باززایی شاخساره از ریزنمونه جوانه جانبی گل مریم *Polianthes tuberosa* L. با استفاده از تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی در شرایط کشت درون شیشه‌ای

محمدحسین دانشور*[۱]، مهری حاویل[۲]

[۱*] نویسنده مسئول: استاد تمام گروه علوم و مهندسی باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان، ایران

[۲] دانشجوی کارشناسی ارشد فیزیولوژی و اصلاح گل وگیاه زینتی، گروه علوم و مهندسی باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان، ایران

*نویسنده مسئول: mhdaneshvar2004@yahoo.com

چکیده

گل مریم (*Polianthes tuberosa* L.) یکی از مهم‌ترین گل‌های شاخه بریده زینتی و معطر در صنعت گل‌کاری است که بومی مکزیک می‌باشد. در این پژوهش اثر غلظت‌های مختلف تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی و محیط کشت MS در سه غلظت (کامل، نیم و یک چهارم) بر روی تولید شاخساره از ریزنمونه جوانه جانبی گل مریم مورد بررسی قرار گرفت. آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۳ تکرار انجام شد. ریزنمونه جوانه جانبی در محیط کشت MS همراه با تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی شامل KIN (۰/۲۵، ۰/۵، ۱، ۲ و ۴ میلی‌گرم در لیتر)، BAP (۰/۲۵، ۰/۵، ۱ و ۲ میلی‌گرم در لیتر) به‌منظور اندازه‌گیری طول شاخساره مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج نشان داد، بیشترین طول شاخساره با میانگین ۳/۷۵ سانتی‌متر در محیط‌کشت MS تمام غلظت حاوی ۰/۲۵ میلی‌گرم در لیتر KIN همراه با ۰/۲۵ میلی‌گرم در لیتر BAP بود. کمترین طول شاخساره (بدون باززایی شاخساره) در محیط‌کشت MS تمام غلظت و MS یک‌چهارم غلظت حاوی ۴ میلی‌گرم در لیتر KIN و محیط‌های کشت MS (تمام غلظت، نیم غلظت و یک‌چهارم غلظت) بدون تنظیم-کننده‌های رشد گیاهی مشاهده شد.

کلمات کلیدی: طول شاخساره، محیط‌کشت MS، کشت بافت

مقدمه

گل مریم با نام علمی *Polianthes tuberosa* L. یک گیاه چند ساله از تیره خنجری‌سانان[۱] است. این گونه شامل ۲ واریته به نام‌های *P. tuberosa* var. *single* و *P. tuberosa* var. *double* می‌باشد (Solano, 2000). شاخه گل مریم از مهم ترین گل‌های شاخه بریده در مناطق گرمسیری و نیمه گرمسیری محسوب می‌شود (Barba-Gonzalez *et al*., 2012).

زیستگاه اصلی این گل، کشور مکزیک می‌باشد (Verhoek, 1998). جایگاه نخست پرورش گیاه مریم در کشورهایی از قبیل مکزیک، چین، هند، نیوزلند و تایوان بوده است (Hutchinson *et al*., 2004).

گل مریم یک گیاهی است که بذر تولید نمی‌کند. به طور تجاری از طریق سوخ تولید می‌شود. هر سوخ توانایی تولید یک گل دارد. عملکرد گل‌ها بستگی زیادی به اندازه سوخ‌های استفاده شده در کاشت (Yadav *et al*., 1984) و شرایط محیطی دارد (Brundell and Steenstra, 1985). هنگام استفاده از این تکنیک تکثیر، مشکلات زیادی وجود دارد. چالش‌های اصلی مواجهه با تولید و بازاریابی برای گل‌های شاخه بریده مریم با کیفیت خوب، استفاده از سوخ‌های آلوده در زمان تکثیر می‌باشد.

