نشریه علوم باغبانی (علوم و صنایع کشاورزی)
جلد ۲۸، شماره ۲، تابستان ۱۳۹۳، ص. ۱۵۳-۱۴۴
شاپا: ۴۷۳۰ - ۲۰۰۸

Journal of Horticultural Science
Vol. 28, No. 2, Summer 2014, P. 144-153
ISSN: 2008 - 4730

بررسی امکان ریزازدیادی درون‌شیشه‌ای گیاه کاکل‌زری *Pseudohandelia umbellifera* (Boiss.) Tzvel

عسکر غنی[1*]- علی تهرانی‌فر[2]- ولی اله قاسمی[3]- سمیرا هاتفی[4]

تاریخ دریافت:۱۳۹۱/۳/۱
تاریخ پذیرش:۱۳۹۲/۴/۴

چکیده

گیاه کاکل‌زری از جمله گیاهان متعلق به خانواده آستراسه می‌باشد. از این گیاه یک گونه در ایران وجود دارد که فقط در استان خراسان رویش دارد. این گیاه دارای گل آذین نسبتاً بزرگ و زیبایی است که در صورت کشت انبوه بسیار مناسب فضای سبز شهری می‌باشد. در این پژوهش، به‌منظور بررسی امکان کشت‌بافت این گیاه در شرایط درون‌شیشه‌ای دو آزمایش جداگانه طراحی گردید. در مرحله اول آزمایشی به‌صورت فاکتوریل و در قالب طرح کاملاً تصادفی با دو فاکتور جهت بررسی میزان کالوس‌زایی این گیاه انجام شد که فاکتور اول شامل تیمارهای هورمونی با ۱۲ سطح (BAP, IAA, KN و 2,4-D و با غلظت‌های مختلف) و فاکتور دوم، نوع ریز نمونه شامل ۳ سطح (ریزنمونه‌های برگ، جوانه انتهایی و جوانه جانبی) و در مجموع ۳۶ تیمار بود. در مرحله بعد جهت ساقه‌زایی کالوس‌های تولیدشده، آزمایشی به صورت کاملاً تصادفی شامل ۳۴ تیمار (شامل تیمارهای هورمونی نامبرده، محیط MS پایه و ریزنمونه‌های مختلف) انجام شد. در پایان کالوس‌های ساقه‌زا به محیط کشت MS و محیط حاوی هورمون IBA جهت ریشه‌زایی انتقال یافتند. نتایج آزمایش اول نشان داد که عکس‌العمل این گیاه به تیمارهای هورمونی فوق به جز 2,4-D در محیط کشت جهت کالوس‌زایی خوب بوده است و تیمارها از نظر میزان کالوس‌زایی و ویژگی‌های تولید شده متفاوت بودند. نتایج آزمایش دوم نشان داد که تعداد محدودی از تیمارها تولید ساقه کردند و بسیاری از تیمارها در واکنش به تیمارهای فوق فقط تولید کالوس کردند. همچنین از نمونه‌هایی که تولید ساقه کرده بودند تعداد بسیار کمی از گیاهان در محیط MS ریشه‌دار شدند.

واژه‌های کلیدی: زینتی، گیاهان بومی، کاکل زری، کشت بافت، ریزنمونه

مقدمه

گیاه *Pseudohandelia umbellifera* (Boiss.) Tzvel با نام فارسی کاکل‌زری از جمله گیاهان متعلق به خانواده مرکبان و طایفه آنتمیده (Anthemidae) می باشد. این گیاه در ایران، افغانستان و کشورهای آسیای مرکزی پراکنش دارد که در ایران فقط دارای یک گونه و آن هم در استان خراسان رویش دارد (۵). کاکل‌زری گیاهی است به ارتفاع حدود ۱۵ تا ۸۰ سانتی‌متر که دارای گل‌آذین‌های یکنواخت و نسبتا بزرگ و زیبا (با قطر حدود ۶ تا ۹ سانتی‌متر) می‌باشد (۱۰). بنظر می‌رسد در صورت امکان کشت انبوه، این گیاه مناسب جهت کشت در فضای سبز شهری باشد.

با توجه به محدود بودن مناطق پراکنش این گیاه در دنیا، تحقیقات بسیار کمی در رابطه با آن انجام شده‌است. در ایران فقط یک پژوهش در رابطه با اجزای تشکیل دهنده اسانس این گیاه صورت گرفته است و مهم‌ترین اجزای اسانس، ۷-هیدروکسی کومارین، فارنزول، نوسیفرول استات و لانسئول استات شناسایی شده‌است (۹). در رابطه با کشت بافت این گیاه تاکنون هیچ تحقیقی در ایران و سایر کشورها گزارش نشده‌است ولی تحقیقاتی در رابطه با گیاهان نزدیک به این جنس و از خانواده مرکبان انجام شده است. اولین تحقیق در رابطه با کشت‌بافت بومادران هزاربرگ (*Achillea millefolium*) با استفاده از ریزنمونه هیپوکوتیل در محیط کشت B5 حاوی 2,4-D و کاینتین (به ترتیب با غلظت ۱/۵ و ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر) تولید کالوس‌های شکننده را گزارش کردند (۶). در تحقیقات بعدی کشت درون شیشه‌ای گونه مذکور در محیط‌کشت پایه MS با

۱-استادیار گروه علوم باغبانی، دانشگاه جهرم
(*- نویسنده مسئول: Email: ghani_askar@yahoo.com)
۲- استاد گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد و عضو پیوسته گروه گیاهان زینتی پژوهشکده علوم گیاهی
۳- استادیار دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری
۴- دانشجوی سابق کارشناسی ارشد دانشگاه پیام نور تهران

استفاده از هورمون‌های IAA, BA, NAA, kin و2,4-D بررسی شد و محیط‌کشت دارای ۱ میلی‌گرم در لیتر NAA و ۲ میلی‌گرم در لیتر kin را به عنوان بهترین شرایط برای تولید کالوس و محیط‌کشت دارای ۱ میلی‌گرم در لیتر IAA و ۲ میلی‌گرم در لیتر BA را به‌عنوان بهترین شرایط برای تولید اندام هوایی گزارش نمودند (۱). هم‌چنین در رابطه با گونه‌ای دیگر از بومادران (*Achillea asplenifolia*)، با کشت ریزنمونه جوانه جانبی گیاهان بالغ در محیط کشت MS حاوی غلظت‌های مختلف سایتوکینین تکثیر درون شیشه‌ای این گیاه با موفقیت انجام شد و بهترین محیط‌کشت جهت تکثیر محیط حاوی هورمونN-benzyl-9-(2-tetrahydropyranyl) adenine با غلظت ۱ میلی‌گرم در لیتر گزارش گردید (۱۱). در تحقیق دیگری در رابطه با کشت بافت گیاه بابونه رومی (*Anthemis nobilis*، گیاه دیگری از خانواده آستراسه) با استفاده از ریزنمونه برگ در محیط‌کشت MS دارای BA با غلظت ۱ تا ۴/۵ میکرومول تولید ساقه کردند و با کاربرد BA با غلظت ۲/۲۵ و IAA با غلظت ۰/۶ میکرومول تولید ساقه را افزایش دادند و پس از انتقال به محیط‌کشت MS دارای IBA با غلظت ۰/۵ میکرومول ریشه‌زایی صورت گرفت (۸).

