

## پینه‌زایی و باززایی درون شیشه‌ای دو رقم تجاری چاوی چندساله

سمیه اسماعیلی خویگانی\*<sup>۱</sup>، حسن صالحی<sup>۲</sup>، مرتضی خوشخوی<sup>۳</sup>

<sup>۱</sup> دانشجوی دکتری بخش علوم باغبانی، دانشگاه شیراز، شیراز

<sup>۲</sup> <sup>۳</sup> استاد بخش علوم باغبانی دانشگاه شیراز، شیراز

\*نویسنده مسئول: [s.esmaeili@shirazu.ac.ir](mailto:s.esmaeili@shirazu.ac.ir)

### چکیده

در این بررسی روشی کارا جهت دستیابی به میزان بالایی از انگیزش پینه و باززایی از ریزنمونه‌های بذرهای بالغ دو رقم 'Numan' *Lolium perenne* و 'Grassland' *Lolium perenne* ارائه شد. بذرهای بدون پوشش خارجی به صورت دست‌نخورده و با برش عمودی روی محیط موراشیگی و اسکوگ (MS) حاوی غلظت‌های مختلف توفور دی (2, 4-D)، ۴، ۵، ۶، ۷، ۸، ۹ و ۱۰ میلی‌گرم در لیتر به تنهایی و در ترکیب با ۰/۰۲ میلی‌گرم در لیتر بنزیل آدنین (BA) برای انگیزش پینه‌زایی قرار گرفتند. بالاترین درصد پینه‌زایی بذرهای سالم و برش داده شده رقم 'Grassland' در محیط MS حاوی ۶ میلی‌گرم در لیتر 2, 4-D در ترکیب با ۰/۰۲ میلی‌گرم در لیتر بنزیل آدنین و ۵ میلی‌گرم در لیتر 2, 4-D به ترتیب ۷۱ درصد و ۸۷ درصد به دست آمد. گرچه برای رقم 'Numan' بهترین محیط پینه‌زایی در محیط حاوی ۵ میلی‌گرم در لیتر 2, 4-D (۵۵ درصد) و ۴ میلی‌گرم در لیتر 2, 4-D در ترکیب با ۰/۰۲ میلی‌گرم در لیتر بنزیل آدنین (۷۲ درصد) به ترتیب دست آمد. بهترین محیط باززایی برای هر دو رقم در محیط MS حاوی ۱۰ گرم در لیتر مالتوز و ۲ میلی‌گرم در لیتر آبسزیک اسید (ABA) بود. گیاهان دارای ریشه گسترش یافته به گلدان‌های حاوی مخلوط کوکوپیت و پرلایت منتقل شدند و در شرایط گلخانه به خوبی سازگار شدند. ۴ هفته پس از انتقال گیاهان سازگار شده ۱۰۰ درصد زنده‌مانی، سبز و سالم باقی ماندند.

کلمات کلیدی: آبسزیک اسید، باززایی، چاوی چندساله و مالتوز.

### مقدمه

چاوی چندساله یکی از مهم‌ترین گونه‌های باریک برگ در مناطق معتدله می‌باشد. این گونه به‌عنوان گیاه علوفه‌ای با کیفیت بالا در مرتع‌ها و به‌عنوان چمن در مکان‌های تفریحی و زمین‌های گلف به کار می‌رود. کشت بافت و باززایی چاوی چندساله از ریزنمونه‌های بساک پایه برگ مریستم انتهایی شاخساره بذر بالغ (Bradley et al., 2001) رویان‌های بالغ و نابالغ (Dale, 1980) گل‌آذین نابالغ (Can et al., 2016) گزارش شده است. اساس این تحقیق به هدف بهینه کردن کشت بافت دو رقم تجاری چاوی چندساله جهت پیشبرد و بهبود انتقال ژن متحمل به خشکی (*ipt*) در چاوی چندساله که هدف اصلی در مراحل بعدی پژوهش می‌باشد مورد ارزیابی قرار گرفت.

### مواد و روش‌ها

بذرهای دو رقم تجاری چاوی چندساله 'Numan' *Lolium perenne* و *Lolium perenne* L. 'Grassland' از مراکز فروش تجاری بذر چمن تهیه گردید. بذرهای دو رقم با اسید سولفوریک ۵۰٪ به مدت ۱۵ دقیقه در حالت شیک تیمار شدند و برای از بین بردن بقایای اسید یک شبانه‌روز زیر آب جاری قرار گرفتند. بذرهای بدون پوشش خارجی با اتانول ۷۰ درصد به مدت ۱ دقیقه تیمار شدند و بی‌درنگ در محلول هیپوکلرید سدیم با کلر خالص ۵/۵ درصد به مدت ۲۰ دقیقه قرار گرفتند. بذرهای ۶-۸ بار با آب مقطر استریل به مدت ۲۰ دقیقه شستشو شدند.

