بررسی اثرهای سوکروز و تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی بر پداژک‌زایی مستقیم از ریزنمونه‌های نوچه فریزیا (Freesia hybrida Bailey 'Argenta'×) در شرایط درون شیشه‌ای

علی پورخالوئی [1*]، مرتضی خوشخوی [2]
1و 2- به ترتیب دانشجو و استاد بخش علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شیراز.

نویسنده مسئول: علی پورخالوئی alipourkhaloee@yahoo.com

چکیده

این پژوهش در قالب دو آزمایش فاکتوریل جداگانه انجام گرفت. در آزمایش اول، نوچه‌های (Pupae) کامل روی محیط کشت موراشیگی و اسکوگ (MS) حاوی غلظت‌های مختلف از تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی و سوکروز کشت شدند. نتایج نشان داد که بالاترین میانگین شمار پداژک (Cormlet) (6/67) با تیمار 60 گرم در لیتر سوکروز، 6 میلی‌گرم در لیتر نفتالن استیک اسید (NAA) و 1 میلی‌گرم در لیتر 6-بنزیل آمینو پیورین (BAP)، به دست آمد. پس از زیرکشت، بیشترین میانگین قطر پداژک (13/67 میلی‌متر) روی محیط کشت حاوی 60 گرم در لیتر سوکروز، 2 میلی‌گرم در لیتر NAA و 0/5 تا 1 میلی‌گرم در لیتر کاینتین (Kin) به دست آمد. در آزمایش دیگری، باززایی پداژک‌ها در بن شاخه‌های پرآوری شده از نوچه‌های کامل روی محیط کشت MS بررسی شد. نتایج نشان داد که بالاترین میانگین شمار شاخه به میزان 5/67 شاخه با تیمار 4 میلی‌گرم در لیتر BAP و 2 میلی‌گرم در لیتر Kin به دست آمد. در مرحله بعد، بیشترین میانگین شمار پداژک (3/67) در بن این شاخه‌ها و روی محیط کشت حاوی 3 میلی‌گرم در لیتر BAP و 0/5 میلی‌گرم در لیتر NAA تشکیل شد. ریشه‌زایی پداژک‌های تولید شده نشان داد که بالاترین درصد ریشه‌زایی (77/80%) روی محیط کشت MS تکمیل شده با 1 میلی‌گرم در لیتر ایندول-3-بوتیریک اسید (IBA) به دست آمد.

واژه‌های کلیدی: پداژک‌زایی مستقیم، کشت بافت، نوچه.

مقدمه

فریزیا یکی از گل‌های بریدنی قابل توجه در دنیاست که در سطح تجاری با روش ریزافزایی تولید می‌شود.

در یک پژوهش، گیاهچه‌های پرآوری شده از مریستم انتهایی پداژه فریزیا روی محیط کشت MS حاوی 2 میلی‌گرم در لیتر BAP و 0/01 میلی‌گرم در لیتر NAA، برای تشکیل پداژک، به محیط کشت MS تکمیل شده با 2 میلی‌گرم در لیتر BAP و 0/1 میلی‌گرم در لیتر NAA منتقل شدند (Zhao، 1989). در پژوهشی مشابه، پداژه‌های دختری زعفران روی پداژه‌های مادری کشت نشده در دمای 1 تا 3 درجه سلسیوس به مدت 9 ماه تشکیل شدند و سپس روی محیط کشت حاوی 5 میلی‌گرم در لیتر BAP یا 1 میلی‌گرم در لیتر تیدیازورون (TDZ) و 0/5 میلی‌گرم در لیتر NAA جوانه زدند. حدود 90% شاخه‌های حاصل از این جوانه‌ها، پداژه تولید کردند (Renau-Morata و همکارن، 2013). افزون بر این، برای باززایی درون شیشه‌ای پداژک از شاخه‌های فریزیا، Zhao (1989) نشان داد که غلظت 60 گرم در لیتر سوکروز برای انگیزش پداژک و نمو آن لازم بود. شرف‌زاده و خوشخوی (1383)، برای تولید پداژک زعفران، قطعه‌های پداژه را روی محیط کشت MS حاوی 50 گرم در لیتر سوکروز کشت نمودند.

