پاسخ پرچم و مادگی انار شیطان (*Tecomella undulata* L.) به تنظیم کننده‌های رشد مختلف در کشت درون شیشه‌ای

ساسان راستگو[1*]

۱ - استادیار گروه علوم باغبانی، دانشگاه خلیج فارس (بوشهر)، برازجان.

* نویسنده مسئول: rastgoo@pgu.ac.irsnrastgoo@yahoo.com

چکیده

انار شیطان از تیره پیچ‌اناریان از جمله گونه‌های درختی گل‌دهنده و بسیار زیبای جنوب کشور است که به دلیل عدم بذردهی و زادآوری بذری، سخت ریشه‌زا بودن و فراهم نبودن روش ازدیاد رویشی مؤثر برای آن و نیز تحلیل رفتن توده‌های آن به دلایل محیطی و انسانی متعدد، در معرض خطر انقراض قرار گرفته است. ازدیاد کشت بافتی این گونه با استفاده از ریزنمونه‌های گره، میانگره و یا پینه تا کنون موفقیت چندانی نداشته است. در این پژوهش از پرچم و مادگی گل این گیاه به عنوان ریزنمونه در محیط کشت حاوی ترکیبات مختلف تنظیم کننده‌های رشد بنزیل آدنین، ایندول استیک اسید و جیبرلیک اسید استفاده شد تا پاسخ باززایی آنها بررسی شده و امکان تولید گیاهچه با این روش ارزیابی گردد. نتایج نشان داد که بافت تخمدان مادگی از توان بالایی برای رشد و نمو در جهت باززایی اندام و یا رویان برخوردار است. کلاله نیز با تولید پینه در بیشتر تیمارهای آزمایشی توان نسبتاً خوبی برای باززایی غیرمستقیم را به نمایش گذاشت. بنابراین بهینه سازی محیط کشت پایه، غلظت، نوع و ترکیب تنظیم کننده‌های رشد مختلف می‌تواند به نتایج امیدوار کننده‌ای برای ازدیاد موفق درون شیشه‌ای این گونه گیاهی ارزشمند بیانجامد.

کلمات کلیدی : انار شیطان، کشت بافت، باززایی، پرچم، مادگی

مقدمه

انار شیطان درختی کوچک و بسیار زیبا از تیره پیچ‌اناریان (Bignoniaceae) و از جنس و گونه *Tecomella*، از گونه‌های چوبی با ارزش بومی جنوب آسیا است. این گونه از گونه‌های مهم مناطق بیابانی و خشک در جنوب ایران می‌باشد که در استان‌های بوشهر، خوزستان، هرمزگان، فارس، کرمان و سیستان و بلوچستان به صورت توده‌های کوچک نسبتاً خالص پراکنش دارد. درخت انار شیطان از زیباترین درختان گل‌دهنده دنیا، ویژه مناطق گرمسیر و نیمه گرمسیر بوده که عمدتاً به منظور جنگل کاری، بیابان‌زدایی و احداث فضای سبز پهنه‌های خشک استفاده می‌شود (حسینی و همکاران، ۱۳۷۹). ولی متأسفانه رویشگاه‌های آن تحت تأثیر عوامل مختلفی نظیر خشکسالی‌های طولانی مدت، چرای بی رویه دام، برداشت چوب، فعالیت‌های انسانی از جمله جاده‌سازی و گسترش و توسعه شهری، کشاورزی و صنعتی در حال تخریب است.

انار شیطان، علی‌رغم تولید بسیار انبوه گل، بنا به دلایل نه چندان روشن بندرت غلاف بذری و بذر تولید می‌کند که این خود یکی از اصلی‌ترین عوامل رو به انقراض رفتن این گونه است (حسینی و همکاران، ۱۳۷۹). تکثیر این گیاه بصورت دست کاشت تا کنون دیده نشده است. بسیار سخت ریشه زا بودن قلمه‌ی این گونه نیز دشواری ازدیاد آن را دوچندان کرده است (راستگو، ۱۳۹۳؛ Tyagi et al., 2011) از این رو، تولید انبوه نهال این گونه با استفاده از تکنیک کشت بافت مورد توجه محققان متعددی قرار گرفته است (Nandwani et al., 1995, 1996; Aslam et al., 2009; Tyagi & Tomar, 2013). با این وجود، تقریباً همه پژوهش-های منتشر شده در خصوص ریزازدیادی درون شیشه‌ای انار شیطان، با استفاده از ریزنمونه‌های قطعات گره‌ای ساقه و یا پینه های مشتق از آنها بوده‌اند که به دلیل شکست در ریشه‌دار کردن ریز شاخه‌های تولید شده میزان باززایی گیاهچه کامل بسیار پایین وحتی

صفر گزارش شده است. از این رو، پروژه حاضر با هدف بررسی پاسخ ریزنمونه‌های پرچم و مادگی گل انار شیطان به محیط کشت درون شیشه‌ای حاوی تنظیم کننده‌های رشد مختلف وامکان سنجی باززایی گیاهچه از طریق این تکنیک انجام گرفت.

