اثر محیط کشت و تنظیم کننده‌های رشد، بر باززایی شاخساره درخت شاه‌توت در شرایط درون‌شیشه‌ای

محمد فکور آریان[۱]، عباس یداللهی*[۲]، محمد تقی عبادی[۳]، ملیحه افتخاری[۴]
[۱*] دانشجوی کارشناسی ارشد علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس
[۲] دانشیار گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس
[۳] استادیار گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس
[۴] دانش آموخته دکتری علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس
*نویسنده مسئول: yadollah@modares.ac.ir

چکیده

به منظور شناسایی بهترین محیط کشت و تنظیم کننده‌های رشد در باززایی ریزنمونه‌های درخت شاه‌توت در شرایط کشت درون‌شیشه‌ای، آزمایشی به صورت فاکتوریل در قالب طرح پایه کاملا تصادفی با ۵ تکرار به اجرا درآمد.

ریزنمونه‌ها پس از ضدعفونی در سه محیط کشت مختلف (MS، WPM و Knop تغییر یافته) که حاوی چهار مقدار مختلف هورمون‌های بنزیل‌آدنین BA (۰، ۱، ۱/۵ و ۲ میلی‌گرم در لیتر) و همچنین ایندول‌بوتریک اسید IBA (۰، ۰/۱، ۰/۲ و ۰/۳ میلی‌گرم در لیتر) بودند کشت شدند. بعد از گذشت ۶ هفته، تعداد برگ، طول نوساقه، درصد استقرار، طول و عرض برگ در هر ریزنمونه اندازه‌گیری شد. نتایج نشان داد که اثر نوع محیط کشت بر طول نوساقه، درصد استقرار، طول برگ و عرض برگ در سطح احتمال ۵٪ معنی‌دار در حالی که بر صفت تعداد برگ غیرمعنی‌دار بود. براساس نتایج مقایسات میانگین، محیط کشت Knop دارای بیشترین طول نوساقه (۶/۲۱ میلیمتر)، درصد استقرار (۳۵/۳۵ درصد)، طول برگ (۴/۵۵ میلیمتر) و عرض برگ (۳/۰۳ میلیمتر) بود. تفاوت معنی‌داری بین محیط کشت‌های Knop، MS و WPM در رابطه با تعداد برگ وجود نداشت. افزایش غلظت BA در محیط کشت، تعداد برگ، طول نوساقه، درصد استقرار، طول و عرض برگ را به طور چشمگیری تحت تاثیر قرار داد. به طوری که در غلظت mg/l^{-1} ۲ هورمون BA به‌علاوه $0\ mg/l^{-1}$ هورمون IBA، بیشترین تعداد برگ (۱/۶۸)، بیشترین طول نوساقه (۱۰/۰۶ میلیمتر)، بیشترین درصد استقرار (۷۶/۰۹ درصد)، بیشترین طول برگ (۹/۷۵ میلیمتر) و بیشترین عرض برگ (۶/۵۴ میلیمتر) مشاهده شد.

کلمات کلیدی: ایندول بوتریک اسید، بنزیل آدنین، کشت بافت گیاهی، محیط کشت

مقدمه

درخت شاه‌توت با نام علمی *Morus nigra* L. از جنس *Morus* و متعلق به خانواده Moraceae است. این درخت بومی کشور ایران است اما به طور گسترده در جنوب اروپا، جنوب‌غربی آسیا و کشورهای حوزه مدیترانه یافت می‌شود.

