitro* انجام می‌شود. از گیاهچه‌ها به‌منزلهٔ ریزنمونه استفاده می‌شود و همچنین در برخی موارد از ریزنمونه‌هایی که از درختان بالغ گرفته می‌شود استفاده می‌کنند. در برخی گونه‌ها تولید ریزقلمه‌های ریشه‌دار توسط اندام‌زایی در شرایط *vitroin* قطعی شده است. پژوهش‌های بیشتری باید در مورد اثر عواملی مثل سن گیاه بخشنده، ژنوتیپ و نوع ریزنمونه، کیفیت ریزقلمه‌ها، تیمارهای اکسین، سیستم ریشه و شرایط محیط ریشه و سازگاری گیاه با محیط مورد نیاز است (۲). هرچند فرایندهای مولکولی یکسان یا مشابه‌ای در مخروطیان شناسایی شده است اما تفاوت‌های فیزیولوژیکی و تکاملی اندام‌زایی همچنان ناشناخته باقی مانده است. در یک مطالعه که روی *P. contorta* انجام شد مشاهده شد که سطح ترجمهٔ ۲۰۰ ژن از مرحلهٔ القای ریشه به مرحلهٔ توسعه تغییر می‌کند که اشاره به شبکهٔ پیچیده در این گونه از گیاهان دارد (۵). در یک گزارش اعلام شد که ۹۷ درصد ریشه‌زایی از ساقه‌های *Pinusroxburgii* وقتی که از ۱۰ میکرومول BA قبل از انتقال به محیط مایع استفاده شد، به دست آمد. در یک مورد ریزساقه‌های *P. sitchensis* گرفته‌شده از ریزنمونهٔ کوتیلدون بدون استفاده از هیچ هورمونی با قرارگرفتن در بستر کشت تا ۸۴ درصد ریشه‌دار شدند. IBA در غلظت‌هایی در محدودهٔ ۱ـ ۲۵ میکرومول و اغلب در محدودهٔ ۲/۵ـ ۱۴/۸ میکرومول استفاده می‌شود. غلظت NAA متفاوت است اما ۱۰ میکرومول بیشترین استفاده را دارد. بااین‌حال بهترین نتایج NAA در غلظت ۵۰ میکرومول به دست آمده است درحالی‌که در غلظت پایین سبب درصد کم ریشه‌زایی می‌شود (۱۵).

جدول ۶. تجزیهٔ واریانس اثر هورمون‌ها در ریشه‌زایی

منابع تغییرات	درجهٔ آزادی	میانگین مربعات ریزنمونه‌های ریشه‌دار
هورمون	۷	**۰/۶۶
خطا	۱۴	ns۰/۰۵
کل	۲۴	–
C.V%	–	۲۰

** معنادار بودن در سطح احتمال ۱ درصد

ns غیرمعنادار

شکل ۳. تولید ریشه در ریزساقه‌های موجود در محیط حاوی BAP

به‌منظور ایجاد سازگاری، گیاهچه‌های ریشه‌دار بعد از اینکه طول ریشه‌ها به حدود cm ۱/۵ـ ۲ رسید به محیط دارای نسبت مساوی خاک مزرعه، ماسه، ورمی‌کولیت و خاک برگ منتقل شدند. پس از انتقال گیاهچه‌ها به خاک، گلدان‌ها با کیسهٔ فریزر پوشیده شدند و در دمای ۲۵°C و فتوپریود ۱۶ ساعت روشنایی قرار گرفتند. هر روز یک سوراخ در کیسه ایجاد می‌شد تا درنهایت بعد از گذشت ۱۰ روز و مقاوم‌شدن گیاهچه به شرایط بیرون، گلدان‌ها به محیط خارج منتقل شدند. بعد از گذشت حدود ۲ ماه از انتقال به محیط طبیعی حدود ۷۵ درصد گیاهان سالم و به رشد طبیعی خود ادامه دادند هرچند که رشد این گیاه در مقایسه با گیاهان طبیعی کمتر بود.

نتیجه‌گیری

به‌طورکلی، در این پژوهش سعی بر این بود که محیط مناسب و نیز بهترین سیتوکینین، برای تولید ریزساقه‌های کاج مطبق معرفی شود. براساس نتایج به‌دست‌آمده می‌توان TE و WPM را بهترین محیط‌ها برای صفات بررسی‌شده و باززایی کاج مطبق در نظر گرفت. همچنین از بین سیتوکینین‌های ارزیابی‌شده 2ip بیشترین تأثیر را در مورد صفات بررسی‌شده داشت. در مورد ریشه‌زایی این گیاه نیز هورمون BAP بهترین پاسخ را نشان داد اما با توجه به اینکه مدت‌زمان طولانی صرف این فرایند شد به نظر می‌رسد که نیاز به مطالعهٔ بیشتر دارد. از نتایج این پژوهش می‌توان در مطالعات آیندهٔ کشت بافت کاج مطبق و دیگر گونه‌های کاج استفاده کرد.

منابع

۱. اثنی‌العشری م، کریمی ا و محمودپور ع (۱۳۸۶) «تولید پینه از ریزنمونه‌های کاج مطبق (Araucaria excelsa) .L در شرایط درون‌شیشه‌ای». علوم کشاورزی ایران. ۳۸(۴): ۶۵۹_ ۶۶۴.

۲. تقی‌پور م (۱۳۹۲) ریزازدیادی کاج مطبق (. Araucaria heterophylla L) از طریق جنین‌های زایشی. دانشگاه بین‌المللی امام‌خمینی(ره). قزوین. پایان‌نامهٔ کارشناسی ارشد.