تکثیر آزمایشگاهی گیاه کاکل‌زری با استفاده از فنون کشت‌بافت می‌تواند به عنوان جایگزینی برای روش‌های ازدیاد سنتی جهت تکثیر سریع و انبوه برای اهداف زینتی و دارویی در نظر گرفته شود. زیرا این گیاه به‌طور طبیعی دارای رشد نسبتا کند می‌باشد و از طرف دیگر بذرهای این گیاه نیز از جوانه‌زنی نسبتا پایینی برخوردار می‌باشند. علاوه بر این، باززایی از طریق ریزنمونه‌های مختلف در جهت حفظ ژنوتیپ‌های خاص نیز حائز اهمیت است. با توجه به عدم وجود اطلاعات در مورد کشت‌بافت این گیاه، این تحقیق با هدف کسب اطلاعات لازم در رابطه با امکان کشت‌بافت این گیاه برای اولین بار صورت گرفت.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی: بذرهای سالم و یکنواخت گیاه کاکل‌زری از گیاهان موجود در پردیس دانشگاه فردوسی مشهد جمع‌آوری گردید. هم‌چنین جهت اطمینان از جنس و گونه مورد نظر، گیاه کاکل‌زری توسط گیاهشناسان پژوهشکده علوم گیاهی مورد شناسایی قرار گرفت و نمونه گیاهشناسی آن جهت نگهداری در هرباریوم دانشگاه فردوسی مشهد کدگذاری شد (با کد هرباریومی ۳۷۷۱۲). ضدعفونی بذرها با قرار دادن آن‌ها در اتانول ۷۰ درصد به مدت ۳۰ ثانیه و متعاقب آن غوطه‌وری به مدت ۱۵ دقیقه در محلول هیپوکلرید سدیم ۱ درصد انجام شد. پس از آن برای حذف اثر مواد ضدعفونی‌کننده، بذرها سه بار با آب مقطر استریل به مدت ۱۵ دقیقه شستشو گردیدند. در مرحله بعد، بذرهای ضدعفونی شده بر روی محیط کشت آب آگار ۰/۷ درصد (w/v) کشت شده و به‌منظور جوانه‌زنی در دمای ۲۵±۱ °C با تناوب نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی و شدت نور ۳۰ میکرومول بر متر مربع نگهداری شدند. به این ترتیب تعدادی گیاه به عنوان مواد اولیه برای جدا کردن ریزنمونه‌های مورد آزمایش به‌دست آمد. سپس ریزنمونه‌های برگ، جوانه انتهایی و جوانه جانبی، با استفاده از اسکالپل در شرایط استریل، از گیاهچه‌ها جدا شد و در این تحقیق مورد استفاده قرار گرفت.

محیط‌کشت و شرایط رشد: جهت باززایی مستقیم و کالوس‌زایی، همهٔ ریزنمونه‌ها در محیط‌کشت MS تغییر یافته (محیط‌کشت MS حاوی ویتامین‌های B5) و غلظت‌های هورمونی متنوع، ۳ درصد ساکارز، ۰/۸ درصد آگار و pH= ۵/۸ در ویال کشت شدند. در این مرحله آزمایشی به صورت فاکتوریل و در قالب طرح کاملاً تصادفی با دو فاکتور جهت بررسی میزان کالوس‌زایی طراحی شد که فاکتور اول شامل تیمارهای هورمونی با ۱۲ سطح و فاکتور دوم، نوع ریزنمونه شامل ۳ سطح (ریزنمونه‌های برگ، جوانه انتهایی و جوانه جانبی) و در مجموع ۳۶ تیمار با ۴ تکرار بود. تیمارها شامل: محیط حاوی هورمون BAP (غلظت‌های ۱، ۲ و ۳ میلی‌گرم در لیتر)، ترکیب BAP و IAA (با غلظت‌های مختلف)، 2,4-D (۰/۲۵ و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر)، ترکیب 2,4-D و KIN (با غلظت‌های مختلف)، ترکیب BAP و KIN و TDZ (۰/۵ میلی‌گرم در لیتر) بودند (تیمارها به تفصیل در جدول ۳ آورده شده است).

ظروف کشت در اتاقک رشد با دمای ۲۵±۱ °C با تناوب نوری ۱۶ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی و شدت نور ۳۰ میکرومول بر مترمربع نگهداری شدند. واکشت کالوس‌های تولید شده در محیط کشت جدید هر ۳ تا ۴ هفته یک‌بار انجام شد. وزن تر، وزن خشک، ابعاد و رنگ کالوس‌ها پس از ۴ هفته از کشت ریزنمونه‌های مختلف در محیط کشت مربوطه، اندازه‌گیری و ثبت گردید. جهت اندازه‌گیری وزن خشک، کالوس‌ها به مدت یک شبانه‌روز درون آون با دمای ۱۰۵ درجه سانتی‌گراد نگهداری شده و سپس اقدام به اندازه‌گیری گردید.

اندام‌زایی: جهت اندام‌زایی، کالوس‌های تولیدی به دو گروه تقسیم شده و تعدادی از آن‌ها در محیط MS پایه و تعدادی دیگر در محیط‌کشت حاوی هورمون‌های مشابه قبل انتقال یافتند و از نظر ساقه‌زایی مورد بررسی قرار گرفتند. در این مرحله آزمایشی به صورت کاملاً تصادفی شامل ۳۴ تیمار (شامل تیمارهای هورمونی مختلف، محیط MS پایه و ریزنمونه‌های مختلف) انجام شد (جدول ۴). ظروف کشت در اتاقک رشد با شرایطی که قبلاً ذکر گردید نگهداری شدند. جهت القاء ریشه، ساقه‌های باززایی شده به محیط‌کشت MS تغییر یافته بدون هورمون و حاوی هورمون IBA منتقل شدند.

سازگاری: پس از ریشه‌دار شدن در محیط دارای آگار، شاخه ها جهت توسعه سیستم ریشه‌ای و رشد بعدی به گلدان‌های کوچک، شامل پیت اسفنجی و ماسه بادی و پرلیت منتقل گردیدند. جهت

سازگاری گیاهان با شرایط بیرون، روی گلدان‌ها جهت حفظ شرایط رطوبتی بالا و نزدیک به محیط درون‌شیشه‌ای با پلاستیک شفاف پوشانده شد. برای آبیاری از آب مقطر استفاده شد و جهت تغذیه گیاهچه‌ها از محیط MS ۱/۲ به صورت محلول‌پاشی استفاده گردید.

تجزیه واریانس داده‌ها با نرم افزار MINITAB و مقایسه میانگین‌ها با نرم افزار MSTAT-C انجام شد. همچنین برای مقایسه میانگین‌ها، از آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح ۵ درصد استفاده گردید.

نتایج

نتایج آزمایش اول نشان داد که بین ترکیبات مختلف هورمونی، نوع ریزنمونه و اثر متقابل آن‌ها، بر وزن تر و خشک و ابعاد کالوس‌های تولیدی (جدول ۱ و ۳)، تفاوت معنی‌داری وجود داشت ($p<۰/۰۵$). هم‌چنین رنگ نمونه‌های کالوس و میزان کالوس‌دهی نیز تحت تاثیر این تیمارها قرار گرفت (جدول ۳).