امروزه این درخت برای مصارف صنعتی، زینتی و دارویی کشت می‌شود (Durcovik *et al.*, 2009). معمولا توت را با روش قلمه‌زدن تکثیر می‌کنند، که در این روش قلمه‌ها را از درختان بالغ و از شاخه‌های یک‌ساله یا دوساله تهیه می‌کنند و بعد از ریشه‌دار کردن به زمین اصلی انتقال می‌دهند، تکثیر از طریق قلمه، دارای معایبی از جمله: زمان بر، پرهزینه، تولید کم گیاهان و انتقال بیماری‌های قارچی و ویروسی، میزان بقاء و تولید ریشه‌های کم و طولانی شدن زمان تکثیر می‌باشد (Narayan *et al.*, 1989، Yadollahi *et al.*,2015). با توجه به این که تولید نهال پیوندی در شاه‌توت، دو سال زمان می‌برد، تکثیر این گیاه از طریق کشت بافت در کوتاه‌ترین زمان می تواند انجام شود (Bajaj.,1986). در ریزازدیادی گونه‌ای از توت (*M.latifolia*) بهترین رشد ریزنمونه‌ها در محیط کشت MS با ۱ میلی‌گرم در لیتر هورمون

IrHC2019

بنزیل‌آدنین (BA) و ۲ درصد گلوکز بدست آمد (Lu., 2002). با وجود مطالعات فراوان که در کشت بافت جنس *Morus*انجام شده است، تعداد بسیار کمی از گزارش‌ها مربوط به ریزازدیادی گونه شاه‌توت وجود دارد بنابراین توسعه و بهینه‌سازی دستورالعمل‌های کشت بافت برای این گونه بسیار حائز اهمیت خواهد بود (Durcovic *et al*.,2012).

مواد و روش‌ها

این پژوهش به صورت آزمایش فاکتوریل در قالب طرح پایه کاملا تصادفی با ۵ تکرار در گروه علوم باغبانی دانشگاه تربیت مدرس به اجرا درآمد. از نهال‌های سه‌ساله شاه‌توت جهت تامین ریزنمونه استفاده شد. جهت گندزدایی، ابتدا ریزنمونه‌ها زیر آب روان به مدت ۴۰ دقیقه به همراه چند قطره دترجنت شستشو داده شدند سپس در محلول قارچ‌کش بنومیل ۲ در هزار به مدت ۳۰ دقیقه به صورت غوطه‌ور قرار گرفتند؛ سپس در زیر هود لامینار ریزنمونه‌ها به مدت ۴۵ ثانیه در اتانول ۷۰ درصد غوطه‌ور شدند سپس با آب مقطر دوبار اتوکلاو شده سه دفعه شتشو داده شدند در ادامه در محلول هیپوکلریت سدیم ۱/۵ درصدد قرارگرفته و با گذشت ۱۴ دقیقه با آب مقطر دوبار اتوکلاو شده مجددا سه دفعه شستشو داده شدند. در این پژوهش از سه نوع محیط کشت مختلف (MS، WPM و Knop تغییر یافته) که حاوی چهار غلظت مختلف هورمون‌های بنزیل آدنین BA (۰، ۱، ۱/۵و ۲ میلی‌گرم در لیتر) به علاوه IBA (۰، ۰/۱، ۰/۲ و ۰/۳ میلی‌گرم در لیتر) بود، استفاده شد. محیط کشت تغییر یافته Knop که حاوی عناصر ماکرو Knop و عناصر میکرو MS بود . pH محیط کشت ۵/۸ و محیط کشت در دمای ۱۲۱ درجه سانتیگراد به مدت ۱۸ دقیقه اتوکلاو شد. شرایط اتاق رشد شامل ۱۶ ساعت روشنایی با دمای ۲۵ درجه سانتیگراد و ۸ ساعت تاریکی با دمای ۲۳ درجه سانتیگراد همراه بود.

صفت‌های تعداد برگ، طول نوساقه، درصد استقرار، طول برگ و عرض برگ، بعد از گذشت ۶ هفته اندازه‌گیری شد.