مواد و روش‌ها

در آزمایش اول، نوچه‌های برش‌نخورده فریزیا (پداژک‌های نوپدید روی پداژه مادری پس از 40 تا 50 روز تیمار سرمایی 4 درجه سلسیوس) روی محیط کشت MS حاوی صفر، 2، 4 و 6 میلی‌گرم در لیتر NAA یا صفر، 1/5، 3 و 4/5 میلی‌گرم در لیتر توفوردی (2,4-D) به همراه صفر، 0/5، 1 و 1/5 میلی‌گرم در لیتر BAP کشت شدند. پداژک‌های تازه تشکیل شده، برای رشد بیشتر، روی محیط کشت MS با غلظت‌های مختلف از NAA (صفر، 1، 2 و 3 میلی‌گرم در لیتر)، Kin (صفر، 0/5 و 1 میلی‌گرم در لیتر) و سوکروز (30 و 60 میلی‌گرم در لیتر) زیرکشت شدند. در مرحله بعد، پداژک‌ها روی محیط کشتی با غلظت بالای سایتوکاینین نسبت به آکسین (4 میلی‌گرم در لیتر BAP و 1 میلی‌گرم در لیتر NAA) شاخساره تولید کردند و سپس ریشه‌دار شدند.

در آزمایش دوم، برهمکنش BAP (صفر، 2، 4 و 6 میلی‌گرم در لیتر) و Kin (صفر، 1، 2 میلی‌گرم در لیتر) در پرآوری شاخساره بررسی شد. سپس، برهمکنش NAA (صفر، 0/5 و 1 میلی‌گرم در لیتر) با BAP (صفر، 1، 3 و 5 میلی‌گرم در لیتر) بر شمار پداژک باززایی شده در بن شاخه‌ها روی محیط کشت MS حاوی 60 گرم در لیتر سوکروز بررسی شد.

آزمایش‌ها به صورت فاکتوریل و در قالب طرح پایه کاملا تصادفی با 3 تکرار (ظرف شیشه‌ای) و در هر تکرار با 3 ریزنمونه انجام گرفت. واکاوی آماری با استفاده از نرم افزار SPSS (Windows version 16) و مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای جدید دانکن در سطح 5% انجام شد.

نتایج و بحث

در آزمایش اول، بالاترین میانگین شمار پداژک (6/67) با تیمار 60 گرم در لیتر سوکروز، 6 میلی‌گرم در لیتر NAA و 1 میلی‌گرم در لیتر BAP به دست آمد (جدول 1 - نگاره 1). همچنین، تیمار 60 گرم در لیتر سوکروز با 3 میلی‌گرم در لیتر 2,4-D و 1 میلی‌گرم در لیتر BAP، بالاترین میانگین شمار پداژک (4/67) را داشت. پس از زیرکشت، بالاترین قطر پداژک (13/67 میلی‌متر) با کاربرد 60 گرم در لیتر سوکروز، 2 میلی‌گرم در لیتر NAA و 0/5 یا 1 میلی‌گرم در لیتر Kin به دست آمد (جدول 2).

نیاز به غلظت بالای آکسین برای تولید پداژک با نتایج Homes و همکاران (1987) که پرآوری درون شیشه‌ای زعفران را مورد مطالعه قرار دادند، همخوانی دارد. همچنین، مشخص شد که 2,4-D برای پداژک‌زایی چندان مناسب نبود که با یافته‌های Bach (1992) در کشت بافت فریزیا یکسان است. نامبرده بیان نمود که با استفاده از 2,4-D رشد بعدی ریزنمونه‌ها و باززایی از آن‌ها دچار مشکل می‌شود. کارایی کمتر 2,4-D نسبت به NAA را می‌توان با اثر قوی 2,4-D و حتی سمیت آن، در ارتباط دانست.

ازآنجایی که قند منبع انرژی است و زمانی که میزان آن افزایش می‌یابد، در اصل انرژی لازم برای تقسیم و رشد یاخته‌ها تامین می‌شود و اندام‌زایی بهتری شکل می‌گیرد، می‌توان نتیجه گرفت که افزایش غلظت سوکروز از 30 به 60 میلی‌گرم در لیتر، توانست منجر به تشکیل پداژک‌های بیشتر و قوی‌تر شود. در پژوهشی، Ojha و همکاران (2010) نیز گزارش نمودند که افزایش غلظت قندها به ویژه گلوکز و فروکتوز تا حد 60 گرم در لیتر باعث تولید بالاترین میزان پداژک (12 عدد) در کشت بافت گلایول شد.

