Iranian Journal of Biological Sciences.2023; 18(4):1-10

Orginal Article

Iranian Journal of Biological Sciences

https://zisti.iauvaramin.ac.ir

Investigating the Effects of Some Growth Regulators In Vitro Culture (*Rhododendron yakusimanum* L.)

Mohammad Ebrahimzadeh

Assistant Professor, Deparement of Biology, Islamic Azad University of Varamin – Pishva branch , Varamin, Tehran

Place of Research: Deparement of Biology, Islamic Azad University, Branch of Varamin and Pishva.

Article Info

Article History:

Recived 02.14.2024
Revised 05.21.2024
Accepted 07.10.2024
Online 07.12.2024

KeyWords:

In vitro culture, Rhododendron yakusimanum, growth regulators, organogenesis.

***Corresponding author:**
E-mail address

m.ebrahimzadeh530@gmail.com

Abstract

Introduction: *Rhododendron yakusimanum* plant (*Rhododendron yakusimanum* L.) is one of the ornamental plants in the world that is propagated by the traditional method of cutting leafy stems. Unfortunately, this method is not completely successful and cutting losses are high. Also, in this method, it is possible to spread infected plants.

Aim: In this research, it was tried to investigate the propagation of this plant using different hormone concentrations.

Materials and Methods: First, the branches were separated from the greenhouse plants and the surface contamination of the samples was removed using %70 alcohol and %2 sodium hypochlorite, respectively, with 20 seconds and 15 minutes. The sterilized pieces were cultured in media containing different concentrations of growth regulators 2,4 -D (2-0 mg/L) and 2ip (10-0 mg/L) for the purpose of calligenesis. After 90 days, the callus volume was measured and analyzed using SPSS software. To study the organogenesis of the resulting calli, they were planted in environments designed with the hormones IAA (4-0 mg/L) and 2ip(5-0 mg/L) and the growth of aerial parts was investigated. The rooting of elongated branches was also evaluted in different environments. evaluated.

Results: The highest callus volume was obtained at the concentration of 5 mg/ml of 2ip and 0.5 mg/L of 2,4 -D in lighting. the best medium for organogenesis was 4 mg/L of 2ip and 0.5 mg/L of IAA. The results indicated the root growth in the environment outside the root in the perlite bed.

Conclusion: Rooted microstems of rhododendron were successfully transformed into mature plants after acclimatization in the greenhouse by using in-glass culture of branching isolates.

Cite this article: Ebrahimzadeh M. Investigating the Effects of Some Growth Regulators In Vitro Culture (*Rhododendron yakusimanum* L.) Iranian Journal of Biological Sciences. 2023; 18(4):1-10

Publisher: Islamic Azad University of Varamin – Pishva branch Print ISSN: 1735-4226 Online ISSN: 1727-459X
This is an open access article under the: https://creativecommons.org/license/by-nc/4.0/

دانش زیستی ایران . سال۱۴۰۲ . دوره ۱۸ . شماره ۴

مقاله تحقیقی

دانش زیستی ایران

https://zisti.iauvaramin.ac.ir

اثرات برخی تنظیم‌کننده‌های رشد در کشت شیشه گیاه *Rhododendron yakusimanum* L.

محمد ابراهیم زاده

استادیار، گروه زیست شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد ورامین- پیشوا

محل انجام تحقیق: گروه زیست شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد ورامین- پیشوا

اطلاعات مقاله

تاریخچه مقاله

ارسال ۱۴۰۲/۱۱/۲۴

بازنگری ۱۴۰۳/۰۲/۲۲

پذیرش ۱۴۰۳/۰۴/۲۰

نمایه ۱۴۰۳/۰۴/۲۳

کلمات کلیدی

کشت درون شیشه

رودودندرون یاکوزیمانوم

تنظیم‌کننده‌های رشد

اندام‌زایی

* **نویسنده مسؤل**

m.ebrahimzadeh530@gmail.com

چکیده

مقدمه: گیاه رودودنـــدرون یاکوزیمانوم (*Rhododendron yakusimanum* L.) از تیرهٔ اریکاســـه از جمله گیاهـــان زینتی اســـت که در دنیا به روش ســـنتی قلمه‌زدن ســـاقه‌های برگدار زیاد می‌شـــود. متأســـفانه ایـــن روش به طـــور کامل موفقیت‌آمیز نیســـت و تلفات قلمه‌ها بالاســـت. همچنین در ایـــن روش امکان گســـترش گیاهان آلوده فراهم می‌شـــود.