مواد و روش‌ها

تهیه محیط‌های کشت

در این پژوهش از محیط کشت موراشیک و اسکوگ تغییر یافته شماره ۱ (MS Modification No.1) (با نصف غلظت عناصر ماکرو و ویتامین‌های محیط MS) (تهیه شده از شرکت HiMedia) همراه با ساکارز به میزان ۳۰ گرم بر لیتر آب مقطر استفاده شد. آگار به میزان ۷/۸ گرم بر لیتر اضافه شد. pH محیط کشت پیش از اتوکلاو کردن آن در ۰/۱ ±۵/۸ تنظیم شد. استریل کردن محیط‌های کشت در دمای ۱۲۱ °C و فشار ۱/۱ اتمسفر به مدت ۲۰ دقیقه انجام شد. در محیط‌های کشت از تنظیم کننده‌های رشد بنزیل آدنین (BA) در سطح ۰/۷۵ میلی گرم برلیتر، ایندول استیک اسید (IAA) در سطوح ۰/۰۵، ۰/۱ و ۰/۲ میلی گرم بر لیتر، و جیبرلیک اسید (GA3) در سطوح صفر، ۰/۲ و ۰/۵ میلی گرم بر لیتر در ترکیب با هم استفاده شد. در مجموع آزمایش با دو نوع ریزنمونه‌ی پرچم و مادگی (به صورت کامل)، ۹ تیمار محیط کشت با سه تکرار و هر تکرار شامل ۳ تا ۴ عدد ریزنمونه کشت شده در یک شیشه مربایی ۲۰۰ میلی لیتری حاوی ۳۰ میلی لیتر محیط کشت بود.

آماده سازی و کشت ریزنمونه ها و ثبت مشاهدات

خوشه های گل انار شیطان حاوی غنچه‌های باز نشده در دی‌ماه ۱۳۹۳ از درختان بالغ رویشگاه شبانکاره‌ی دشتستان دراستان بوشهر برداشت شده و به آزمایشگاه منتقل شدند. برای ضد عفونی سطحی، درون دستگاه جریان هوای لامینار، غنچه‌ها در الکل ۹۶٪ به مدت ۱۵ ثانیه فرو برده شدند. سپس با پنس استریل کاسبرگ‌ها و گلبرگ‌ها را حذف نموده و پرچم‌ها و مادگی گل با تیغ اسکالپل قطع شده و در شیشه‌های کشت به صورت افقی در تماس با محیط کشت قرار داده شدند. چهار هفته پس از کشت، وضعیت دو نوع ریزنمونه در محیط‌های مختلف از لحاظ رشد و تولید بافت یا اندام بررسی و مشاهدات ثبت شدند.

نتایج

آزمایشی به منظور بررسی واکنش اندام‌های زایشی انار شیطان به ترکیب‌های مختلف تنظیم کننده‌های رشد در محیط کشت درون شیشه‌ای با استفاده از محیط پایه MS Modification No.1 انجام گرفت. نتایج نشان داد که تیمارهای مورد استفاده در این آزمایش قادر به القای پاسخ باززایی در اجزاء پرچم این گیاه نیستند و با وجود زنده ماندن درصدی از بساک‌ها ویا میله‌های پرچم در برخی تیمارها و حتی رؤیت پینه زایی در یک مورد (شکل ۱)، به منظور دریافت پاسخ باززایی بهتر باید از تغییر غلظت‌های تنظیم کننده‌های استفاده شده، استفاده از سایر تنظیم کننده‌های رشد و حتی اعمال پیش تیمارهایی نظیر پیش تیمار دمای پایین جهت القای توان باززایی در آنها بهره گرفت.

ریزنمونه‌های مادگی پاسخ‌های بهتری در مقایسه با پرچم‌ها نشان دادند (جدول ۱). در محیط‌های حاوی BA و در غیاب GA_3 با افزایش غلظت IAA، بیشترین واکنش را تخمدان مادگی با حجیم شدن، پارگی پوست و متورم شدن بافت میانی و رشد و برجسته شدن تخمک‌ها نشان داد. مشاهدات ما نشان داد که تخمک‌های متورم شده در صورت دریافت تیمار هورمونی مناسب جهت ادامه رشد و نمو، توان نمو به پیش رویان، رویان کامل و در نهایت باززایی گیاهچه را دارند (شکل ۲). حضور ۰/۲ میلی گرم بر لیتر GA_3 در محیط کشت بالاخص زمانی که در ترکیب با ۰/۱ میلی گرم بر لیتر IAA بود نمو تخمک‌های بیرون زده از تخمدان را افزایش داد در حالی که افزایش غلظت آن به ۰/۵ میلی گرم بر لیتر منجر به افزایش نمو تخمک‌ها نشد و تنها به طویل شدگی کلی تخمدان انجامید.