جدول 1- اثر غلظت‌های مختلف سوکروز، NAA و BAP بر میانگین شمار پداژک تشکیل شده روی نوچه.

میانگین	میانگین	BAP (mg l^{-1})				Sucrose (g l^{-1}) + NAA (mg l^{-1})
		1/5	1	0/5	0	
0/95 B	0/00 D	0/00 h	0/00 h	0/00 h	0/00 h†	30 + 0
		0/00 h	0/00 h	0/00 h	0/00 h	30 + 2
	0/95 C	0/00 h	3/33 efg	2/67 g	0/00 h	30 + 4
		0/00 h	4/33 cd	5/00 bc	0/00 h	30 + 6
2/35 A	2/12 B	0/00 h	0/00 h	0/00 h	0/00 h	60 + 0
		0/00 h	4/00 de	3/67 def	0/00 h	60 + 2
	3/54 A	0/00 h	5/67 b	5/33 b	0/00 h	60 + 4
		4/33 cd	6/67 a	5/00 bc	3/00 fg	60 + 6
		0/54 B	3/00 A	2/70 A	0/37 B	میانگین

† میانگین‌هایی که با حروف یکسان مشخص شده‌اند (حروف کوچک در مقایسه تیمارها و حروف بزرگ در مقایسه میانگین‌ها)، در سطح 5% آزمون چند دامنه‌ای جدید دانکن تفاوت معنی‌داری با هم ندارند.

جدول 2- اثر غلظت‌های مختلف سوکروز NAA و Kin بر میانگین قطر پداژک‌های زیرکشت شده (میلی‌متر).

Sucrose (g l^{-1}) + NAA (mg l^{-1})	Kin (mg l^{-1})			میانگین	میانگین
	0	0/5	1		
30 + 0	7/00 ij†	7/67 ij	7/00 ij	7/66 C	9/27 B
30 + 1	7/00 ij	8/67 g-j	9/33 f-i		
30 + 2	10/00 e-h	11/00 c-f	10/67 d-g	9/77 B	
30 + 3	9/00 f-j	12/00 ae	12/00 a-e		
60 + 0	7/00 ij	8/33 hij	9/00 f-j	11/72 A	11/25 A
60 + 1	9/00 f-j	12/00 a-e	12/67 a-d		
60 + 2	11/33 b-e	13/67 a	13/67 a	11/88 A	
60 + 3	12/00 a-e	13/00 abc	13/33 ab		
میانگین	9/04 B	10/79 A	10/95 A		

† میانگین‌هایی که با حروف یکسان مشخص شده‌اند (حروف کوچک در مقایسه تیمارها و حروف بزرگ در مقایسه میانگین‌ها)، در سطح 5% آزمون چند دامنه‌ای جدید دانکن تفاوت معنی‌داری با هم ندارند.

با توجه به نتایج آزمایش دوم، بالاترین میانگین شمار شاخه به میزان 5/67 شاخه با تیمار 4 میلی‌گرم در لیتر BAP و 2 میلی-گرم در لیتر Kin به دست آمد. پس از زیرکشت شاخه‌ها، بالاترین میانگین شمار پداژک (3/67) روی محیط کشت حاوی 3 میلی-گرم در لیتر BAP و 0/5 میلی‌گرم در لیتر NAA در بن آن‌ها به دست آمد (جدول 3 - نگاره 2).

سایتوکاینین‌ها در خنثی نمودن چیرگی انتهایی نقش دارند و با کاهش اثر چیرگی انتهایی، میزان پرآوری شاخساره در نوک پداژه افزایش می‌یابد. در مطالعه ریزافزایی زعفران، Karaoglu و همکاران (2007) توانستند از قطعه‌های جوانه‌دار پداژه، شماری از شاخساره‌ها را پرآوری نمایند. آن‌ها گزارش دادند که با کاربرد 2 میلی‌گرم در لیتر BAP و 0/5 میلی‌گرم در لیتر NAA، تا حد 2 و یا شمار بیشتری پداژک در بن شاخه‌ها تشکیل شد.