صرف‌نظر از نوع تیمار هورمونی بکار رفته، همه ریزنمونه‌ها به جز ریزنمونه‌های جوانه انتهایی و جوانه جانبی مربوط به تیمار هورمونی BAP (۱ میلی‌گرم در لیتر) + IAA (۱ میلی‌گرم در لیتر) با کشت روی محیط‌کشت‌های مختلف کالوس‌زایی، تولید کالوس نمودند. بیشترین میزان کالوس‌زایی مربوط به تیمارهای BAP (۱، ۲ و ۳ میلی‌گرم در لیتر) و تیمارهای ترکیبی IAA + BAP (۱ میلی‌گرم در لیتر) بود. هم‌چنین رنگ کالوس تولید شده در این تیمارها سبز روشن و طبیعی بود. از طرف دیگر در تمامی تیمارهای حاوی 2,4-D به تنهایی و یا ترکیب با KIN، میزان کالوس‌زایی کاهش یافت و رنگ کالوس‌ها نیز در برخی موارد کرم رنگ و غیر طبیعی بود. در تیمارهای KIN +BAP (۵ میلی‌گرم در لیتر) و TDZ میزان کالوس‌دهی متوسط بود ولی رنگ کالوس قهوه‌ای کم‌رنگ بود (جدول ۳). با دقت در جدول ۳ مشاهده می‌شود که بطور کلی بین نوع ریزنمونه از نظر میزان کالوس‌دهی تفاوت زیادی وجود ندارد و تاثیر غلظت و نوع هورمون مشهودتر بوده‌است.

اثر متقابل غلظت‌های هورمونی و نوع ریزنمونه بر وزن تر و وزن خشک کالوس‌های تولیدی در جدول ۳ آورده‌شده‌است. به‌طورکلی بیشترین میزان وزن تر و وزن خشک کالوس تولید شده (به‌ترتیب ۱/۴۳ و ۰/۱۰۴ گرم) و بزرگ‌ترین کالوس مربوط به تیمار هورمونی BAP (۳ میلی‌گرم در لیتر) + IAA (۱ میلی‌گرم در لیتر) ریزنمونه برگ بود و بعد از آن از نظر وزن تر و خشک، تیمار BAP (۱ میلی‌گرم در لیتر) + KIN (۵ میلی‌گرم در لیتر) قرار داشت. کم‌ترین میزان وزن تر و خشک و اندازه کالوس (به استثنا تیمارهایی که اصلاً تولید کالوس نکردند) مربوط به تیمارهای حاوی هورمون 2,4-D بود. برای مثال کم‌ترین میزان وزن تر، وزن خشک و اندازه کالوس مربوط به تیمارهای ترکیبی 2,4-D (۰/۲۵ و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر) + KIN (۱ میلی‌گرم در لیتر) ریز نمونه جوانه انتهایی بود (جدول ۳).

در بررسی اثرات ساده غلظت‌های هورمونی بر فاکتورهای وزن تر، وزن خشک و ابعاد کالوس‌های تولید شده (شکل‌های ۱ تا ۳) تفاوت معنی داری بین تیمارها وجود داشت (جدول ۱). به‌طوری که بیشترین میزان وزن تر و خشک و اندازه مربوط به تیمار ترکیبی BAP (۳ میلی‌گرم در لیتر) + IAA (۱ میلی‌گرم در لیتر) و بعد از آن تیمارهای BAP (۲ میلی‌گرم در لیتر) + IAA (۱ میلی‌گرم در لیتر) و BAP (۱ میلی‌گرم در لیتر) + KIN (۵ میلی‌گرم در لیتر) بود (شکل ۱ و ۲). درحالی‌که کم‌ترین مقادیر این دو فاکتور مربوط به تیمارهای ترکیبی 2,4-D (۰/۲۵ و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر) + KIN (۱ میلی‌گرم در لیتر) بود. هم‌چنین تیمارهای دارای مقادیر مختلف BAP به تنهایی (۱، ۲ و ۳ میلی‌گرم در لیتر) نیز از نظر فاکتورهای اندازه گیری بعد از تیمارهای ترکیبی BAP نسبت به سایر تیمارها بالاتر بودند.

جدول ۱- آنالیز واریانس اثر تیمارهای مختلف هورمونی و نوع ریزنمونه بر خصوصیات کالوس تولید شده در گیاه کاکل‌زری *Pseudohandelia umbellifera*

منابع تغییرات	میانگین مربعات			
	درجه آزادی	وزن تر کالوس	وزن خشک کالوس	اندازه کالوس
تیمارهای هورمونی	۱۱	**۰/۵۱۷	**۰/۰۰۲۷	**۱/۶۱
نوع ریزنمونه	۲	**۰/۵۴۶	**۰/۰۰۳	**۱/۰۲
تیمارهای هورمونی × نوع ریزنمونه	۲۲	**۰/۱۴۵	**۰/۰۰۰۶	**۰/۳۳
خطای آزمایش	۷۲	۰/۰۰۹	۰/۰۰۳	۰/۰۲۳

*، ** و ns- به‌ترتیب اختلاف معنی‌دار در سطوح احتمال ۵٪ و ۱٪ و عدم وجود اختلاف معنی‌دار

جدول ۲- آنالیز واریانس اثر تیمارهای مختلف بر ویژگی‌های کالوس تولید شده در گیاه کاکل زری *Pseudohandelia umbellifera*

	درجه آزادی	وزن تر کالوس	وزن خشک کالوس	اندازه کالوس
تیمار	۳۳	**۰/۴۹۹	**۰/۰۰۴	**۴/۱۲
خطا	۶۸	۰/۰۲۰	۰/۰۰۰۳	۰/۱۱۶

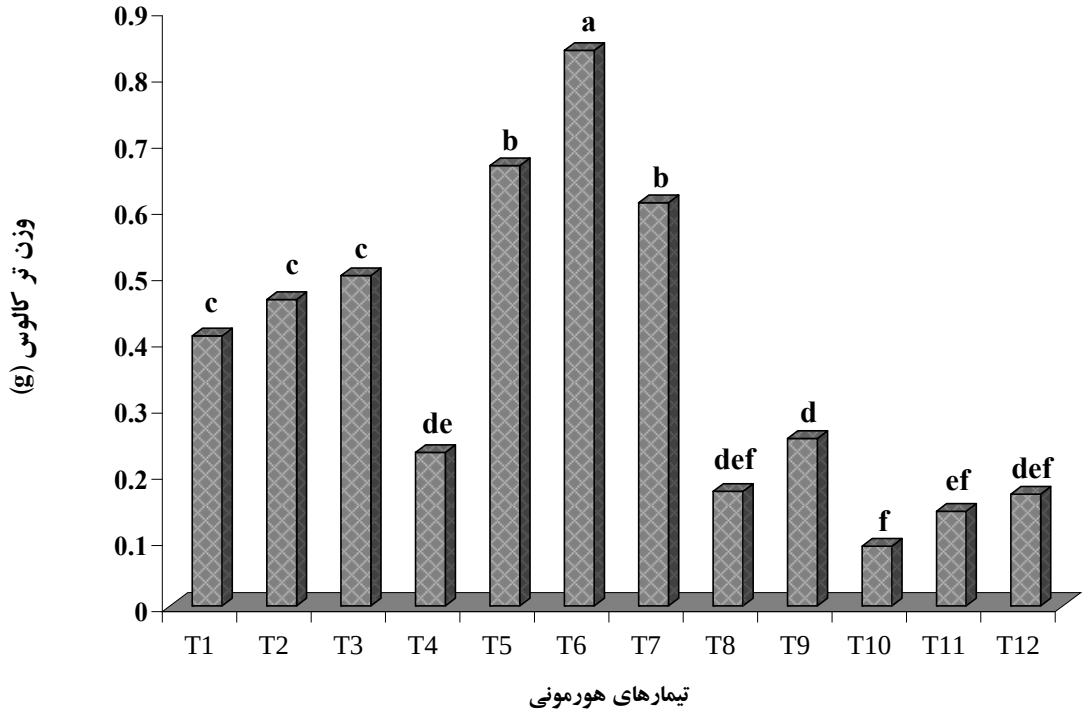
*، ** و ns- به‌ترتیب اختلاف معنی‌دار در سطوح احتمال ۵٪ و ۱٪ و عدم وجود اختلاف معنی‌دار