جهت تعیین بهترین محیط پینه‌زایی بذرهای هر رقم به صورت دست‌نخورده<sup>۱</sup> و با برش طولی<sup>۲</sup> در محیط MS حاوی سوکروز ۳ درصد، غلظت‌های مختلف ۴، ۵، ۶، ۷، ۸، ۹ و ۱۰ میلی‌گرم در لیتر 2, 4-D به تنهایی و در ترکیب با ۰/۰۲ میلی‌گرم در لیتر بنزیل آدنین و آگار ۸ گرم در لیتر با pH ۵/۸ قرار گرفتند. پس از ۴ هفته پینه‌ها مجدداً در همان محیط قبلی کشت شدند. پینه‌های رویان جهت تعیین بهترین تیمار باززایی در غلظت‌های مختلف ۰، ۱/۳، ۲ و ۲/۳ میلی‌گرم در لیتر ABA در ترکیب با غلظت‌های ۰، ۱۰، ۱۵ و ۲۰ گرم در لیتر مالتوز قرار گرفتند. گیاهان باززایی شده در مخلوط گلدانی نسبت ۱:۱ کوکوپیت و پرلایت منتقل شدند و در شرایط کنترل شده با ۱۶/۸ ساعت روشنایی/تاریکی در دمای ۲۴±۲ درجه سلسیوس قرار گرفتند. گیاهان سپس به گلخانه منتقل شدند. این آزمایش به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۳ و ۴ تکرار انجام شد. مقایسه میانگین‌ها با آزمون LSD در سطح ۵٪ با نرم‌افزار SAS9.1 تجزیه و تحلیل شد.

### نتایج و بحث

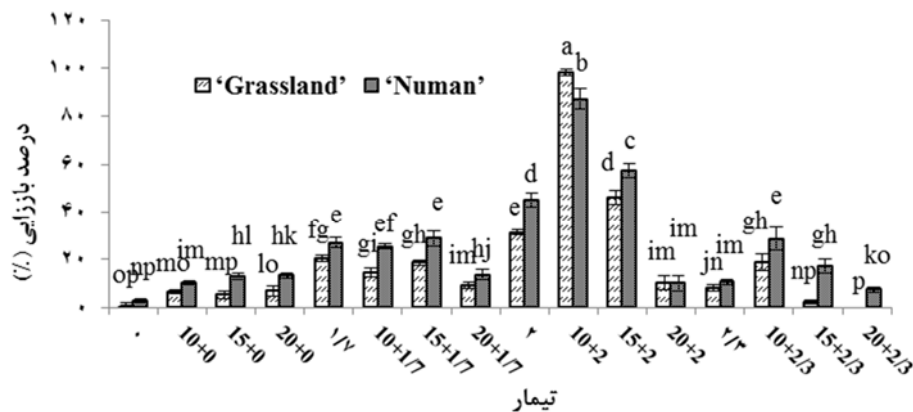
به‌طور کلی نتایج نشان داد درصد پینه‌زایی در بذرهای با برش طولی در هر دو رقم بالاتر از بذرهای دست‌نخورده می‌باشد. بالاترین میزان پینه‌زایی در رقم 'Grassland' در ریزنمونه‌های بذر با برش طولی در تیمار ۵ میلی‌گرم در لیتر 2, 4-D دیده شد. در حالی که در ریزنمونه‌های بذرهای بدون برش میزان پینه‌زایی در غلظت‌های بالاتر (۶ میلی‌گرم در لیتر 2, 4-D) به دست آمد. در رقم 'Numan' بیشترین میزان پینه‌زایی در غلظت ۵ میلی‌گرم در لیتر 2, 4-D در بذرهای بدون برش (۵۵ درصد) و در غلظت ۴ میلی‌گرم در لیتر 2, 4-D و ۰/۰۲ میلی‌گرم در لیتر BA (۷۲ درصد) دیده شد (جدول ۱).