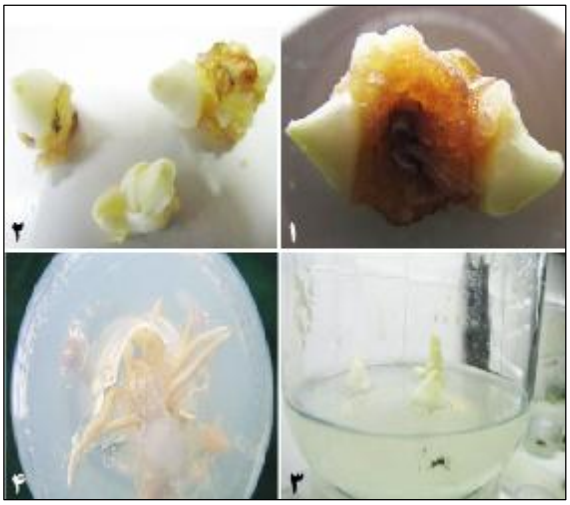
ریشه‌زایی پداژک‌های تولید شده نشان داد که بالاترین درصد ریشه‌زایی (77/80%) روی محیط کشت دارای 1 میلی‌گرم در لیتر IBA به دست آمد. مشخص شد که پداژک‌ها روی محیط کشت MS حاوی IBA ریشه‌زایی موفق‌تری نسبت به پداژک‌های روی محیط کشت MS تکمیل شده با NAA داشتند که با نتایج Zhao (1989) در مورد فریزیا همخوانی دارند.

این پژوهش نشان داد که برای ریزافزایی *Freesia* × *hybrida* Bailey 'Argenta'، ریزنمونه‌های نوچه که به دلیل تشکیل در یخچال دارای قدرت رشد عالی و آلودگی پائینی می‌باشند بسیار مناسبند.

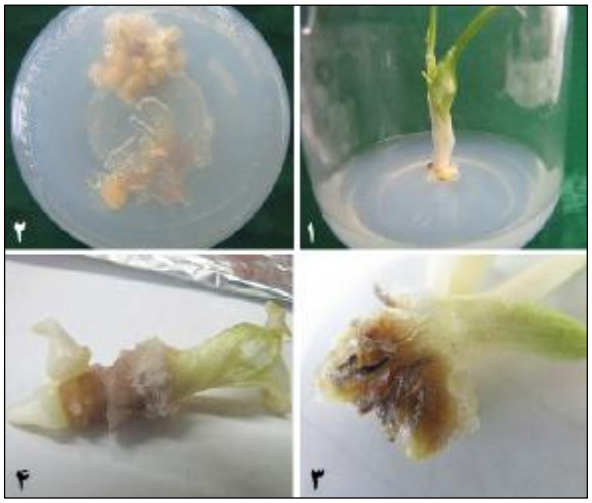
جدول 3- اثر غلظت‌های مختلف NAA و BAP بر شمار پداژک باززایی شده در بن شاخه.

BAP (mg l^{-1})	NAA (mg l^{-1})			میانگین
	0	0/5	1	
0	0/00 e†	0/00 e	0/00 e	0/00 C
1	0/00 e	1/67 d	0/00 e	0/55 B
3	1/30 d	3/67 a	3/30 ab	2/76 A
5	2/00 cd	2/67 bc	3/30 ab	2/66 A
میانگین	0/82 B	2/00 A	1/65 A	

† میانگین‌هایی که با حروف یکسان مشخص شده‌اند (حروف کوچک در مقایسه تیمارها و حروف بزرگ در مقایسه میانگین‌ها)، در سطح 5% آزمون چند دامنه‌ای جدید دانکن تفاوت معنی‌داری با هم ندارند.



نگاره 2- تشکیل پداژک در بن شاخه‌ها پس از زیرکشت روی محیط کشت MS حاوی 3 میلی‌گرم در لیتر BAP و 0/5 میلی‌گرم در لیتر NAA. 1) مراحل اولیه تشکیل پداژک در بن شاخه. 2) باززایی شمار زیادی پداژک در انتهای شاخه. 3) جداسازی پداژک‌های در حال پدیدار شدن و زیرکشت آن‌ها. 4) نمو پداژک‌های کامل.