جدول ۳- اثر متقابل نوع ریزنمونه و تیمارهای هورمونی بر خصوصیات کالوس‌های تولید شده در گیاه کاکل زری *Pseudohandelia umbellifera*

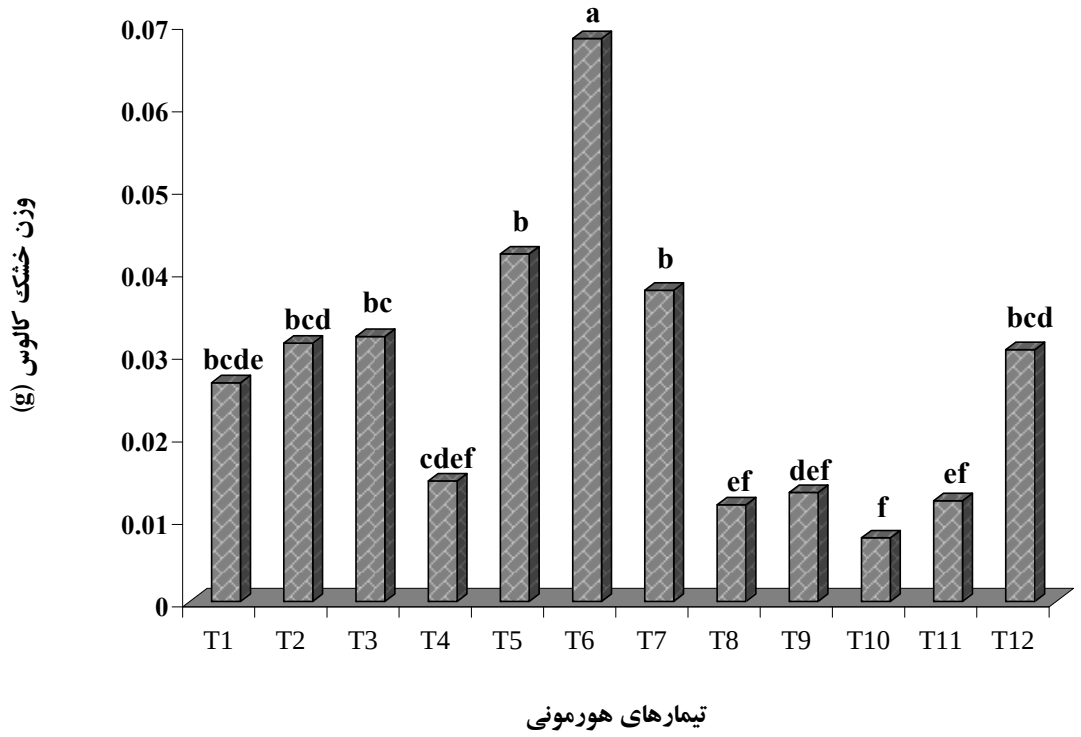
نام تیمار	تیمار هورمونی (mg/l)	نوع ریزنمونه	وزن تر کالوس(g)	وزن خشک کالوس(g)	اندازه کالوس(cm^3)	رنگ کالوس	وضعیت کالوس‌دهی
T1	BAP (1 mg/l)	برگ	۰/۱۸۹ l-o	۰/۰۱۷ e-i	۰/۴۹ j	سبز روشن	+++
		جوانه انتهایی	۰/۳۹۵ h-k	۰/۰۲۶ d-i	۰/۴۳ k	سبز روشن	+++
		جوانه جانبی	۰/۴۶۲ f-i	۰/۰۳۷ b-h	۰/۵۴ I	سبز روشن	+++
T2	BAP (2 mg/l)	برگ	۰/۴۲۱ g-j	۰/۰۳۶ b-h	۰/۶۳ h	سبز- قهوه‌ای	+++
		جوانه انتهایی	۰/۲۷۵ j-m	۰/۰۲۲ d-i	۰/۲۱ n	سبز روشن	+++
		جوانه جانبی	۰/۶۹۳ cd	۰/۰۳۷ b-h	۰/۸۸ e	سبز روشن	+++
T3	BAP (3 mg/l)	برگ	۰/۶۴۱ cde	۰/۰۳۸ b-h	۰/۸۲ fg	سبز- قهوه‌ای	++
		جوانه انتهایی	۰/۲۷۷ j-m	۰/۰۱۷ e-i	۰/۳۴ l	سبز- قهوه‌ای	+++
		جوانه جانبی	۰/۵۷۵ d-g	۰/۰۴۲ b-g	۰/۸۱ g	سبز- قهوه‌ای	++
T4	BAP (1 mg/l) + IAA (1 mg/l)	برگ	۰/۶۹۶ cd	۰/۰۴۴ b-f	۱/۰۲ c	سبز- قهوه‌ای	+++
		جوانه انتهایی	۰ p	۰ i	۰ u	–	–
		جوانه جانبی	۰p	۰ i	۰ u	–	–
T5	BAP (2 mg/l) + IAA (1 mg/l)	برگ	۰/۷۷۴ bc	۰/۰۵۲ bcd	۱/۰۹ b	سبز روشن	+++
		جوانه انتهایی	۰/۶۶۹ cd	۰/۰۴ b-h	۱/۱ b	سبز روشن	+++
		جوانه جانبی	۰/۵۵۲ d-h	۰/۰۳۴ b-i	۰/۸۴ f	سبز روشن	+++
T6	BAP (3 mg/l) + IAA (1 mg/l)	برگ	۱/۴۳ a	۰/۱۰۴ a	۲/۴۹ a	سبز روشن	+++
		جوانه انتهایی	۰/۴۵۲ ghi	۰/۰۶۱ bc	۰/۸۸ e	سبز روشن	+++
		جوانه جانبی	۰/۶۳۱ c-f	۰/۰۴ b-h	۰/۸۳ fg	سبز روشن	+++
T7	KIN (5 mg/l) + BAP (1 mg/l)	برگ	۰/۶۳ c-f	۰/۰۳۶ b-h	۰/۵۷ i	قهوه‌ای کمرنگ	++
		جوانه انتهایی	۰/۳۳ i-l	۰/۰۲۹ c-i	۰/۴۸ j	قهوه‌ای کمرنگ	++
		جوانه جانبی	۰/۸۶۹ b	۰/۰۴۸ b-e	۰ /۹۳ d	قهوه‌ای کمرنگ	++
T8	(0.25 mg/l) 2,4-D	برگ	۰/۲۲ l-o	۰/۰۱۴ e-i	۰/۱۵ o	کرم رنگ	+
		جوانه انتهایی	۰/۱۹۲ l-o	۰/۰۱۱ f-i	۰/۱۲ pq	کرم رنگ	+
		جوانه جانبی	۰/۱۰۷ m-p	۰/۰۰۹ f-i	۰/۰۶ rs	کرم رنگ	++
T9	(0. 5 mg/l) 2,4-D	برگ	۰/۱۹۲ l-o	۰/۰۱۲ f-i	۰/۱۴ op	کرم رنگ	+
		جوانه انتهایی	۰/۰۸۷ nop	۰/۰۰۵ h-i	۰/۰۱ u	کرم رنگ	++
		جوانه جانبی	۰/۴۷۹ e-i	۰/۰۲۲d-i	۰/۲۹ m	کرم رنگ	+
T10	(0. 25 mg/l) + 2,4-D KIN (1 mg/l)	برگ	۰/۰۷۵ nop	۰/۰۰۷ ghi	۰/۰۲ tu	سبز روشن	++
		جوانه انتهایی	۰/۰۵۴ nop	۰/۰۰۵ hi	۰/۰۱ u	سبز روشن	++
		جوانه جانبی	۰/۱۴۳ m-p	۰/۰۱۱ f-i	۰/۰۵ st	سبز روشن	+
T11	(0. 5 mg/l) + KIN 2,4-D (1 mg/l)	برگ	۰/۲۳۵ k-n	۰/۰۲ d-i	۰/۱۲ pq	سبز روشن	++
		جوانه انتهایی	۰/۰۴۹ op	۰/۰۰۷ ghi	۰/۰۱ u	سبز روشن	++
		جوانه جانبی	۰/۱۴۴ m-p	۰/۰۱۰ f-i	۰/۰۷ rs	کرم رنگ	++
T12	TDZ (0. 5 mg/l)	برگ	۰/۲۰۵ l-o	۰/۰۶۸ b	۰/۱۶ o	سبز روشن	+
		جوانه انتهایی	۰/۱۰۴ m-p	۰/۰۰۸ ghi	۰/۰۷ rs	قهوه‌ای کمرنگ	++
		جوانه جانبی	۰/۱۹۸ l-o	۰/۰۱۵ f-i	۰/۰۹ qr	قهوه‌ای کمرنگ	++