نتایج و بحث

براساس نتایج تجزیه واریانس داده‌ها مشخص گردید که اثر نوع محیط کشت بر طول نوساقه، درصد استقرار طول و عرض برگ در سطح احتمال ۵٪ معنی‌دار و در مورد صفت تعداد برگ غیرمعنی‌دار بود. همچنین غلظت‌های مختلف تنظیم کننده‌های رشد BA و IBA بر صفات تعداد برگ، طول نوساقه، درصد استقرار، طول و عرض برگ در سطح احتمال ۵٪ معنی‌دار بود. اثر متقابل تنظیم کننده‌های رشد با محیط کشت در صفت طول نوساقه در سطح احتمال ۵٪ معنی‌دار و در صفت درصد استقرار در سطح احتمال ۱٪ معنی‌دار بود ولی در صفات تعداد برگ، طول برگ و عرض برگ غیر معنی‌دار بود « جدول۱». نتایج مقایسات میانگین نشان داد که محیط کشت Knop تغییر یافته، دارای بیشترین مقدار در مورد صفات طول نوساقه، درصد استقرار، طول و عرض برگ نسبت به محیط کشت MS و WPM بود. از لحاظ طول نوساقه، درصد استقرار، طول و عرض‌برگ بین محیط کشت‌های MS و WPM تفاوت معنی‌داری وجود نداشت « نمودار۱». بیشترین تعداد برگ در غلظت mg/l^{-1} ۲ هورمون BA به‌علاوه mg/l^{-1} 0 هورمون IBA مشاهده شد و کمترین تعداد برگ نیز در غلظت‌های mg/l^{-1} ۱ هورمون BA به‌علاوه mg/l^{-1} ۰/۲ هورمون IBA وجود داشت « نمودار۲». بیشترین طول نوساقه در غلظت‌های mg/l^{-1} ۲ هورمون BA به‌علاوه mg/l^{-1} 0 هورمون IBA مشاهده شد و کمترین طول نوساقه در غلظت‌های mg/l^{-1} 0 هورمون BA به همراه mg/l^{-1} ۰/۲در لیتر IBA مشاهده شد « نمودار ۲». بیشترین درصد استقرار در غلظت‌های mg/l^{-1} ۲ هورمون BA به همراه mg/l^{-1} 0 هورمون IBA مشاهده شد و کمترین درصد استقرار در غلظت‌های mg/l^{-1} 0 هورمون BA به همراه ۰، ۰/۱، ۰/۲ و ۰/۳ میلی‌گرم در لیتر هورمون IBA وجود داشت « نمودار ۲». بیشترین طول برگ در غلظت‌های mg/l^{-1}۲ هورمون BA به علاوه mg/l^{-1} 0 هورمون IBA مشاهده شد و کمترین طول برگ در غلظت‌های mg/l^{-1} ۱ هورمون BA و mg/l^{-1} ۰/۲ هورمون IBA مشاهده شد« نمودار ۲». بیشترین عرض برگ در غلظت mg/l^{-1}۲ هورمون BA به علاوه mg/l^{-1} 0 هورمون IBA مشاهده که با غلظت‌های mg/l^{-1} ۱/۵ هورمون BA به همراه