بافت خامه مادگی ضعیف‌ترین پاسخ باززایی را در همه ترکیبات همرمونی محیط‌های کشت نشان داد و بارزترین پاسخ آن طویل شدگی بویژه در محیط‌های حاوی ۰/۵ میلی گرم بر لیتر GA_3 بود. گسترش سطحی و تولید پینه نیز پاسخ بافت کلاله مادگی در بیشتر تیمارهای استفاده شده بود. با وجود این، بخش عمده پینه‌های مشتق از کلاله‌ها از نوع آبکی بود که قابلیت باززایی اندام و یا رویان پایینی دارند. به نظر می رسد با وجود پتانسیل تولید پینه در بافت کلاله، می‌توان با تغییر غلظت و یا نوع تنظیم کننده رشد تولید پینه‌های ترد و یا فشرده را از این بافت انتظار داشت که قابلیت باززایی بیشتری را دارند.

جدول ۱- پاسخ مادگی انار شیطان به تیمارهای تنظیم کننده‌های رشد مختلف در محیط کشت MS No.1 چهار هفته پس از کشت

تیمار			پاسخ		
BA (mg L^{-1})	IAA (mg L^{-1})	GA_3 (mg L^{-1})	تخمدان	خامه	کلاله
۰/۷۵	۰/۰۵	۰	طویل شده و به رنگ سبز	طویل شده به رنگ سبز روشن	تولید پینه‌ی ترد زرد روشن
۰/۷۵	۰/۱	۰	با پوست ترکیده و ظهور تخمک‌ها	اندکی تورم و به رنگ سبز روشن زیتونی	تولید پینه‌ی آبکی قهوه‌ای روشن
۰/۷۵	۰/۲	۰	کاملاً ترکیده و تخمک‌ها از بافت میانی بیرون زده	اندکی تورم و به رنگ سبز روشن زیتونی	تولید زیاد پینه‌ی ترد و آبکی زرد طلایی
۰/۷۵	۰/۰۵	۰/۲	با پوست ترکیده و ظهور تخمک‌ها	به رنگ سبز روشن	تولید پینه‌ی ترد قهوه‌ای روشن
۰/۷۵	۰/۱	۰/۲	کاملاً ترکیده با تخمک‌های برجسته و تولید کمی پینه ترد	به رنگ سبز روشن	تولید زیاد پینه‌ی ترد قهوه‌ای روشن
۰/۷۵	۰/۲	۰/۲	طویل شده با تولید کمی پینه ترد	طویل شده به رنگ سبز روشن	تولید زیاد پینه‌ی ترد قهوه‌ای روشن
۰/۷۵	۰/۰۵	۰/۵	طویل شده با تولید کمی پینه ترد	طویل شده به رنگ سبز روشن	تولید زیاد پینه‌ی ترد قهوه‌ای روشن
۰/۷۵	۰/۱	۰/۵	*	*	*
۰/۷۵	۰/۲	۰/۵	طویل شده با تولید کمی پینه ترد	طویل شده به رنگ سبز روشن	تولید کمی پینه آبکی زرد روشن

* عدم ثبت مشاهدات به دلیل از بین رفتن نمونه‌ها توسط آلودگی

شکل ۱- تولید پینه ترد-آبکی در قاعده میله پرچم

شکل ۲- ترکیدگی تخمدان و نمو تخمک‌ها همراه با تولید پینه

پیشتر، در پژوهشی بر روی باززایی از قطعات مادگی گونه‌ای از مرکبات نیز بیشترین پاسخ به فرم تولید پینه فشرده از بافت تخمدان و سپس از کلاله مشاهده شد که با نتایج پژوهش در تطابق آن نتایج می باشد (Rastgoo et al., 2008). هر نوع پاسخ

باززایی از هر نوع ریزنمونه‌ای مستلزم دریافت میزان کافی از عناصر غذایی و تنظیم کننده‌های رشد است. به نظر می‌رسد که بافت تخمدان به لحاظ سرشاربودن از مواد مغذی و هورمون‌های لازم مورد نیاز رشد و نمو تخمک‌ها، در زمان کشت روی محیط کشت درون شیشه‌ای و دریافت تکمیلی عناصر غذایی و تنظیم کننده‌های رشد از این محیط، پاسخ رشدی و باززایی سریع‌تر و بیشتری را نسبت به کلاله و خامه نشان می دهد. بافت کلاله نیز که میزبان و محیط مساعد جوانه‌زنی دانه گرده است به طور طبیعی از محتوای غذایی و هورمونی بهتری نسبت به بافت خامه که تنها وظیفه هدایت لوله گرده را دارد برخوردار است و بنابراین پاسخ بیشتری را نسبت به خامه به محیط کشت درون شیشه‌ای می دهد.

