

## پینه‌زایی و مقایسه اثر کربوهیدرات‌های مختلف بر تولید پینه‌های رویان‌زای ریزنمونه‌های پدازه و نوچه فریزیا (*Freesia × hybrida* Bailey 'Argenta')

علی پورخالویی (1) و مرتضی خوشخوی (2)

1 و 2- به ترتیب دانشجو و استاد بخش علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شیراز

نویسنده مسئول: علی پورخالویی [alipourkhaloee@yahoo.com](mailto:alipourkhaloee@yahoo.com)

### چکیده

در این پژوهش، برش‌های دو نوع مختلف از ریزنمونه، شامل پدازه و نوچه (Pupae)، روی محیط کشت موراشیگی و اسکوگ (MS) حاوی غلظت‌های مختلف از تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی قرار گرفتند. نتایج نشان داد که بالاترین درصد پینه‌زایی (100%)، بالاترین میزان رشد پینه (15 میلی‌متر) و باکیفیت‌ترین پینه‌ها، در تیمار 4 میلی‌گرم در لیتر نفتالن استیک اسید (NAA) به همراه 2 میلی‌گرم در لیتر 6- بنزیل آمینو پیورین (BAP) و برای ریزنمونه‌های نوچه به دست آمد. سپس، اندام‌زایی غیرمستقیم از پینه‌های تولید شده مورد مطالعه قرار گرفت. مشخص شد که بیشینه شمار پدازک (Cormlet) باززایی شده از پینه با میانگین 2 عدد، پس از افزایش غلظت BAP به 3/5 تا 4 میلی‌گرم در لیتر به دست آمد. همچنین، پینه‌های باکیفیت، روی محیط کشت MS حاوی غلظت‌های مختلف از سوربیتول، سوکروز، مالتوز و مانیتول زیرکشت شدند و نتایج نشان دادند که 15 گرم در لیتر مالتوز توانست بالاترین میانگین درصد پینه رویان‌زا را به مقدار 88/90% روی محیط کشت حاوی 2 میلی‌گرم در لیتر BAP و 1 میلی‌گرم در لیتر NAA، تولید نماید.

واژه‌های کلیدی: پینه‌زایی، پدازک‌زایی غیرمستقیم، پینه‌های رویان‌زا.

### مقدمه

فریزیا، گیاهی زینتی است که امروزه روش‌های سنتی گیاه‌افزایی آن (کاشت پدازه یا بذر) با ریزافزایی جایگزین شده‌اند. در پژوهشی، Bajaj و Pierik (1974) توانستند از برش‌های 1 سانتی‌متری پدازه فریزیا با استفاده از NAA (5 میلی‌گرم در لیتر) و BAP (1/2 میلی‌گرم در لیتر) پینه تولید کنند که سپس، پینه‌ها اندام‌زایی موفقی نیز داشتند. در پژوهشی دیگر، مشخص شد که نیاز مطلق به کاربرد سایتوکاینین برای انگیزش پینه فریزیا وجود نداشت، اما کاربرد آکسین ضروری و لازم بود. کاربرد نسبت مناسب از آکسین و سایتوکاینین، توده‌ای از پینه را در 5 هفته اول شکل داد (Ascough و همکاران، 2008). گزارش‌های موفقی از رویان‌زایی بدنی در پینه‌های گونه‌های مختلف فریزیا وجود دارند (Wang و همکاران، 1998). در یک پژوهش، Gao و همکاران (2009) برای رویان‌زایی بدنی غیر مستقیم فریزیا، ابتدا پینه رویان‌زا را روی محیط کشت حاوی 5 میلی‌گرم در لیتر BAP و 1 میلی‌گرم در لیتر توفوردی (2,4-D) به دست آوردند و سپس گیاهچه‌های دو قطبی تولید شدند.

### مواد و روش‌ها

به منظور تولید پینه، قطعه‌های پدازه و نوچه به صورت افقی روی محیط کشت MS حاوی غلظت‌های مختلف از NAA (صفر، 2، 4 و 6 میلی‌گرم در لیتر) یا 2,4-D (صفر، 1، 2 و 3 میلی‌گرم در لیتر) به همراه BAP (صفر، 1 و 2 میلی‌گرم در لیتر) قرار گرفتند. در مرحله بعد، برای اندام‌زایی غیرمستقیم، پینه‌های یکنواخت روی محیط کشت MS حاوی BAP (صفر، 1/5، 3 و 4/5 میلی‌گرم در لیتر)، کاینین (Kin) (صفر، 1 و 2 میلی‌گرم در لیتر) و NAA (0/5 و 1 میلی‌گرم در لیتر) زیرکشت شدند. در آزمایشی جداگانه