هـــدف: در ایـــن تحقیق ســـعی گردید با اســـتفاده از غلظتهای مختلـــف هورمونی تکثیر ایـــن گیاه مورد بررســـی قرار گیرد.

مـــواد و روش هـــا: ابتدا سرشـــاخه هـــا از گیاهـــان گلخانـــه ای جدا شـــده و آلودگی ســـطحی نمونه‌ها بـــا اســـتفاده از الـــکل 70% و هیپوکلریـــت ســـدیم 2%، به ترتیـــب با زمانهـــای 20 ثانیـــه و 15 دقیقه برطـــرف گردید. قطعات سترون‌شـــده بـــه منظور کالزایـــی به محیط هـــای حاوی غلظت‌هـــای مختلف تنظیم‌کننده‌هـــای رشـــد 2,4-D (۰-۲میلی گرم برلیتر) و 2ip (۰-۱۰میلی گرم برلیتر) کشـــت داده شـــدند. پـــس از 90 روز حجـــم کالوس ها اندازه گیری شـــده وبـــا کمک نرم افـــزار SPSS مورد تجزیـــه وتحلیل قـــرار گرفت. بـــرای مطالعه اندام‌زایـــی کال‌های حاصله به محیطهای طراحی شـــده بـــا هورمونهای IAA (۰-۴میلـــی گـــرم برلیتر) و 2ip (۰-۵میلی گرم برلیتر) واکشـــت شـــده و رشـــد اندام هوایی مورد بررســـی قـــرار گرفت.ریشـــه زایی شـــاخه های طویل شـــده نیز در محیط هـــای مختلف ارزیابی شـــد.

نتایـــج: بیشـــترین حجم کالـــوس در غلظت ۵ میلی گرم بر میلـــی لیتر 2ip و ۰/۵ میلی گـــرم برلیتر 2,4-D در روشـــنایی بدســـت آمد. بهترین محیط بـــرای اندامزایی ۴ میلی گـــرم برلیـــتر 2ip و۰/۵ میلی گرم برلیتر IAA حاصل شـــد. نتایج حاکی ا-ز رشـــد ریشـــه در محیط خارج از ریشـــه در بســـتر پرلیت بوده است.

نتیجه گیری: ریز ســـاقه های ریشـــه دار شـــده رودودندرون بااســـتفاده از کشـــت درون شیشه جداکشت های سرشـــاخه نهایتا پس از ســـازگاری در گلخانه بطور موفقیـــت آمیزی تبدیل به گیاهـــان بالغ گردیدند

شـــیوه آدرس‌دهـــی این مقاله : ابراهیـــم زاده م.، اثرات برخی تنظیم‌کننده‌های رشـــد در کشـــت شیشـــه گیـــاه *Rhododendron yakusimanum* L. مجله دانش زیســـتی ایران. ۱۴۰۲ ؛ ۱۸ (٤):۱-۱۰

ناشر: دانشـــگاه آزاد اســـلامی واحد ورامین - پیشـــوا **شـــاپا چاپی:** ۱۷۳۵-٤۲۲٦ **شـــاپا الکترونیکی:** ۲۷۱۷-٤٥۹X **نویســـندگان:** © حق مؤلف

مقدمه:

جنس رودودندرون به همراه آزالیا که برخی این جنس را هم بخشی از سرده رودودندرون می‌دانند دارای گلهای بسیار زیبا می‌باشد که در نواحی کوهستانی اروپا، آسیای‌میانه، آسیای‌جنوبی و آمریکای‌شمالی یافت می‌شوند(۱). گونه‌های این سرده به لحاظ داشتن خواص دارویی در کنار زیبایی گلها در جهان از اهمیت زیادی برخوردارند. در ایران این سرده بطور محدودی در نواحی شمالی اطراف چالوس، نوشهر و کلاردشت بطور محدودی و بصورت دست کاشت وجود دارد. لذا تکثیر این گیاه در این تحقیق ضروری به نظر می‌رسید. روش عمومی تکثیر، ریشه‌دار کردن قلمه‌های خشبی می‌باشد. ولی تلفات در این قلمه‌ها به شدت بالا بوده و به راحتی ریشه‌دار نمی‌گردند (۲-۳). همچنین ازدیاد قلمه در کنار تلفات بالا امکان آلوده شدن گیاه به عوامل میکروبی و ویروسی را باعث می‌شود که عملاً امروزه این روش تکثیر اعتبار خود را از دست داده است. به دلایل فوق، امروزه روشهای مختلف ریز ازدیادی شیشه‌ای به‌عنوان جایگزین روشهای سنتی که دارای جهات مطلوب بیشتری است کاربرد فراوانی یافته است (٤-٦). ازسوی دیگر چون تعداد این واریته در کشور بسیار محدود وکم میباشد تنها را ه تولید آن بروش کشت بافت می باشد که در این پژوهش بدان پرداخته شده است. در پژوهش‌های انجام شده برای ریز ازدیادی گونه‌های مختلف رودودندرون و آزالیا جوانه‌های رأسی و جانبی در کنار برگها به‌عنوان قطعه جدا کشت مطلوب معرفی شده است که در این تحقیق نیز از آنها استفاده شده است(۷-۸).

مواد و روش ها

سرشاخه‌های جوان رودودندرون یاکوزیمانوم پس از برداشت از گیاه مادر در شرایط حفاظت شده بدون تأثیرگذاری عوامل تنش‌زا و میکروبی به آزمایشگاه منتقل گردید. ابتدا به‌دقت ساقه و برگها در جریان آب شسته شده و همزمان از چند قطره مایع ظرفشویی برای پاک‌کنندگی بیشتر استفاده گردید. سپس قطعات جدا کشت به ظروف سترون منتقل شده و از تیمار الکل ۷۰٪ به مدت ۲۰ ثانیه استفاده گردید، بلافاصله بعد از تیمار الکل، قطعات جدا کشت در معرض هیپوکلریت سدیم ۲٪ قرار گرفتند پس از طی زمان ۱۵ دقیقه نمونه‌ها ۳ بار با آب مقطر سترون آبکشی شده و بعد از حذف نمودن حاشیه‌های آسیب‌دیده، برگ در شرایط سترون به قطعات کوچکتر تقسیم شده و در محیط‌های Anderson کشت شدند به محیط‌های کشت ۳۰ گرم بر لیتر ساکارز و تنظیم‌کننده‌های رشد IAA و 2,4-D و 2ip در غلظت‌ها و ترکیب‌های مختلف افزوده شده و pH آنها روی ۵/۵ تنظیم گردید. برای راسب نمودن محیط‌ها نیز از ۷ گرم بر لیتر آگار استفاده شد و پس از آماده‌سازی نهایی بوسیله اتوکلاو در دمای ۱۲۱ درجه به مدت ۱۵ دقیقه سترون گردیدند. نمونه‌های کشت شده بر محیط‌های کالزایی که دارای ترکیبات مختلف دو هورمون 2,4-D و 2ip براساس جدول (۱) بود در دو شرایط تاریکی و دورهٔ نوری ۱٦ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی قرار گرفتند. بازبینی‌ها هرهفته صورت گرفته و نتیجه‌گیری نهایی پس از یک ماه صورت پذیرفت. میانگین آماری و خطای میانگین محاسبه شده و داده‌های حاصل با استفاده از نرم‌افزار SPSS مورد تجزیه‌وتحلیل قرار گرفت. تفسیر نهایی نیز با استفاده از آزمون‌های تکمیلی بررسی شد و مقایسه میانگین‌ها با استفاده از MSTATC عوامل مورد بررسی، نوع و غلظت تنظیم‌کننده‌های رشد درنظرگرفته شد. نهایتاً تجزیه‌وتحلیل داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار آزمون چند دامنه‌ای دانکن انجام گرفت.