*- میانگین‌های دارای حرف مشترک در هر ستون فاقد اختلاف معنی‌دار بر اساس آزمون دانکن در سطح ۵٪ می‌باشند.

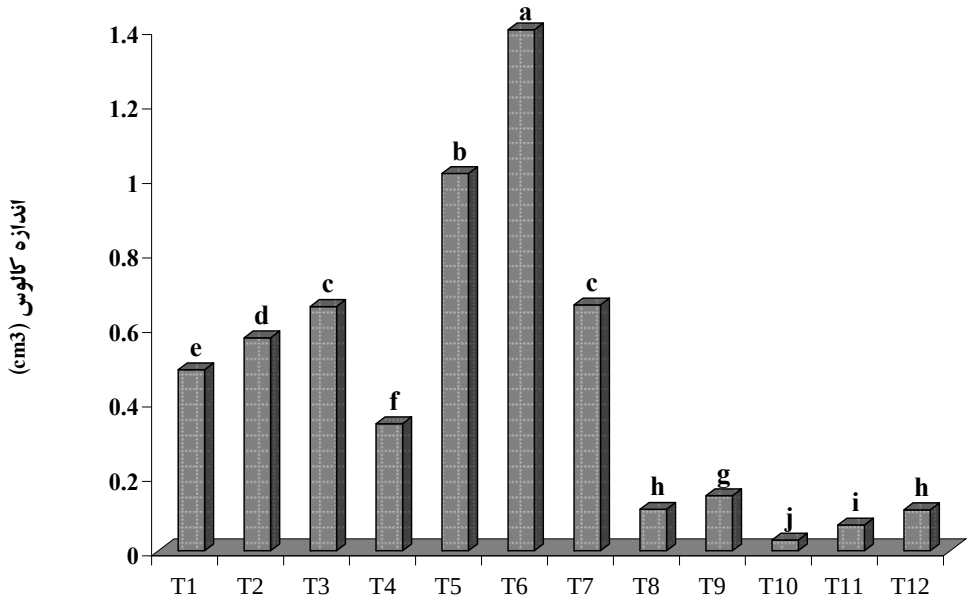
+++: خوب ++: متوسط +: ضعیف -: عدم کالوس دهی



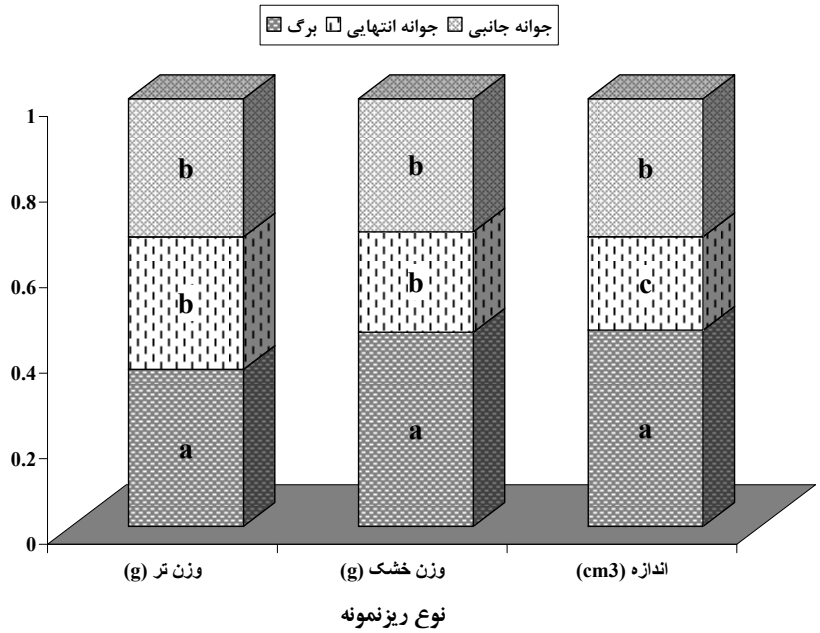
شکل ۱- تاثیر تیمارهای هورمونی در محیط کشت MS بر میانگین وزن تر کالوس‌های تولید شده در گیاه کاکل‌زری



شکل ۲- اثر تیمارهای مختلف هورمونی بر میانگین وزن خشک کالوس‌های تولید شده در گیاه کاکل زری



شکل ۳- اثر تیمارهای مختلف هورمونی بر اندازه کالوس‌های تولید شده در گیاه کاکل زری



شکل ٤- تاثیر نوع ریزنمونه بر وزن تر، وزن خشک و اندازه کالوس‌های تولید شده در گیاه کاکل‌زری

در بررسی اثرات ساده نوع ریزنمونه بر فاکتورهای فوق (شکل ۴) تفاوت معنی‌داری ($p<۰/۰۱$) بین تیمارها وجود داشت (جدول ۱). به‌طوری که بیشترین میزان وزن تر و خشک مربوط به ریزنمونه برگ و بعد از آن جوانه جانبی و کم‌ترین میزان مربوط به ریزنمونه جوانه انتهایی بود که البته بین جوانه انتهایی و جوانه جانبی تفاوت معنی‌داری از نظر این دو صفت وجود نداشت. از نظر اندازه کالوس نیز تاثیر ریزنمونه‌ها مانند بالا بود با این تفاوت که بین ریزنمونه جوانه انتهایی و جوانه جانبی تفاوت معنی‌دار ($p<۰/۰۱$) از نظر اندازه کالوس وجود داشت.