و برای بررسی اثر 4 نوع قند بر تولید پینه‌های رویان‌زا، پینه‌های یکنواخت روی محیط کشت MS حاوی 2 میلی گرم در لیتر BAP و 1 میلی گرم در لیتر NAA همراه با صفر، 5، 10 یا 15 میلی گرم در لیتر سوربیتول، سوکروز، مالتوز یا مانیتول زیر کشت شدند. آزمایش‌ها به صورت فاکتوریل و در قالب طرح پایه کاملاً 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

بیشترین درصد انگیزش پینه (100%) برای ریزنمونه‌های نوجه و در غلظت 4 یا 6 میلی گرم در لیتر NAA به همراه 2 میلی گرم در لیتر BAP به دست آمد. بالاترین میزان رشد پینه مربوط به ریزنمونه‌های نوجه و پس از کشت روی محیط کشت حاوی 4 میلی گرم در لیتر NAA به همراه 2 میلی گرم در لیتر BAP با میانگین رشد 15 میلی متر به دست آمد. نتایج نشان داد که با کیفیت‌ترین پینه‌ها هنگامی به دست آمدند که میزان 4 یا 6 میلی گرم در لیتر NAA به همراه 1 یا 2 میلی گرم در لیتر BAP در محیط کشت وجود داشت (جدول 1، نگاره 1). همچنین، مشخص شد که 2,4-D نسبت به NAA توانایی کمتری در انگیزش پینه داشت.

ریزنمونه‌های نوجه به علت بافت جوان و دارای ذخیره غذایی بیشتر، پینه‌زایی بهتری را نسبت به پدازه‌ها داشتند. همچنین، مشخص شد که برای پینه‌زایی این رقم از فریزیا، NAA بسیار مناسب‌تر از 2,4-D بود. در یک پژوهش، Bach (1992) نیز گزارش نمود که پیکلورام از نظر انگیزش پینه فریزیا و نگهداری آن و سپس باززایی گیاه از پینه، بهتر از 2,4-D کارایی داشت. گزارش‌هایی وجود دارند که افزودن NAA (0/5 تا 8 میلی گرم در لیتر) یا 2,4-D (0/1 تا 2 میلی گرم در لیتر) را به محیط کشت، برای پینه‌زایی جنس فریزیا به کار برده‌اند (Ascough و همکاران، 2008).

براساس نتایج این پژوهش، بیشینه شمار پدازک باززایی شده از پینه با میانگین 2 عدد در 4 تیمار با غلظت‌های مختلف از تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی به دست آمد (جدول 2، نگاره 1). به احتمال، سطح درونی آکسین‌ها در پینه بالاست و برای باززایی از پینه نیاز به افزایش آکسین نیست و بایستی غلظت سایتوکاینین افزایش یابد.

غلظت 15 گرم در لیتر مالتوز توانست بالاترین میانگین درصد پینه رویان‌زا را با مقدار عددی 88/90% تولید نماید. پس از زیر کشت پینه‌ها، اندام‌های قلبی شکل مشاهده شدند و سپس مراحل بعدی رشد را نشان دادند (نگاره 2). در پژوهش‌های فراوانی، نقش مثبت کربوهیدرات‌ها نه تنها به عنوان منبع کربن برای ایجاد و نمو رویان‌های بدنی، بلکه به عنوان تامین کننده فشار اسمزی برای نمو آن‌ها گزارش شده است (خوشخوی، 1377؛ Ji و همکاران، 2011).

جدول 1- اثر نوع ریزنمونه و غلظت‌های مختلف NAA و BAP بر انگیزش و رشد پینه.