---

[1]- Agavaceae

IrHC2019

کشت بافت برای به‌دست آوردن گیاهان عاری از ویروس یا برای افزایش میزان تکثیر و به‌طور موفقیت‌آمیزی برای استفاده در برنامه‌های به‌نژادی استفاده می‌شود. هدف اصلی در ریزازدیادی گل مریم، تولید تعداد زیادی گیاه در یک مدت زمان کوتاه می‌باشد.

اندام‌زایی می‌تواند به‌صورت مستقیم یا غیرمستقیم اتفاق بیفتد. در اندام‌زایی مستقیم[۲] اندام‌های گیاهی از قبیل شاخه‌ها و ریشه‌ها به‌طور مستقیم از ریزنمونه‌های کشت شده شکل می‌گیرند در حالی‌که در اندام‌زایی غیر مستقیم[۳]، اندام گیاهی از کالوس شکل می‌گیرد. ظهور شاخه‌های نابجا و یا دیگر ارگان‌ها به‌طور مستقیم از ریزنمونه‌های گیاهی یک روش مناسب برای تولید گیاهان همسان[۴] در مقایسه با تولید گیاه از طریق کالوس می‌باشد. بر این اساس که اندام‌زایی مستقیم می‌تواند از بافت گیاهی عاری از تشکیل کالوس به‌دست آید. می‌توان با استفاده از ریزنمونه‌های گیاهی، گیاهان با ساختار ژنتیکی گیاه مادری را به تعداد بسیار زیاد تولید نمود (Gantait *et al*., 2014).

برمبنای کاربردهای زیاد گل مریم، پایین بودن میزان تکثیر در شرایط کشت طبیعی و آلودگی‌های قارچی و ویروسی در سوخ مریم، تکثیر انبوه این گونه از طریق کشت بافت ضروری می‌باشد، هم‌چنین با توجه به مزایای زیادی که می‌تواند از گل مریم به‌دست آید و به‌منظور بهبود بهره‌وری و تحقق خواسته‌های مصرف کنندگان، مطالعات مربوط به تکثیر این گونه بسیار مهم است.

مواد و روش‌ها

این پژوهش در آزمایشگاه کشت بافت گروه باغبانی دانشگاه کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان واقع در شهر ملاثانی در سال ۱۳۹۷ انجام شد. سوخ‌های مورد استفاده گل مریم از شهرستان دزفول تهیه شدند. پس از ضدعفونی پیازها با قارچکش بنومیل به میزان ۱۰ گرم در لیتر به‌مدت ۳۰ دقیقه و شستشو با آب مقطر و خشک کردن در هوای آزمایشگاه، در سردخانه آزمایشگاه در دمای ۴+ درجه سلسیوس نگهداری شدند. در این پژوهش از ریزنمونه جوانه جانبی سوخ گیاه مریم استفاده شد. در این آزمایش جوانه جانبی هر سوخ کامل گندزدایی شدند.

۱- گندزدایی جوانه جانبی

گندزدایی با قرار دادن سوخ کامل در زیر جریان آب به‌مدت یک ساعت، سپس قارچکش بنومیل ۷ در هزار به‌مدت یک ساعت و شستشو با آب مقطر انجام شد. در ادامهٔ این مرحله، آزمایش در زیر دستگاه لامینار ایر فلو ادامه یافت به این ترتیب که ابتدا جوانه جانبی سوخ‌ها را جدا کرده، سپس با استفاده از الکل اتیلیک ۷۰٪ به‌مدت ۱ دقیقه و هیپوکلریت سدیم ۳۰٪ (۵/۲۵ ٪ کلر فعال) به‌مدت ۱۰ دقیقه و ۳ مرحله شستشو با آب مقطر، هر مرحله ۳ دقیقه، گندزدایی انجام شد.