به طور کلی، نتایج پژوهش حاضر نشان داد که بافت تخمدان مادگی بویژه تخمک‌ها توان بالقوه بالایی برای باززایی از خود نشان می‌دهد به طوری که با بهینه سازی محیط کشت و تنظیم کننده‌های رشد برای مراحل مختلف رشد و نمو آن امکان باززایی گیاهچه به روش رویان‌زایی مستقیم و نیز باززایی اندام و رویان از پینه مشتق از آن بسیار محتمل می‌باشد.

منابع

۱. حسینی، سید حسین و فخری، ف. و کازرونی، ح. ۱۳۷۹. بررسی خصوصیات اکولوژیک سمنگ (*Tecomella undulata*) و ارزش اقتصادی آن در استان بوشهر. مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی بوشهر.

۲. راستگو، ساسان. ۱۳۹۳. امکان سنجی تکثیر درخت انار شیطان (*Tecomella undulata*) با روش کشت بافت و قلمه. گزارش نهایی طرح پژوهشی، دانشگاه خلیج فارس (بوشهر)، ۷۰ صفحه.

3. Aslam, M., Singh, R., Anandhan, S., Pande, V. and Ahmed, Z. 2009. Development of a transformation protocol for *Tecomella undulata* (Smith) Seem from cotyledonary node explants. Sci. Hortic. 121: 119–121

4. Nandwani, D., Mathur, N. and Ramawat, K.G. 1995. *In-vitro* shoot multiplication from cotyledonary node explants of *Tecomella undulata.* Gartenbauwissenschaft, 60: 65-68.

5. Nandwani, D., Sharma, R. and Ramawat, K.G. 1996. High frequency regeneration in callus cultures of a tree-*Tecomella undulata*. Gartenbauwissenschaft, 61(3): 147-150.

6. Rastgoo, S. 2008. Studies on in vitro regeneration of pummelo (*Citrus grandis* [L.] Osb.). Ph.D thesis, University of Agricultural Sciences, GKVK, Bangalore, India.

7. Tyagi, H.S., Choudhary G.R. and Tomar, U.K. 2011. Clonal propagation of an economically important woody tree of the arid zone-*Tecomella undulata* (Sm.) Seem. In: *Proceeding of 1st Indian Forest Congress* held at NAS Complex Pusa New Delhi on Nov. 22-25 2011. pp 356-362.

8. Tyagi, H.S. and Tomar, U.K. 2013. Factors affecting *in vitro* shoot proliferation and rooting of mature *Tecomella undulata* (Sm.) Seem Tree. Res. in Plant Sci., 1(2): 38-44.

Response of stamen and pistil of desert teak (*Tecomella undulata* (Sm.) Seem) to different plant growth regulators in *in vitro* culture

S. Rastgoo[1]*

1- Assistant Professor, Department of Horticultural Sciences, Persian Gulf University (Bushehr), Borazjan
Corresponding auther: snrastgoo@yahoo.com rastgoo@pgu.ac.ir

Abstract

Desert teak from Bignoniaceae family is of very beautiful flowering tree species of the southern regions of Iran that due to lack of seed setting and seed reproduction, being difficult-to-root and unavailability of an efficient vegetative propagation method, and also declining its stands because of numerous environmental and human factors, is under threat of extinction. Tissue culture propagation for this species using nodal, internodal and callus explants has not yielded much success so far. In this research, stamen and pistil explants of the plant was used in culture media containing different combinations of growth regulators *i.e* benzyl adenine, indole-3-acetic acid and gibberellic acid in order to be investigated their regeneration response and evaluated the possibility of plantlet production

through this method. The results showed that ovary tissue has high capability for growth and development in the direction of organ and embryo regeneration. Also, stigma tissue by producing callus in most of the experimental treatments, exhibited fairly good potential for indirect (callus-mediated) regeneration. Therefore, optimization of culture medium, and type, concentration and combination of different plant growth regulators can result in promising results for successful *in vitro* propagation of this valuable plant species.

Key words: Deser teak, tissue culture, regeneration, stamen, pistil