نتایج مربوط به آزمایش دوم در جداول ۲ و ۴ منعکس شده‌است. پس از تولید کالوس جهت باززایی ساقه، با توجه به میزان کالوس‌های تولید شده تیمارهای موجود در جدول ۴ انتخاب شدند. در این مرحله تعدادی از کالوس‌ها شروع به ساقه‌زایی و یا تولید ریشه نیز کردند در برخی تیمارها مجدداً تولید کالوس کردند و بر حجم کالوس‌های قبلی

افزوده شد و در برخی موارد کالوس‌ها قهوه ای شدند و از بین رفتند. در پایان این مرحله کلیه مشاهدات ثبت گردید که در جدول ۴ ارائه‌شده‌است. همچنین در این مرحله تغییرات وزن تر، وزن خشک و اندازه کالوس‌ها مورد بررسی و تجزیه آماری قرار گرفتند که نتایج نشان دهنده تاثیر معنی‌دار ($p<۰/۰۱$) تیمارها بر صفات اندازه‌گیری شده بود (جدول ۲). نتایج مربوط به این آزمایش نشان می‌دهد که بیشترین وزن تر مربوط به تیمار هورمونی BAP (۳ میلی‌گرم در لیتر) از ریزنمونه جوانه جانبی و بعد از آن تیمار هورمونی 2,4-D (۰/۲۵ میلی‌گرم در لیتر) ریزنمونه جوانه جانبی بود و بیشترین میزان وزن خشک نیز مربوط به ریزنمونه جوانه جانبی در تیمار هورمونی 2,4-D (۰/۲۵ میلی‌گرم در لیتر) بود (جدول ۴). درحالی‌که کم‌ترین میزان وزن تر، وزن خشک و اندازه کالوس مربوط به تیمار هورمونی 2,4-D (۰/۵ میلی‌گرم در لیتر) ریزنمونه جوانه انتهایی بود و بالاترین اندازه کالوس نیز مربوط به تیمار هورمونی BAP (۳ میلی‌گرم در لیتر) ریزنمونه جوانه انتهایی بود (جدول ۴). کالوس‌های تولیدی در محیط‌کشت‌هایی که در آن‌ها از 2,4-D به تنهایی یا در ترکیب با هورمون‌های دیگر جهت کالوس‌زایی ریزنمونه های مختلف استفاده شده بود به جز تیمار ترکیبی 2,4-D (۰/۲۵ میلی‌گرم در لیتر) + KIN (۱ میلی‌گرم در لیتر) که در این مرحله از محیط MS بدون هورمون استفاده شده بود در مرحله باززایی عکس‌العملی خوبی نشان ندادند و ساقه‌ای از آن‌ها باززایی نشد. در محیط‌کشت‌هایی که از KIN به همراه 2,4-D جهت کالوس‌زایی استفاده شده بود، در مقایسه با محیط‌کشت‌های حاوی 2,4-D، کالوس‌های تولیدی با انتقال به محیط‌کشت‌های باززایی، ساختارهای کلروفیل‌دار بیشتری تولید نمودند. البته در تیمارهای T23 و T27 مقدار کمی ریشه‌های پر مانند کوچک تولید شد که این تیمارها حاوی مقداری هورمون 2,4-D بودند. به‌طور کل تیمارهای بسیار کمی باعث ساقه‌زایی در کالوس‌های تولید شده در مرحله قبل در این گیاه شدند و تعداد کالوسی که تولید ساقه کردند بیشتر مربوط به محیط MS بدون هورمون بودند (جدول ۴). در مرحله بعد تعداد محدود ساقه‌های تولید شده به دو محیط MS بدون هورمون و حاوی هورمون IBA انتقال یافتند که در این مرحله فقط نمونه‌های کشت شده در محیط MS بدون هورمون تولید ریشه کردند و توانستند گیاهان کامل تولید کنند که مربوط به تیمارهای BAP (۱ میلی‌گرم در لیتر) ریزنمونه جوانه انتهایی، تیمار ترکیبی BAP (۱ میلی‌گرم در لیتر) + IAA (۱ میلی‌گرم در لیتر) ریزنمونه جوانه انتهایی و تیمار ترکیبی BAP (۳ میلی‌گرم در لیتر) + IAA (۱ میلی‌گرم در لیتر) ریزنمونه برگ بود (جدول ۴). گیاهان باززایی شده جهت توسعه سیستم ریشه و رشد بعدی گیاهچه‌ها به گلدان‌های کوچک، شامل پیت اسفنجی و ماسه بادی و پرلیت منتقل گردیدند. جهت سازگاری گیاهان با شرایط بیرون و حفظ شرایط رطوبتی بالا و نزدیک به محیط درون شیشه‌ای، روی گلدان‌ها با پلاستیک شفاف پوشانده شد. برای آبیاری از آب مقطر استفاده شد و جهت تغذیه گیاهچه‌ها از محیط MS ۱/۲ به صورت محلول‌پاشی استفاده گردید. در شکل ۵، کالوس‌های تولید شده، ساقه‌های باززایی شده و گیاه کامل باززایی شده نشان داده شده‌است.

بحث

نتایج نشان داد که تولید کالوس در گیاه کاکل زری با انتخاب تیمارهای هورمونی مناسب به راحتی امکان‌پذیر است. همان‌طورکه قبلاً ذکر گردید تیمارهای هورمونی BAP به تنهایی و یا ترکیب با هورمون IAA به‌طور موثری میزان کالوس را افزایش دادند. BAP از جمله سیتوکینین‌هایی است که در کشت‌بافت به تنهایی و یا به صورت ترکیب با هورمون‌های دیگر جهت ساقه‌زایی کاربرد دارد. در رابطه با بهینه‌سازی شرایط کشت به منظور ساقه‌زایی گیاه عدس، بیشترین میزان ساقه‌زایی در تیمار BAP با غلظت ۳ میلی‌گرم در لیتر گزارش شده است (۴). در پژوهشی دیگر با کاربرد محور جنینی زیره سبز در زمان کوتاه و بدون انجام واکشت به باززایی موفقی در این گیاه دست یافتند. بهترین محیط کشت، B5 با ترکیب هورمونی IAA (۰/۲ میلی‌گرم در لیتر) و BAP (۱ میلی‌گرم در لیتر) یا ترکیب هورمونی NAA (۰/۲ میلی‌گرم در لیتر) و BAP (۰/۲ میلی‌گرم در لیتر) بود (۷).

همان‌طور که مشاهده شد در تیمارهای حاوی هورمون 2,4-D به تنهایی و یا ترکیب با هورمون KIN کالوس‌دهی کم با کیفیت پایین داشتند و هرچه غلظت آن افزایش پیدا کرد تاثیر منفی آن بیشتر شد. سایر محققین نیز چنین نتایجی را در رابطه با کاربرد این هورمون در گیاهان دیگر گزارش کرده‌اند (۱، ۲ و ۶). قطعات برگ و دم‌برگ بومادران هزار برگ (*Achillea millefolium*) در محیط کشت حاوی هورمون 2,4-D (۲، ۴ و ۸ میلی‌گرم در لیتر) و KIN (۲ میلی‌گرم در لیتر) تولید کالوس کردند اما کالوس‌های تشکیل شده بعد از ۲ تا ۴ روز قهوه‌ای شده و از بین رفتند (۱). در رابطه با کشت‌بافت گیاه آویشن شیرازی نیز نتایج مشابهی گزارش شده‌است (۲). کشت‌بافت بومادران هزار برگ در محیط‌کشت دارای هورمون‌های 2,4-D و KIN (به‌ترتیب با غلظت ۱/۵ و ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر) منجر به تولید کالوس‌های شکننده شد (۶).