۲- آزمایش پرآوری جوانه جانبی

جهت پرآوری شاخساره آزمایشی به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی در سه تکرار (هر تکرار شامل پنج شیشه کشت) اجرا گردید. در این آزمایش از ریزنمونه جوانه جانبی، تیمارهای هورمونی مندرج در جدول ۱ و محیط کشت MS در سه غلظت (کامل، نیم و یک‌چهارم) برای هر تیمار، استفاده گردید. لازم به ذکر است که غلظت‌های مختلف محیط کشت MS برای هر تیمار هورمونی تکرار شد. برای مثال محیط کشت ۱ در سه غلظت کامل، نیم و یک‌چهارم، محیط کشت MS تهیه شد و سایر محیط‌های کشت به همین صورت تهیه شدند.

2- Direct organogenesis
3- Indirect organogenesis
4- Clone

IrHC2019

محاسبات آماری

داده‌های به‌دست امده با استفاده از نرم‌افزار آماری (۹/۳) SAS تجزیه و تحلیل شد. مقایسه میانگین‌ها در سطح احتمال خطای پنج درصد با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن انجام شد.

جدول۱- محیط‌های کشت مختلف پرآوری شاخساره

تیمارهای هورمونی	نوع و غلظت تنظیم‌کننده رشد گیاهی
شاهد	محیط‌کشت MS بدون تنظیم کننده رشد
محیط‌کشت ۱	0.25 mg/l Kin. + 0.25 mg/l BAP
محیط‌کشت ۲	0.5 mg/l Kin.+ 0.5 mg/l BAP
محیط‌کشت ۳	1.0 mg/l Kin.+1.0 mg/l BAP
محیط‌کشت ۴	2.0 mg/l Kin. + 2.0 mg/l BAP
محیط‌کشت ۵	0.5mg/l Kin.
محیط‌کشت ۶	1.0 mg/l Kin.
محیط‌کشت ۷	2.0 mg/l Kin.
محیط‌کشت ۸	4.0 mg/l Kin.

نتایج و بحث

نتایج تجزیه واریانس شاخص طول شاخساره اندازه‌گیری شده تحت تأثیر تیمارهای نوع محیط‌کشت پرآوری و غلظت‌های مختلف محیط‌کشت MS (تمام غلظت، نیم غلظت و یک‌چهارم غلظت) مورد استفاده به‌عنوان محیط‌کشت پایه نشان داد که شاخص اندازه‌گیری شده در محیط‌های کشت مختلف MS، نوع محیط‌کشت پرآوری و برهمکنش محیط‌های کشت مختلف MS و نوع محیط‌کشت پرآوری در سطح احتمال ۱ درصد آزمون دانکن معنی‌دار شدند (جدول ۲).

جدول ۲- تجزیه واریانس اثر غلظت‌های مختلف MS و محیط‌های‌کشت مختلف اندام‌زایی بر شاخص اندازه‌گیری شده در آزمایش پرآوری

منابع تغییر	درجه آزادی	میانگین مربعات
		طول شاخساره
غلظت MS	۲	۵/۶۹۸**
محیط‌کشت اندام‌زایی	۸	۵/۱۷۵**
غلظت MS × محیط‌کشت اندام‌زایی	۱۶	۱/۳۲۰**
خطای آزمایش	۵۴	۰/۰۳۹
ضریب تغییرات (درصد)	-	۱۷/۶۶۵

** تفاوت معنی دار در سطح احتمال خطای یک درصد

اثر محیط‌های کشت مختلف MS و محیط‌های کشت پرآوری شاخساره در ریزنمونه جوانه جانبی سوخ گیاه مریم نشان داد که بیش‌ترین طول شاخساره با میانگین ۳/۷۵ سانتی‌متر در محیط‌کشت MS تمام غلظت حاوی ۰/۲۵ میلی‌گرم