۳. محمودی ح (۱۳۸۸) «جنین‌زایی سوماتیکی در کاج مطبق (.Araucaria heterophylla L)». دانشگاه بین‌المللی امام‌خمینی(ره). قزوین. پایان‌نامهٔ کارشناسی‌ارشد.

4. ArnonDI (1949) Copper enzymes in isolated chloroplasts. Poly phenol oxide in (Beta vulgaris).Plant Physiology. 24: 1-15.

5. Brinker M, Zyl LV, Liu W, Craig D, SederoffRR, Clapham DH and Arnold SV(2004) Microarray Analyses of Gene Expression during Adventitious Root Development in Pinuscontorta. Plant Physiology135 (3): 1526-1539.

6. Burrows G, DoleyDD, Haines RJ and Nikles DG (1988) In vitro propagation of Araucaria cunninghamii and other species of the Araucariaceae via axillary meristems. Australian Journal of Botany. 36(6): 665-676.

7. Cortizo M, De Diego N, MoncaleánP, and Ordás RJ (2009) Micropropagation of adult stone pine (Pinus pinea L.). Trees Structure and Function. 23(4): 835-842.

8. De Diego N, Montalbán I and Moncaleán P (2010) In vitro regeneration of adult Pinus sylvestris L. trees. South African Journal of Botany. 76(1): 158-162.6.

9. Dobranszki Jand DrienyovszkiNM (2014) Cytokinin-induced changes in the chlorophyll content and fluorescence of in vitro apple leaves. Journal of Plant Physiology.171 (16): 1472–1478.

10. Humanez A, Blasco M, Brisa C, Segura J and Arrillaga I (2011) Thidiazuron enhances axillary and adventitious shoot proliferation in juvenile explants of Mediterranean provenances of maritime pine (Pinus pinaster). In vitro Cellular & Developmental Biology Plant. 1-9.

11. Kaul K and Sabharwal P (1971) Effects of sucrose and kinetin on growth and chlorophyll synthesis in tobacco tissue cultures. Plant Physiology. 47(5): 691-695.

12. Lloyd G and McCown B (1980) Commercially feasible micropropagation of mountain laurel, Kalmia latifoliaby use of shoot tip culture. Proc. Intl. Plant Prop. Soc., 30: 421-427.

13. Murashing T and Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol Plant 15:473-479.

14. Murthy B, Murch S and Saxena P (1998) Thidiazuron: a potent regulator of in vitro plant morphologenesis. In vitro Cellularand Developmental Biology Plant. 34: 267-275.

15. Ragonezi C, KlimaszewskaK, CastroMR, LimaM, de OliveiraP and ZavattieriMA (2010) Adventitious rooting of conifers: influence of physical and chemical factors.Trees. 24(6): 975-992.

16. Sabovljevi A, Sabovljevi M and Vukojevi V (2010) Effects of different cytokinins onchlorophyll retentionin the moss Bryumargenteum (Bryaceae). Periodicum Bologorum. 112 (3): 301–305.

17. Sarmast KM, Salehi H and Khosh- Khui M (2009) using plagiotropic shoot explants in tissue culture of Araucaria excelsa R. Br. var. glauca. Advances in Environmental Biology. 3(2): 191-194.

18. Sarmast KM, Salehi H Ramezani A, Abolimoghadam AA Niazi A andKhosh-Khui, M (2012) RAPD fingerprint to appraise the genetic fidelity of in Vitro propagated Araucaria excelsa R. Br. var. glauca plantlets. Molecular Biotechnology.1-8.

19. Sarmast KM, Salehi H and Khosh- Khui M (2012) Micropropagation of Araucaria excelsa R. Br. var. glauca Carrière from orthotropic stem explants. Physiology and Molecular Biology of Plants. 1-7.

20. Santo ALW, Silveira V, Steiner N, Vidor M and Guerra M.P (2002) Somatic embryogenesis in parana pine (Araucaria angustifolia (Bert.) O. Kuntze). Brazilian Archives of Biology and Technology. 45(1): 97-106.

21. Stojicic D, Budimir S and Ćulafić L (1999) Micropropagation of Pinus heldreichii. Plant Cell, Tissue and Organ Culture.59 (2): 147-150.

22. Sul IIIW and Korban SS (2004) Effects of salt formulations, carbon sources, cytokinins, and auxin on shoot organogenesis from cotyledons of Pinus pinea L. Plant Growth Regulation. 43(3): 197-205.

23. Tang W, Newton RJ and Charles TM (2006) Plant regeneration through multiple adventitious shoot differentiation from callus cultures of slash pine (Pinus elliottii). Journal of Plant Physiology. 163 (1): 98-101.

24. Tang W, Newton RJ (2005) Peroxidase and catalase activities are involved in direct adventitious shoot formation induced by thidiazuron in eastern white pine (Pinus strobus L.) zygotic embryos. Plant Physiology and Biochemistry. 43(8): 760-769.

25. Vieira LN, Santa CC Fraga HPF, Santos ALW, SteinmacherDA, Schlogl PS, Silveira V, Steiner N, Floh EIS and Guerra MP (2012) Glutathione improves early somatic embryogenesis in Araucaria angustifolia (Bert) O. Kuntze by alteration in nitric oxide emission. Plant Science.DOI: 10.1016/j.plantsci.2012.06.011.

26. Yew CK, Balakrishnan B, Sundasekaran J and Subramaniam S (2010) The effect of cytokinins on invitro shoot length and multiplication of Hymenocallislittoralis. Journal of Medicinal Plants Research 4(24): 2641-2646.

27. Zhang H, Horgan KJ, Reynolds PHS and Jameson PE (2010) 6-Benzyladenine metabolism during reinvigoration of mature Pinus radiata buds in vitro. Tree Physiology. 30(4): 514-526.