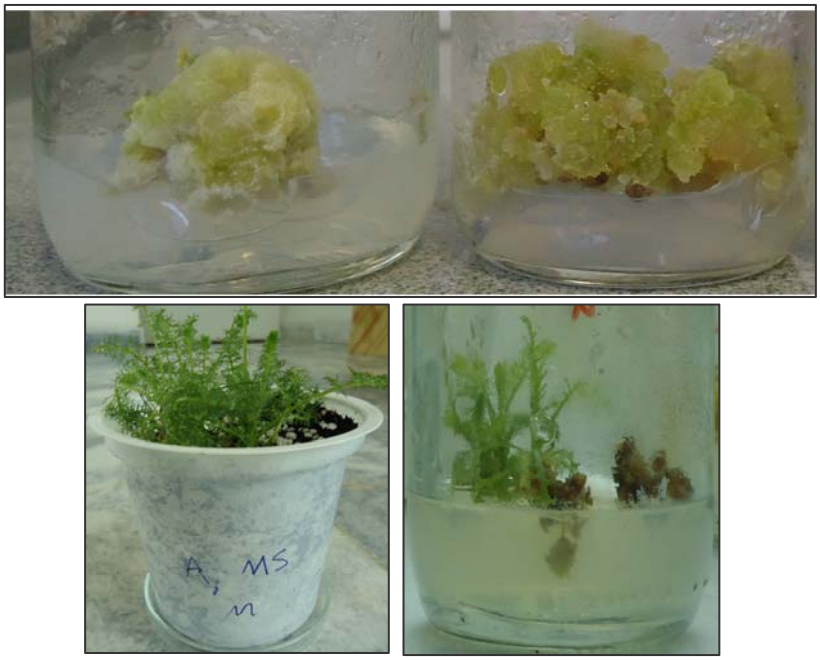
تیمارهای بکار رفته در این پژوهش در رابطه با ساقه‌زایی گیاه کاکل‌زری چندان موفق نبود که نشان می‌دهد این گیاه پس از تولید کالوس به سختی تولید ساقه می‌کند و همان‌طور که قبلاً گفته شد تیمارهای محدودی تولید ساقه کردند.

جدول ٤- اثر تیمارهای مختلف بر میزان ساقه‌دهی و خصوصیات کالوس‌های تولید شده در گیاه کاکل زری *Pseudohandelia umbellifera*

تیمار هورمونی اولیه (mg/l)	تیمار هورمونی جهت ساقه‌زایی (mg/l)	نوع ریزنمونه	شماره تیمار	وزن تر کالوس(g)	وزن خشک کالوس(g)	اندازه کالوس(cm^3)	مشاهدات کالوس‌ها و وضعیت ساقه‌دهی
BAP (1 mg/l)	BAP (1 mg/l)	جوانه انتهایی	T1	۰/۷۴۸e-j	۰/۰۶۹d-g	۱/۳۵h-m	تولید چندین شاخه
BAP (2 mg/l)	بدون هورمونMS	جوانه جانبی	T2	۰/۷۶۵e-i	۰/۰۳۲h-n	۱/۳۱i-m	کالوسها پودری و قهوه‌ای رنگ شدند
BAP (3 mg/l)		برگ	T3	۰/۷۰۸e-j	۰/۰۵۱g-l	۲/۴۳cde	–
		جوانه انتهایی	T4	۰/۲pq	۰/۲۰۸b	۶/۱۳a	–
		جوانه جانبی	T5	۱/۴۸۶a	۰/۰۷۵d-g	۲/۳۳c-f	کالوسها آبکی و دارای بافت نرم
BAP (3 mg/l)	بدون هورمونMS	برگ	T6	۰/۷۱e-j	۰/۰۶۲d-h	۰/۸۷k-o	تولید ساقه‌های کوتاه
		جوانه جانبی	T7	۰/۷۲۲e-j	۰/۰۵۲f-k	۱/۷۳f-j	کالوس‌ها پودری قهوه‌ای و کرم رنگ
BAP (1 mg/l) + IAA (1 mg/l)	بدون هورمونMS	برگ	T8	۱/۱۱۳bc	۰/۰۵۷f-j	۲/۷۵bcd	–
BAP (2 mg/l) + IAA (1 mg/l)	BAP (2 mg/l) + IAA (1 mg/l)	برگ	T9	۰/۲۵۴n-q	۰/۰۱۹lmn	۰/۳۲op	کالوس‌ها قهوه‌ای و آبکی و دارای بافت نرم
BAP (2 mg/l) + IAA (1 mg/l)	بدون هورمونMS	برگ	T10	۰/۹۰۷b-e	۰/۰۹۱cd	۲/۲۴c-f	–
		جوانه انتهایی	T11	۰/۹۲۴b-e	۰/۰۵۵f-k	۲/۸۵bc	–
		جوانه جانبی	T12	۰/۲۸۶n-q	۰/۰۲۴k-n	۰/۴۳op	–
BAP (3 mg/l) + IAA (1 mg/l)	BAP (3 mg/l) + IAA (1 mg/l)	برگ	T13	۰/۲۰۲pq	۰/۰۱۲n	۰/۳۴op	تولید شاخه منشعب کوتاه و برگ‌های کوچک
		جوانه انتهایی	T14	۰/۵۵۵h-m	۰/۰۲۶j-n	۱/۷۵f-j	–
		جوانه جانبی	T15	۰/۴۹۹i-n	۰/۰۲۹i-n	۰/۵۶nop	کالوس‌ها سفت، کرم رنگ متمایل به رنگ قرمز
BAP (3 mg/l) + IAA (1 mg/l)	بدون هورمونMS	برگ	T16	۱/۰۶۴bcd	۰/۱۱۱c	۳/۱۷b	–
		جوانه انتهایی	T17	۰/۲۵۷n-q	۰/۰۱۸mn	۰/۷۳۷l-o	–
		جوانه جانبی	T18	۰/۶۷۲e-j	۰/۰۶۶d-g	۱/۹۷e-h	تولید ساقه‌های مجتمع
KIN (0.5 mg/l) + BAP (1 mg/l)	بدون هورمونMS	جوانه انتهایی	T19	۰/۳۹۷k-p	۰/۰۳۱h-n	۰/۷۲mno	کالوس‌های قهوه‌ای
(0.25 2,4-D mg/l)	(0.25 2,4-D mg/l)	برگ	T20	۰/۸۷۱c-f	۰/۰۶d-i	۱/۴۶g-k	–
		جوانه انتهایی	T21	۰/۳۰۷m-q	۰/۳۰۹a	۰/۴۹op	–
		جوانه جانبی	T22	۱/۱۶۳b	۰/۰۷۱d-g	۲/۱۶def	–
(0.25 2,4-D mg/l)	بدون هورمونMS	برگ	T23	۰/۸۱۲d-h	۰/۰۶۸d-g	۱/۲۷i-m	تولید ریشه‌های پر مانند
		جوانه جانبی	T24	۰/۷۸۳e-h	۰/۰۴۷g-m	۱/۲i-n	–
		برگ	T25	۰/۹۳۷b-e	۰/۰۸۸cde	۱/۸۳e-i	–
(0.5 mg/l) 2,4-D	(0.5 mg/l) 2,4-D	جوانه انتهایی	T26	۰/۰۷q	۰/۰۱n	۰/۰۲p	کالوس‌ها تحلیل رفته و از بین رفتند
(0.5 mg/l) 2,4-D	بدون هورمونMS	برگ	T27	۰/۲۱۹opq	۰/۰۲۴k-n	۰/۵۵nop	تولید ریشه‌های کم و کوتاه
(0. 25 2,4-D mg/l) + KIN (1 mg/l)	(0. 25 2,4-D mg/l) + KIN (1 mg/l)	برگ	T28	۰/۸۵۲c-g	۰/۰۷d-g	۰/۶۱nop	–
		جوانه انتهایی	T29	۰/۸۷۹c-f	۰/۰۵۷e-j	۲efg	–
(0. 25 2,4-D mg/l) + KIN (1 mg/l)	بدون هورمونMS	برگ	T30	۰/۴۷۷j-o	۰/۰۸۳c-f	۱/۳۸g-l	–
		جوانه انتهایی	T31	۰/۳۴۱l-q	۰/۰۳۱h-n	۰/۵۵nop	کالوس‌ها تحلیل رفته و از بین رفتند