در مرحله بعد کالوسهای تشکیل شده در محیط‌های کالزایی با اندازه‌های یکسان در محیط‌های اندام‌زایی واکشت گردید. تا اثر ترکیب تنظیم‌کننده‌های رشد مورد بررسی قرارگیرد. برای دستیابی به این هدف محیط‌های اندام‌زایی بر مبنای محیط پایه Anderson طبق جدول (۲) تهیه گردید.

در تمامی محیط‌های فوق همانند محیط‌های مربوط به کالزایی از ۳۰ گرم بر لیتر ساکارز استفاده شده و pH محیط‌ها نیز روی ۵/۵ تنظیم گردید. محیط‌های کشت شده در دو شرایط تاریکی و روشنایی با ۱٦ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی قرار داده شد تا اثر نور نیز بر اندام‌زایی مورد بررسی قرار گیرد.

جدول (۱) غلظت و نوع تنظیم‌کننده‌های رشد در محیط‌های مختلف کالزایی

۲,۴-D (mg/L) / ۲ip (mg/L)	۰	۰/۲۵	۰/۵	۱	۲
۰	۰ A12ip ۰	۰/۲۵ A2 ۰	۰/۵ A3 ۰	۱ A4 ۰	۲ A5 ۰
۱	۰ A6 ۱	۰/۲۵ A7 ۱	۰/۵ A8 ۱	۱ A9 ۱	۲ A10 ۱
۳	۰ A11 ۳	۰/۲۵ A12 ۳	۰/۵ A13 ۳	۱ A14 ۳	۲ A15 ۳
۵	۰ A16 ۵	۰/۲۵ A17 ۵	۰/۵ A18 ۵	۱ A19 ۵	۲ A20 ۵
۱۰	۰ A21 ۱۰	۰/۲۵ A22 ۱۰	۰/۵ A23 ۱۰	۱ A24 ۱۰	۲ A25 ۱۰

جدول (۲) غلظت تنظیم‌کننده‌های رشد در محیط‌های اندام‌زایی

IAA(mg/L) / ۲ip (mg/L)	۰	۰/۰۵	۰/۲۵	۰/۵	۱	۲	۴
۰	۰ B1 ۰	۰/۰۵ B2 ۰	۰/۲۵ B3 ۰	۰/۵ B4 ۰	۱ B5 ۰	۲ B6 ۰	۴ B7 ۰
۰/۵	۰ B8 ۰/۵	۰/۰۵ B9 ۰/۵	۰/۲۵ B10 ۰/۵	۰/۵ B11 ۰/۵	۱ B12 ۰/۵	۲ B13 ۰/۵	۴ B14 ۰/۵
۱	۰ B15 ۱	۰/۰۵ B16 ۱	۰/۲۵ B17 ۱	۰/۵ B18 ۱	۱ B19 ۱	۲ B20 ۱	۴ B21 ۱
۲	۰ B22 ۲	۰/۰۵ B23 ۲	۰/۲۵ B24 ۲	۰/۵ B25 ۲	۱ B26 ۲	۲ B27 ۲	۴ B28 ۲
۴	۰ B29 ۴	۰/۰۵ B30 ۴	۰/۲۵ B31 ۴	۰/۵ B32 ۴	۱ B33 ۴	۲ B34 ۴	۴ B35 ۴
۵	۰ B36 ۵	۰/۰۵ B37 ۵	۰/۲۵ B38 ۵	۰/۵ B39 ۵	۱ B40 ۵	۲ B41 ۵	۴ B42 ۵