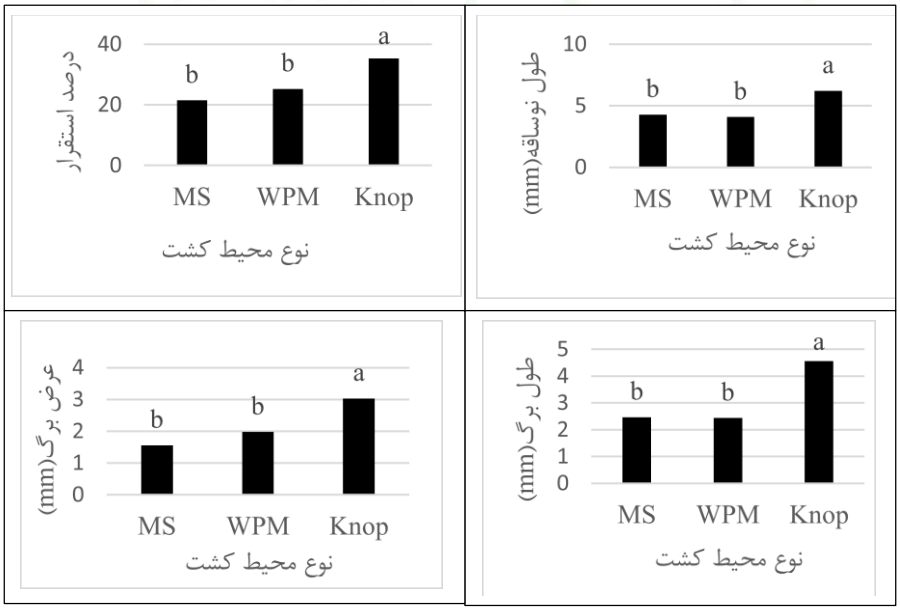
IrHC2019

mg/l^{-1} 0 هورمون IBA و mg/l^{-1} ۱/۵ هورمون BA به همراه ۱ mg/l هورمون IBA اختلاف معنی‌داری نداشت و کمترین عرض برگ نیز در غلظت‌های mg/l^{-1} ۱ هورمون BA به همراه mg/l^{-} ۰/۲ هورمون IBA مشاهده شد « نمودار ۲».

جدول ۱- جدول تجزیه واریانس اثر نوع محیط کشت، BA و IBA بر روی صفات تعداد برگ، طول نوساقه، درصد استقرار، طول برگ، عرض برگ در مرحله استقرار

		میانگین مربعات				
منبع تغییرات	df	تعداد برگ	طول نوساقه(mm)	درصد استقرار	طول برگ(mm)	عرض برگ (mm)
محیط کشت (A)	۲	۱/۰۳۳$^{n.s}$	۱۱۲/۶۰۲*	۴۴۴۳/۶۹۵*	۱۲۳/۲۷۵*	۴۹/۶۳۰*
(B) IBA+BA	۱۵	۳/۴۲۲*	۱۰۷/۱۷۹*	۷۱۹۹/۷۷۵*	۱۳۷/۷۷۰*	۶۵/۵۶۴*
A×B	۳۰	۰/۵۴۹$^{n.s}$	۱۷/۴۵۸*	۵۶۹/۸۳۰**	۲۰/۰۰۳$^{n.s}$	۹/۵۰۸$^{n.s}$
خطا	۱۹۲	۰/۵۹۸	۹/۴۸۶	۳۷۴/۴۳۲	۱۸/۷۱۷	۹/۱۱۵