جدول ۱- برهمکنش غلظت‌های مختلف 2,4-D و BA بر پینه‌زایی بذرهای سالم و برش طولی دو رقم تجاری چای چندساله

| 2,4-D (mg L <sup>-1</sup> ) | BA (mg L <sup>-1</sup> ) | 'Grassland'           |                       | 'Numan'               |                       |
|-----------------------------|--------------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|
|                             |                          | intact seeds          | sliced seeds          | intact seeds          | sliced seeds          |
| ۴                           | ۰                        | ۴۹ <sup>de</sup> ±۳/۹ | ۶۹ <sup>bc</sup> ±۶/۰ | ۴۹ <sup>de</sup> ±۲/۴ | ۵۴ <sup>d</sup> ±۳/۵  |
|                             | ۰/۰۲                     | ۶۱ <sup>c</sup> ±۶/۲  | ۷۸ <sup>a</sup> ±۶/۱  | ۳۶ <sup>f</sup> ±۱/۸  | ۷۲ <sup>b</sup> ±۱/۹  |
| ۵                           | ۰                        | ۶۱ <sup>c</sup> ±۲/۷  | ۸۴ <sup>a</sup> ±۳/۲  | ۴۶ <sup>de</sup> ±۱/۹ | ۶۱ <sup>c</sup> ±۳/۸  |
|                             | ۰/۰۲                     | ۵۹ <sup>c</sup> ±۵/۲  | ۷۳ <sup>ab</sup> ±۲/۰ | ۵۵ <sup>d</sup> ±۱/۸  | ۴۱ <sup>e</sup> ±۲/۹  |
| ۶                           | ۰                        | ۵۱ <sup>de</sup> ±۳/۴ | ۷۷ <sup>a</sup> ±۳/۸  | ۳۰ <sup>e</sup> ±۲/۹  | ۶۳ <sup>c</sup> ±۳/۶  |
|                             | ۰/۰۲                     | ۶۳ <sup>c</sup> ±۵/۴  | ۷۱ <sup>b</sup> ±۲/۳  | ۵۳ <sup>d</sup> ±۶/۷  | ۵۴ <sup>d</sup> ±۴/۷  |
| ۷                           | ۰                        | ۷۱ <sup>ab</sup> ±۰/۶ | ۶۰ <sup>c</sup> ±۴/۸  | ۴۱ <sup>e</sup> ±۳/۲  | ۵۸ <sup>cd</sup> ±۱/۷ |
|                             | ۰/۰۲                     | ۵۵ <sup>d</sup> ±۲/۵  | ۷۵ <sup>ab</sup> ±۵/۵ | ۵۳ <sup>d</sup> ±۲/۷  | ۶۵ <sup>b</sup> ±۴/۹  |
| ۸                           | ۰                        | ۵۳ <sup>d</sup> ±۱/۱  | ۷۳ <sup>ab</sup> ±۶/۳ | ۵۴ <sup>d</sup> ±۱/۲  | ۶۷ <sup>b</sup> ±۳/۵  |
|                             | ۰/۰۲                     | ۴۶ <sup>e</sup> ±۵/۰  | ۶۹ <sup>bc</sup> ±۳/۴ | ۴۵ <sup>e</sup> ±۶/۶  | ۵۳ <sup>d</sup> ±۱/۷  |
| ۹                           | ۰                        | ۴۶ <sup>e</sup> ±۵/۰  | ۵۳ <sup>d</sup> ±۶/۴  | ۳۵ <sup>f</sup> ±۱/۶  | ۳۸ <sup>f</sup> ±۱/۹  |
|                             | ۰/۰۲                     | ۳۸ <sup>f</sup> ±۶/۶  | ۵۷ <sup>c</sup> ±۲/۵  | ۲۹ <sup>e</sup> ±۲/۴  | ۵۳ <sup>de</sup> ±۱/۹ |
| ۱۰                          | ۰                        | ۴۳ <sup>e</sup> ±۷/۹  | ۵۴ <sup>de</sup> ±۴/۱ | ۳۸ <sup>f</sup> ±۲/۸  | ۴۱ <sup>e</sup> ±۳/۲  |
|                             | ۰/۰۲                     | ۵۴ <sup>d</sup> ±۷/۴  | ۵۶ <sup>d</sup> ±۴/۱  | ۳۴ <sup>f</sup> ±۴/۹  | ۵۴ <sup>d</sup> ±۲/۵  |

عددها به صورت میانگین ± خطای استاندارد می‌باشند. حروف مشترک تفاوت معنی‌داری در سطح ۵ درصد نشان نمی‌دهند.