کیفیت ظاهری پینه	رشد پینه (میلی‌متر)	انگیزش پینه (%)	BAP + NAA (mg l <sup>-1</sup> )	
-	0/00 g	0/00 g <sup>†</sup>	0 + 0	
-	0/00 g	0/00 g	0 + 2	
+	7/00 e	44/43 ef	0 + 4	
+	9/00 c	55/56 de	0 + 6	
<hr/>				
-	0/00 g	0/00 g	1 + 0	نوجه
++	8/00 d	44/43 ef	1 + 2	
+++	14/00 ab	88/90 ab	1 + 4	
+++	14/00 ab	100 a	1 + 6	
<hr/>				
-	0/00 g	0/00 g	2 + 0	
++	13/00 b	66/70 cd	2 + 2	
+++	15/00 a	100 a	2 + 4	
+++	14/00 ab	100 a	2 + 6	
<hr/>				
-	0/00 g	0/00 g <sup>†</sup>	0 + 0	
-	0/00 g	0/00 g	0 + 2	
-	0/00 g	0/00 g	0 + 4	
+	5/00 f	33/30 f	0 + 6	
<hr/>				
-	0/00 g	0/00 g	1 + 0	پداژه
-	0/00 g	0/00 g	1 + 2	
++	8/00 d	55/56 de	1 + 4	
++	10/00 c	77/80 bc	1 + 6	
<hr/>				
-	0/00 g	0/00 g	2 + 0	
-	0/00 g	0/00 g	2 + 2	
++	10/00 c	88/90 ab	2 + 4	
+++	10/00 c	88/90 ab	2 + 6	

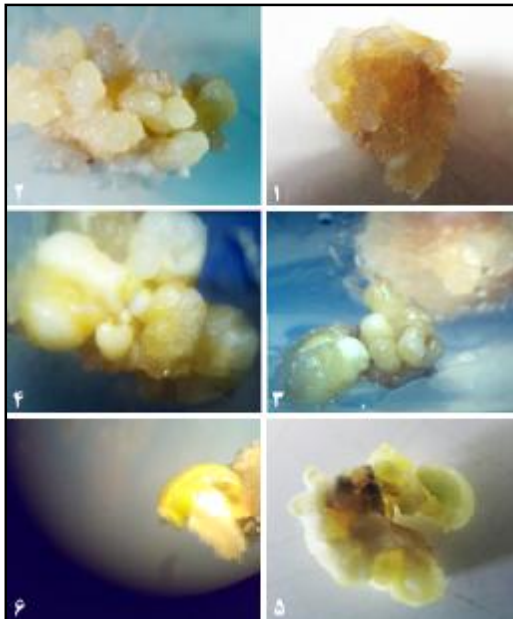
† میانگین‌هایی که با حروف یکسان مشخص شده‌اند (حروف کوچک در مقایسه تیمارها و حروف بزرگ در مقایسه میانگین‌ها)، در سطح 5% آزمون چند دامنه‌ای جدید دانکن تفاوت معنی‌داری با هم ندارند. گروه‌بندی کیفیت ظاهری پینه‌ها: عدم تولید پینه (-)؛ گروه کیفی 1 (+)؛ پائین‌ترین کیفیت؛ گروه کیفی 2 (++)؛ گروه کیفی 3 (+++)؛ گروه کیفی 4 (++++)، بالاترین کیفیت).

این پژوهش نشان داد که برش‌های نوجه، ریزنمونه‌های بسیار مناسبی برای پینه‌زایی 'Argenta' *Freesia × hybrida* Bailey می‌باشند. همچنین، مشخص شد که افزودن کربوهیدرات‌ها، به ویژه قند مالتوز، تیمار مناسبی برای تولید پینه‌های رویان‌زا می‌باشد.

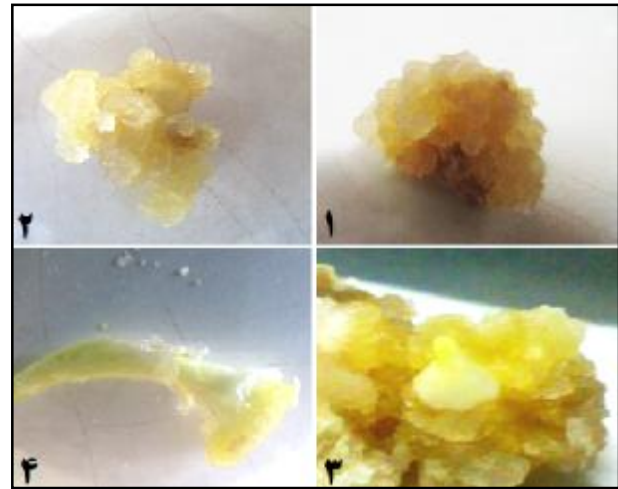
جدول 2- اثر غلظت‌های مختلف Kin، NAA و BAP بر شمار پداژک باززایی شده از پینه.