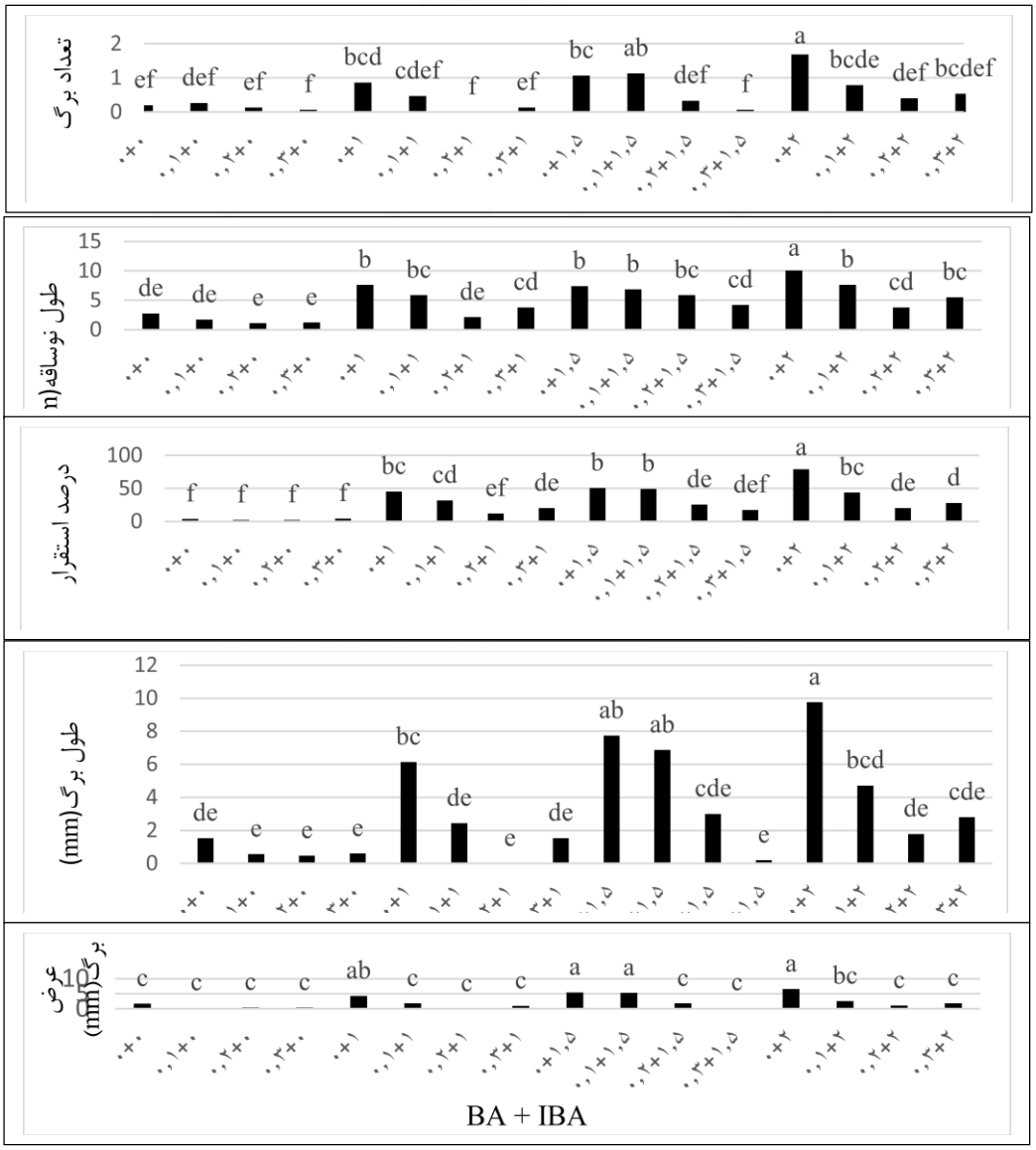
*، ** و ns به ترتیب نشان دهنده‌ی معنی‌دار بودن در سطح احتمال ۵٪، ۱٪ و غیر معنی‌دار بودن است.



نمودار۱- اثر نوع محیط کشت‌های مختلف بر طول نوساقه، درصد استقرار، طول و عرض برگ

IrHC2019

افزایش غلظت هورمون BA در محیط کشت، صفاتی از قبیل تعداد برگ، طول نوساقه، درصد استقرار، طول و عرض برگ را به طور چشمگیری تحت تاثیر قرار داد. در غلظت ۲mg/l^{-1} هورمون BA به‌علاوه 0 mg/l^{-1} هورمون IBA بیشترین مقادیر در صفاتی از قبیل تعداد برگ(۱/۶۸)، طول نوساقه(۱۰/۰۶ میلیمتر)، درصد استقرار(۷۶/۰۹ درصد)، طول برگ(۹/۷۵ میلیمتر) و عرض برگ(۶/۵۴ میلیمتر) مشاهده شد (نمودار ۲). Narayan و همکاران (۱۹۸۹) گزارش نمودند که محیط کشت پایه برای ریزازدیادی جنس *Morus* محیط کشت MS می‌باشد. ولی نتایج ما در تحقیق حاضر نشان داد که بهترین محیط کشت در مرحله استقرار، محیط کشت تغییر یافته Knop است. در تحقیقی بهترین باززایی شاخه در توت سیاه با استفاده از محیط کشت تغییر یافته Knop که حاوی عناصر ماکرو Knop و عناصر میکرو MS به همراه mg/l^{-1} ۰/۵ هورمون BA بود به دست آمد (Ivanika,196) که با نتایج پژوهش حال حاضر در مورد بهترین درصد استقرار، تعداد برگ، طول نوساقه، طول و عرض برگ در محیط کشت تغییر یافته Knop که حاوی عناصر ماکرو Knop و عناصر میکرو MS، مطابقت داشت ولی نتیجه مطلوب در مورد غلظت هورمون BA در ۲mg/l^{-1} به‌علاوه 0 mg/l^{-1} هورمون IBA حاصل گردید.