1 Intact seed  
2. Sliced longitudinally



شکل ۱- درصد باززایی دو رقم چاوی چندساله در غلظت‌های ترکیبی ABA (۰، ۱/۷، ۲ و ۲/۳ میلی‌گرم در لیتر) و مالتوز (۰، ۱۰، ۱۵ و ۲۰ گرم در لیتر).

دلیل احتمالی افزایش پینه‌زایی در ریز نمونه‌های با برش طولی در هر دو رقم افزایش سطح تماس ریزنمونه با محیط کشت می‌باشد. در مطالعه مشابهی Liu و همکاران (۲۰۰۶) از هورمون 2, 4-D برای پینه‌زایی در چاوی چندساله استفاده کردند. آن‌ها بیشترین میزان پینه‌زایی با کیفیت عالی را در محیط MS حاوی ۵ میلی‌گرم در لیتر 2, 4-D و ۰/۰۵ میلی‌گرم در لیتر BAP بدست آوردند. بالاترین میزان باززایی در هر دو رقم در محیط MS حاوی ۳ درصد سوکروز، ۱۰ گرم در لیتر مالتوز و ۲ میلی‌گرم در لیتر ABA دیده شد (شکل ۱).

#### منابع

- Bradley, D.E., Bruneau, A.H., and Qu, R. 2001. Effects of cultivar, explant treatment, and medium supplements on callus induction and plantlet regeneration in perennial ryegrass. *International Turfgrass Society Research Journal*, 9: 152-156.
- Can, E., Celiktas, N., Hatipoglu, R., Yilmaz, S., and Avci, S. 2004. Effects of genotype and concentrations of dicamba on callus induction and plant regeneration from young inflorescences of perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.). *Biotechnology and Biotechnological Equipment*, 18: 52-57.
- Dale, P.J., and Dalton, S.J. 1983. Immature inflorescence culture in *Lolium*, *Festuca*, *Phleum* and *Dactylis*. *Zeitschrift für Pflanzenphysiologie*, 111: 39-45.
- Liu, P., Zhang, Z.X., Yuan, J.G., Xi, J.B., Du X.L., and Yang, Z.Y. 2006. Callus induction and plant regeneration in eleven perennial ryegrass cultivars. *Biotechnology Biotechnol. Equip.* 20: 30-37.

## Callus Induction and *In Vitro* Regeneration of Two Commercial Cultivars of Perennial Ryegrass

Somayeh Esmaeili Khuygani\*<sup>1</sup>, Hassan Salehi<sup>2</sup> and Morteza Khosh-Khui<sup>3</sup>

\*<sup>1</sup> PhD student, Department of Horticultural Sciences, Faculty of Agriculture, Shiraz University, Shiraz  
<sup>2,3</sup> Academic members, Department of Horticultural Sciences, Faculty of Agriculture, Shiraz University, Shiraz

\*Corresponding author: [s.esmaeili@shirazu.ac.ir](mailto:s.esmaeili@shirazu.ac.ir)

### Abstract

In the present study, an efficient protocol was developed for attaining high frequency callus induction and *in vitro* plant regeneration from the mature seed explants of *Lolium perenne* L. 'Numan' and *L. perenne* 'Grassland'. Dehusked seeds were cultured both intact and sliced longitudinally on Murashige and Skoog (MS) media supplemented with 4, 5, 6, 7, 8, 9 and 10 mg L<sup>-1</sup> 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) alone, and in combination with 0.02 mg L<sup>-1</sup> Benzyladenine (BA). The highest percentage of callus induction obtained from intact and sliced seeds were 71% and 87% for *L. perenne* 'Grassland' on MS basal medium supplemented with 6 mg L<sup>-1</sup> and 5 mg L<sup>-1</sup> 2,4-D. Although, for *Lolium perenne* L. 'Numan', the best callus induction was achieved as 55% and 72% with 4 mg L<sup>-1</sup> 2,4-D, and 4 mg L<sup>-1</sup> 2,4-D in combination with 0.02 mg L<sup>-1</sup> BA, respectively. The best regeneration medium in both cultivars was MS medium containing 10 g L<sup>-1</sup> maltose and 2 mg L<sup>-1</sup> Abscisic acid (ABA). Plants with well-developed roots were transferred to pots containing a cocopeat and perlite mix and acclimatized in greenhouse conditions. Four weeks after transferring, acclimatized plants showed 100% survival and remained healthy and green.

Key words: Abscisic acid (ABA), Regeneration, Maltose, *Lolium perenne* L. 'Numan'.