		جوانه جانبی	T32	۰/۱۵۴pq	۰/۰۱۶mn	۰/۳op	تولید کالوس بیشتر و ایجاد ساقه‌های مجتمع
(0. 25 2,4-D mg/l) + KIN (1 mg/l)	بدون هورمونMS	جوانه انتهایی	T33	۰/۵۹g-l	۰/۰۴۴g-m	۱/۱۷j-n	–
TDZ (0.5 mg/l)	بدون هورمونMS	جوانه جانبی	T34	۰/۶۰۸f-k	۰/۰۴۸g-m	۰/۷۵l-o	–

*– میانگین‌های دارای حرف مشترک در هر ستون فاقد اختلاف معنی‌دار بر اساس آزمون دانکن در سطح ۵٪ می باشند.



شکل ۵- کشت بافت گیاه کاکل‌زری در شرایط درون‌شیشه‌ای: الف) کالوس‌های تولیدی طبیعی و سبز رنگ یک هفته پس از انتقال به محیط باززایی MS، ب) شروع ساقه‌دهی، ج) گیاه کامل باززایی شده پس از انتقال به محیط پیت و پرلیت جهت انتقال به گلخانه

پاسخ گیاهان مختلف به تیمارهای هورمونی محیط‌کشت جهت تولید کالوس یا اندام‌زایی به میزان زیادی به ژنتیک گیاه مربوط می‌شود و در بسیاری موارد نیاز هست برای هر گونه خاص و یا حتی رقم مشخصی آزمایش‌هایی جهت تعیین بهترین محیط‌کشت و نوع هورمون انجام شود (۳).

به‌طور کلی در بین تیمارهای مختلف هورمونی و ریزنمونه‌های مورد استفاده جهت کالوس‌زایی در این پژوهش، تیمارهای حاوی هورمون BAP به تنهایی و یا ترکیب با IAA تیمارهای موفقی ارزیابی شدند و تیمارهای هورمونی 2,4-D تیمارهای مناسبی برای این گیاه نبودند. هم‌چنین بین ریزنمونه‌ها تفاوت زیادی وجود نداشت و به نظر می‌رسد بهتر است ریزنمونه برگ به دلیل سهولت و در دسترس بودن جهت مطالعات بعدی استفاده شود. جهت تکمیل و تحقیقات آینده برای مطالعات کشت‌بافت این گیاه انجام آزمایشات لازم در رابطه با بهینه‌سازی محیط کشت به‌منظور ساقه‌زایی و ریشه‌زایی این گیاه پیشنهاد می‌شود.

سپاسگزاری

این پژوهش در قالب طرح شماره ۲ به شماره ۴۵۹ پ (۱۳۸۸/۱۲/۸) و با حمایت معاونت پژوهشی دانشکده کشاورزی انجام شده است و بدین‌وسیله نویسندگان این مقاله از حمایت حوزه پژوهشی دانشکده کشاورزی و دانشگاه فردوسی مشهد و کارشناسان محترم پژوهشکده علوم گیاهی کمال تشکر خود را اعلام می‌دارند.

منابع

۱- چلبیان ف.، راجعیان ن. و پیوندی م. ۱۳۸۶. مطالعه کشت‌بافت گیاه بومادران هزار برگ .*Achillea millefolium* L. فصلنامه تحقیقات ژنتیک و

اصلاح گیاهان مرتعی و جنگلی ایران، ۱۵ (۴): ۳۴۸-۳۳۶.
۲- حسن‌پور ح.، برنارد ف. و شاکر ح. ۱۳۸۶. بهینه‌سازی کشت بافت آویشن شیرازی (*Zataria multiflora* Boiss) برای تولید اسید رزمارینیک. فصلنامه تحقیقات ژنتیک و اصلاح گیاهان مرتعی و جنگلی ایران، ۱۵ (۱): ۹-۱.
۳- فارسی م. و باقری ع. ۱۳۸۸. اصول اصلاح نباتات. انتشارات جهاد دانشگاهی مشهد، ۳۶۸ صفحه.
۴- قاسمی عمران و.، باقری ع. و مشتاقی ن. ۱۳۸۶. بهینه‌سازی کشت به‌منظور ساقه‌زایی گیاه عدس در شرایط این‌ویترو. مجله علوم کشاورزی دانشگاه آزاد اسلامی، ۱۳ (۱): ۱۴۷-۱۳۹.
۵- مظفریان و. ۱۳۸۴. فرهنگ نام‌های گیاهان ایران. انتشارات فرهنگ معاصر، ۶۷۱ صفحه.
6- Cristina A., Figueiredo S., Salomé M. and Pais S. 1991. *Achillea millefolium* cell suspension cultures: establishment and growth conditions. Journal of Biotechnology Letters, 13: 63 – 68.
7- Ebrahimie E., Habashi A.A., Ghareyazie B., Ghannadha M. and Mohammadi M. 2003. A rapid and efficient method for regeneration of plantlets from embryo explants of cumin. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 75: 19-25.
8- Echeverrigaray S., Fracaro F., Andrade L.B., Biasio S. and Atti-Serafini L. 2000. *In vitro* shoot regeneration from leaf explants of Roman Chamomile. Journal of Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 60: 1-4.
9- Ghani A., Akramian M., Hassanzadeh-Khayyat M. and Joharchi M.R. 2010. The Essential Oil Analysis of *Pseudohandelia umbellifera* (Boiss.) Tzvel. Growing in Iran. Journal of Essential Oil Bearing Plants, 13 (5): 568-574.
10- Podlech D. 1986. *Pseudohandelia* Tzvel. In: Rechinger K.H. (ed.), Flora Iranica, Anthemideae, Vol. 158, pp. 151-153. Academische Druck and Verlagsanstalt, Graz, Austria.
11- Wawrosch C., Kopp B. and Kubelka W. 1994. *In vitro* propagation of *Achillea asplenifolia* VENT. through multiple shoot regeneration. Journal of Plant Cell Report, 14: 161-164.