نمودار ۲- اثر غلظت‌های مختلف هورمون BA+IBA برحسب mg/l^{-1} بر تعداد برگ، طول نوساقه، درصد استقرار، طول و عرض برگ

IrHC2019

منابع

Bajaj, P.S. 1986. Biotechnology in Agriculture and Forestry vol.l pp. 384-392, Springer Verlag.

Ďurkovič, J., Čaňová, I. and Pichler, V. 2009. Water loss and chlorophyll fluorescence during ex vitro acclimatization in micropropagated black mulberry (*Morus nigra* L.). Prop Ornam Plants, 9, 107-112.

Durkovi, J., Kanuchova, A., Kacik, F., Solar, R. and Lengyelova, A. 2012. Genotype- and age-dependent patterns of lignin and cellulose in regenerants derived from 80-year-old trees of black mulberry (*Morus nigra* L.). Plant Cell Tiss Organ Cult, 108:359–370

Ivanička, J., 1987. In vitro micropropagation of mulberry, *Morus nigra* L. Scientia horticulturae, 32(1-2), 33-39.

Lu, M. C. 2002. Micropropagation of *Morus latifolia* Poilet using axillary buds from mature trees. Scientia Horticulturae, 96(1-4), 329-341.

Narayan, P., Chakraborty, S. and Subba Rao, G., 1989. Regulation of plantlets from the callus of stem segment of mature plant of *Morus alba* L. Proc. Indian National Science Academy. 55, 469–472.

Yadollahi, A., Omidi, M. and Eftekhari, M. 2015. Effect of nutrient medium and concentrations of plant growth regulators on micropropagation of *Rosa damascena* Mill. cv.'Kashan'. In 6th International Symposium on Production and Establishment of Micropropagated Plants. Sanremo, Italy (pp. 19-24).

Effect of culture media and growth regulators on the regeneration of black mulberry shoots under in vitro conditions

Mohammad Fakoor Aryan[1], Abbas Yadollahi[1*],Mohammad Taghi Ebadi[1],Maliheh Eftekhari[1]

[1*] Department of Horticultural Science, Faculty of Agriculture, Tarbiat Modares University (TMU), Tehran, Iran

[*]*Corresponding Author:* yadollah@modares.ac.ir

Abstract

In order to identify the best culture media and growth regulators in regeneration of Black mulberry tree explants under in vitro culture, a factorial experiment was conducted in a completely randomized design with 5 replications. After disinfection, the explants were in three different culture media (MS, WPM and modified Knop) which contains four different amounts of BA (0, 1, 1.5 and 2 mg/l) hormones as well as benzyl adenine IBA (0, 0.1, 0.2 and 0.3 mg/l) were inoculated. After 6 weeks, the number of leaves, the length of the shoots, and the percentage of establishment in each explant were recorded. The results showed that the effect of the culture medium on the length of shoots, percentage of establishment, leaf length and leaf width was significant ($p < 5\%$). Based on the results of mean comparisons, Knop medium caused the highest shoot length (6.21 mm), percentage of establishment (35.35%), leaf length (5.5 mm) and leaf width (03.03 mm). There was no significant difference between the culture media of Knop, MS and WPM in relation to leaf number. Increasing of BA concentration in culture medium significantly affected leaves number, percentage of establishment, leaf length and width. Thus, in the concentration of 2 mg/l BA hormone plus 0 mg/l IBA, the highest number of leaves (1.68) the maximum length of the shoot (10.06 mm), the highest percentage of establishment (76.09%), the highest leaf length (9.75 mm) and leaf width (6.54mm) were recorded.

***Keywords*:** Benzyl Adenine, culture media, Indole-3-butyric acid, Tissue culture

IrHC2019