نگاره 1- تشکیل مستقیم پداژک از نوچه‌های کامل روی محیط کشت MS حاوی 60 گرم در لیتر سوکروز، 6 میلی‌گرم در لیتر NAA و 1 میلی‌گرم در لیتر BAP. 1) پدیدار شدن پداژک‌های جدید، 2) جدا نمودن پداژک‌های جدید، 3) زیرکشت پداژک‌ها برای نمو بیشتر، 4) ریشه‌زایی پداژک‌ها.

منابع

شرف‌زاده، ش و خوشخوی، م. 1383. تاثیرهای پیش خنکی و تنظیم‌کننده‌های رشد بر ریزافزایی زعفران (*Crocus sativus* L.) استهبان. مجله علوم و فنون باغبانی ایران. 136-129: 5.

Bach, A. 1992. Induction of somatic embryogenesis and regeneration of plants in *Freesia* ×*hybrida* cultures. Folia. Hort. 4:11-21.

Homes, J., M. Legros and M. Jaziri. 1987. *In vitro* multiplication of *Crocus sativus* L. Acta Hort. 212:675-676.

Karaoglu, C., S. Cocu, A. Ipek, I. Parmaksiz, S. Uranbey, E. Sarihan, N. Arslan, M.D. Kaya, C. Sancak, S. Ozcan, B. Gurbuz, S. Mirici, C. Er and K.M. Khawar. 2007. *In vitro* micropropagation of saffron. Acta Hort. 739:223-227.

Ojha, A., V. Sharma, V.N. Sharma and A. Rawat. 2010. Effect of different carbohydrates sources on the formation of cormlets of economic important plant: *Gladiolus Pacifica*. Int. J. Biotechnol. Biochem. 6:485-491.

Renau-Morataa, B., L. Moyaa, S.G. Nebauera, J.M. Segui-Simarrob, V. Parra-Vegab, M.D. Gomezc and R.V. Molinaa. 2013. The use of corms produced under storage at low temperatures as a source of explants for the *in vitro* propagation of saffron reduces contamination levels and increases multiplication rates. Indus. Crop Pro. 46:97-104.

Zhao, D.X. 1989. Report of an experiment on corm production from virus-free freesia plantlets in flasks. J. Shanghai-Agric. Coll.7:197-198.

Effects of sucrose and plant growth regulators on the direct cormlet formation of freesia pupa explants (*Freesia* × *hybrida* Bailey 'Argenta') under *in vitro* conditions

Ali Pourkhaloee[1] and Morteza Khosh-Khui[1]

[1]Department of Horticultural Science, College of Agriculture, Shiraz University, Shiraz, Iran

*Corresponding author: Ali Pourkhaloee (alipourkhaloee@yahoo.com)

Abstract

An investigation was carried out on micropropagation of *Freesia* × *hybrida* Bailey 'Argenta' in two separate factorial experiments. In the first experiment, intact pupae were cultured on Murashige and Skoog (MS) medium containing different concentrations of plant growth regulators and sucrose. Results showed that the highest average of cormlet number (6.67) was directly obtained from pupae explants on medium supplemented with 60 g l^{-1} sucrose, 6 mg l^{-1} NAA and 1 mg l^{-1} BAP. After subculturing, the highest diameter of cormlet (13.67 mm) was obtained by application of 60 g l^{-1} sucrose, 2 mg l^{-1} NAA, and 0.5 or 1 mg l^{-1} Kin. In the second experiment, regeneration of cormlets at the base of proliferated shoots from pupae explants was investigated on MS medium. Results showed that the highest average of shoot number (5.67) was observed on intact pupae explants by receiving 4 mg l^{-1} BAP and 2 mg l^{-1} Kin. At the next stage, the highest average of cormlet number (3.67) was obtained at the base of shoots on medium containing 3 mg l^{-1} BAP and 0.5 mg l^{-1} NAA. Investigation on the root formation of new cormlets showed that the highest percentage of rooting (77.80%) was achieved on MS medium supplemented with 1 mg l^{-1} IBA.

Keywords: Direct cormlet formation, Pupa, Tissue culture.