IrHC2019

در لیتر KIN همراه با ۰/۲۵ میلی‌گرم در لیتر BAP (محیط‌کشت ۱) بود. کم‌ترین طول شاخساره (بدون باززایی شاخساره) در محیط‌کشت MS تمام غلظت و MS یک‌چهارم غلظت حاوی ۴ میلی‌گرم در لیتر KIN (محیط‌کشت ۸) و محیط‌های کشت MS (تمام غلظت، نیم غلظت و یک‌چهارم غلظت) بدون تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی (محیط‌کشت شاهد) مشاهده شد (جدول ۳). بالا بودن سطوح سیتوکینین باعث تولید شاخساره‌های کوچکی می‌شود که از رشد طولی آن‌ها جلوگیری می‌شود. سطوح بالای سیتوکینین باعث می‌شود که در برخی گونه‌ها، برگ‌ها شکل غیر طبیعی به خود بگیرند (George *et al*., 2007). کاربرد سیتوکینین‌ها مانند KIN در محیط‌کشت باعث رشد سریع جوانه جانبی شاخه‌های سربرداری شده می‌شود.

Panigrahi و Saiyad (2013) طی پژوهشی با عنوان تکثیر درون شیشه‌ای گل مریم گزارش دادند که در میان انواع هورمون‌های استفاده شده برای تشکیل شاخه‌ها، بهترین پاسخ داده شده از محیط کشت MS حاوی ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر BAP و ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر کینتین با میانگین ۰/۲ ± ۳/۵ حاصل شد، که با نتایج پژوهش حاضر مطابقت داشت.

Rajasekaran و همکاران در سال ۲۰۰۰، باززایی مستقیم گیاه گل مریم با استفاده از بخش‌های سوخ به‌عنوان ریزنمونه را مورد بررسی قرار دادند و گزارش کردند که بهترین پاسخ باززایی روی محیط‌کشت MS حاوی ۳ میلی‌گرم در لیتر KIN بوده است.

جدول ۳- اثر برهمکنش محیط‌های کشت مختلف MS و محیط‌های کشت پرآوری بر طول شاخساره (سانتی‌متر)

* بر اساس آزمون مقایسه میانگین دانکن اعدادی که حروف متفاوت دارند از لحاظ آماری دارای تفاوت معنی‌داری در سطح

محیط‌کشت پرآوری	غلظت‌های مختلف MS		
	MS	1/2MS	1/4MS
شاهد	۰/۰۰^{k}	۰/۰۰^{k}	۰/۰۰^{k}
محیط‌کشت ۱	۳/۷۵۸^{a}	۲/۰۱۴^{c}	۱/۲۶۲^{def}
محیط‌کشت ۲	۱/۴۹۳^{de}	۱/۱۷۳^{efg}	۰/۶۴۷^{hij}
محیط‌کشت۳	۱/۲۰۰^{efg}	۱/۳۲۴^{def}	۰/۵۳۳^{ij}
محیط‌کشت۴	۱/۱۷۴^{efg}	۲/۹۷۵^{b}	۰/۷۳۹^{hij}
محیط‌کشت ۵	۲/۰۰۹^{c}	۰/۹۸۶^{fgh}	۰/۹۸۶^{fgh}
محیط‌کشت ۶	۰/۶۶۴^{hig}	۰/۸۴۴^{ghi}	۰/۶۴۳^{hij}
محیط‌کشت ۷	۳/۱۳۲^{b}	۱/۵۶۶^{d}	۰/۶۴۶^{hij}
محیط‌کشت ۸	۰/۰۰^{k}	۰/۴۶۲^{j}	۰/۰۰^{k}

احتمال خطای پنج درصد می‌باشند و اعداد دارای حروف مشابه معنی‌دار نمی‌باشند.

منابع

Barba-Gonzalez, R., Rodríguez-Domínguez, J. M., Castañeda-Saucedo, M. C., Rodríguez, A., Van Tuyl, J. M. and Tapia-Campos, E. 2012. Mexican Geophytes I. The Genus Polianthes. Floriculture and Ornamental Biotechnology Global Science Books, 122-128.