میانگین	میانگین	Kin (mg l <sup>-1</sup> )			BAP + NAA (mg l <sup>-1</sup> )
		2	1	0	
0/41 A	0/00 C	0/00 c	0/00 c	0/00 c <sup>†</sup>	0 + 0/5
		0/00 c	0/00 c	0/00 c	1/5 + 0/5
	0/00 C	1/00 b	1/00 b	0/00 c	3 + 0/5
		2/00 a	1/00 b	0/00 c	4/5 + 0/5
0/66 A	0/83 B	0/00 c	0/00 c	0/00 c	0 + 1
		0/00 c	0/00 c	0/00 c	1/5 + 1
	1/33 A	2/00 a	1/00 b	0/00 c	3 + 1
		2/00 a	2/00 a	1/00 b	4/5 + 1
		0/87 A	0/62 B	0/12 C	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.



نگاره 2- مراحل مختلف نمو اندام شبه رویان از پینه. 1) پینه غیر رویانزا، 2) پینه رویانزا با نقاط کروی، 3) نمو نقاط کروی، 4) مرحله قلبی، 5) تولید شاخساره. 6) تولید ریشه.



نگاره 1- پینه‌زایی و باززایی از آن. 1) پینه‌های فشرده، منسجم و به رنگ زرد تا قهوه‌ای (بالاترین کیفیت) و 2) پینه‌های پفکی، ترد و به رنگ سفید شفاف (پائین‌ترین کیفیت)، 3) باززایی پدازک از پینه، پس از زیرکشت پینه روی محیط کشت MS حاوی 4/5 میلی‌گرم در لیتر BAP و 2 میلی‌گرم در لیتر Kin. 4) رشد پدازک‌های باززایی شده از پینه، پس از زیرکشت روی محیط حاوی 4/5 میلی‌گرم در لیتر BAP و 2 میلی‌گرم در لیتر Kin.

### منابع

- خوشخوی، م. 1377. فنون کشت بافت برای گیاهان باغبانی (بوستانداری). برگردان. چاپ دوم. انتشارات دانشگاه شیراز. 437 صفحه.
- Ascough, G.D., J.E. Erwin and J. Van Staden. 2008. *In vitro* storage organ formation on ornamental geophytes. Hort. Rev. 34:417-444.
- Bach, A. 1992. Induction of somatic embryogenesis and regeneration of plants in *Freesia ×hybrida* cultures. Folia. Hort. 4:11-21.
- Bajaj, Y. P. S. and R.L.M. Pierik. 1974. Vegetative propagation of *Freesia* through callus cultures. Neth. J. Agric. Sci. 22:153-159.
- Gao, X., D. Yang, D. Cao, M. Ao, X. Sui, Q. Wang and L. Wang. 2009. *In vitro* micropropagation of *Freesia ×hybrida* and the assessment of genetic and epigenetic stability in regenerated plants. J. Plant Growth Regul. 29:257-267.
- Ji, A., X. Geng, Y. Zhang, H. Yang and G. Wu. 2011. Advances in somatic embryogenesis research of horticultural plants. Amer. J. of Plant Sci. 2:727-732.
- Wang, L., X.M. Bao, B.Q. Huang and S. Hao. 1998. Somatic embryogenic potential determined by the morphological polarity of the explant in tissue cultures of *Freesia refracta* Klatt. Acta Bot. Sin. 40:138-143.

## Callogenesis and comparison of the effects of different carbohydrates on the formation of embryogenic calli of corm and pupa explants of freesia (*Freesia × hybrida* Bailey 'Argenta')

Ali Pourkhaloe<sup>1</sup> and Morteza Khosh-Khui<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Horticultural Science, College of Agriculture, Shiraz University, Shiraz, Iran

\*Corresponding author: Ali Pourkhaloe ([alipourkhaloe@yahoo.com](mailto:alipourkhaloe@yahoo.com))

### Abstract

In this research, sections of two different types of explants, corm and pupa, were placed on Murashige and Skoog (MS) medium containing different concentrations of plant growth regulators. Results showed that the highest percentage of callus induction (100%), the highest callus growth (15 mm diameter) and the highest quality of calli was achieved for pupa explants at 4 mg l<sup>-1</sup> NAA and 2 mg l<sup>-1</sup> BAP. Indirect organogenesis studies showed that the maximum number of regenerated cormlets from callus (2) was obtained after increasing BAP concentration up to 3.5 to 4 mg l<sup>-1</sup>. Also, high quality calli were subcultured on MS medium containing different concentrations of sorbitol, sucrose, maltose and mannitol. Results indicated that 15 g l<sup>-1</sup> maltose was able to induce the highest percentage of embryogenic callus with average of 88.9% on medium containing 2 mg l<sup>-1</sup> BAP and 1 mg l<sup>-1</sup> NAA.

Keywords: Callogenesis, Embryogenic calli, Indirect cormlet formation.