Brundell, D. J. and Steenstra, D. R. 1985. The effect of protected cultivation, presprouting and lateral tuber removal on tuberose production. *Acta Horticulture*, 177: 361-368.

IrHC2019

Gantait, S., Das, A. and Mandal, N. 2014. Stevia: a comprehensive review pharmacological properties and *in vitro* regeneration. An International Journal of Sugar Crops and Related Industries, 17, 95-106.

George, E. F., Hall, M. A. and De Klerk, G. J. 2007. Plant propagation by tissue culture. Springer Science and Business Media, Pp: 501

Hutchinson, M. J., Onamu, R. and Obukosia, S. 2004. Effect of thidiazuron, benzylaminopurine and naphthalene acetic acid on *in vitro* propagation of tuberose (*Polianthes tuberosa* L.) from shoot tip explants. Journal of Agriculture, Science and Technology, 6(1): 48-59.

Panigrahi, j. and saiyad, M. S. L. 2013. *In vitro* propagation of *Polianthus tuberosa* L. cultivars (*Calcutta single*). International Journal of Plant, Animal and Environmental Sciences, Pp: 76-79.

Rajasekaran, V., Haripriya, K. and Shakila, A. 2000. *In vitro* propagation of tuberose (*Polianthes tuberosa* L.). In Spices and aromatic plants: challenges and opportunities in the new century. Contributory papers. Centennial conference on spices and aromatic plants, Calicut, Kerala, India, Indian Society for Spices, Pp: 86-88.

Solano, C. E. 2000. Sistemática del género *Polianthes* L. (Agavaceae) (Doctoral dissertation, Tesis de doctorado. Facultad de Ciencias, División de Estudios de Posgrado, Universidad Nacional Autónoma de México. México, DF. Pp: 291).

Verhoek, S. 1998. Agavaceae. In: Kubitzki, K. (ed.) the families and genera of vascular plant, vol.3. Springer - verlag , berlin, Heidelberg and New York, Pp: 60-70

Yadav, L. P., Bose, T. K. and Maiti, R. G. 1984. Effect of bulb size and depth of planting on growth and flowering of tuberose (*Polianthes tuberosa* L.). Progressive Horticulture, 16: 209-213.

Shoot proliferation from *Polianthes tuberosa* L. lateral bud with Using of Plant Growth Regulators in *in vitro* Conditions

Mohammad Hossein Daneshvar[1], Mehri Havil[2]

1) Professor, Department of Sciences and Horticultural Engineering, College of Agriculture, Agricultural Sciences and Natural Resources University of Khuzestan
2) M.Sc. student, Department of Sciences and Horticultural Engineering, College of Agriculture, Agricultural Sciences and Natural Resources University of Khuzestan.

*Corresponding Author: mhdaneshvar2004@yahoo.com

Abstract

Tuberose (*polianthes tuberosa* L.) is one of the important ornamental and aromatic cut flower in floricultural industry which is originated in Mexico. In this study, the effect of different plant growth regulators and MS media in three concentrations (all power, half power and a quarter power) on shoot formation of *polianthes tuberosa* lateral bud was studied. The experiment was conducted in the basis of completely randomized design with three replications. The lateral bud explants were cultured on MS media which were supplemented with different plant growth regulators; KIN (0.25, 0.5, 1.0, 2.0 and 4.0 mg / l), BAP (0.25, 0.5, 1.0 and 2.0 mg / l) and the shoots length were evaluated.The results of this study was showed that the Maximum length of lateral bud shoots with an average of 3.75 centimeters were obtained on MS medium which were supplemented with 0.25 mg / l KIN along with 0.25 mg / l BAP after 8 weeks and the minimum length of shoots (Without regeneration of shoots) was obtained on MS medium and a quarter power which were supplemented with 4.0 mg / l KIN and MS media in three concentrations (all, half and a quarter) without plant growth regulators.

***Keywords*:** length of shoots, MS media, Tissue culture

IrHC2019