نتایج

تیمارهای و طرح آزمایشی

اثر سطوح مختلف 2ip در القاء کالزایی

مقایسه میانگین حجم و وزن ترکالوس با آزمون دانکن آشکار نمود که بدون توجه به غلظت اکسین هر چه غلظت 2ip از ۱ میلی‌گرم بر لیتر به سمت ۵ میلی‌گرم بر لیتر افزایش یافت، شاخص‌های مورد سنجش از جمله دوام قطعه جدا کشت افزوده گردید. بیشترین میزان آن که حکایت از تقسیم سلولی و تشکیل کالوس داشت در محیط با غلظت ۵ میلی‌گرم بر لیتر 2ip صورت پذیرفت. افزایش یا کاهش 2ip باعث کاهش و یا عدم تولید کالوس گردید.

در تمامی محیط‌هایی که غلظت‌های متغیر هورمون 2,4-D، بدون حضور 2ip و محیط‌هایی که دارای غلظت‌های متغیر 2ip، بدون حضور 2,4-D بود کالوسی پدیدار نگردید. در محیط‌های دارای غلظت‌های ۱ میلی‌گرم بر لیتر 2ip در کنار غلظت‌های متغیر 2,4-D، کوچکترین حجم کالوس مشاهده شد. هرچه مقدار هورمون سیتوکینین به سمت ۳ و ۵ میلی‌گرم بر لیتر افزایش نشان می‌داد، بطور قابل توجهی بر حجم کالوس افزوده می‌گردید، در محیط‌های دارای غلظت‌های ۵ میلی‌گرم بر لیتر 2ip با غلظت‌های متغیر 2,4-D، بزرگترین توده کالوسی تشکیل شده در غلظت ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر 2,4-D مشاهده گردید، حجم این توده کالوسی بطور میانگین بالغ بر ۳/۹۲ سانتی‌مترمکعب بود.

در غلظت ۱۰ میلی‌گرم بر لیتر 2ip و غلظت‌های متغیر 2,4-D، تنها در غلظت ۱ میلی‌گرم بر لیتر 2,4-D توده کالوسی مختصری با ابعاد ۳*۲*٤ میلی‌مترمربع مشاهده گردید. در سایر نمونه‌های کشت شده در این گروه تنها تورم مختصری در کنار قطعه جدا کشت مشاهده شد. لازم به ذکر است که کالوس‌های تشکیل شده بر محیط‌های دارای غلظت‌های ۱ و ۲ میلی‌گرم بر لیتر 2,4-D بعد از ۵ هفته قهوه‌ای رنگ شده و رشدشان متوقف گردید.

جدول (۳) میزان حجم کالوس و وزن تر کالوس

منابع تغییر	درجه آزادی	میانگین مربعات صفات اندازه‌گیری شده	
		حجم کالوس	وزن ترکالوس
تنظیم‌کننده رشد 2 ip	۲	۲۸/۱۹**	۳/۹**
تنظیم‌کننده رشد ۲,۴-D	۲	۳۰/۱۲**	۰/۷۵**
2 ip* 2,4-D	۴	۱۳/۱۷	۰/۰۶*
خطای آزمون	۳۶	۰/۵	۰/۰۰۶
کل	۴۸		
C.V.%		۲۹/۴۳	۱۲/۸۵

** معنی‌دار بودن میانگین‌ها در سطح ۱ درصد

* معنی‌دار بودن میانگین‌ها در سطوح ۵ درصد

اثر نور و تاریکی بر روند تقسیم سلولی و اندام‌زایی

در این بررسی اثر نور در دو مرحله مورد توجه قرار گرفت. نور در نمونه‌هایی که به منظور کالزایی در محیط‌ها کشت شده بودند اثر تحریک‌کننده بر روند تقسیم سلولی گذاشته، بطوریکه در غلظت‌های هورمونی تعبیه شده در تاریکی کالوسی تشکیل نگردید و تشکیل کالوس تنها در برخی از محیط‌های قرار گرفته در شرایط نوری مشاهده گردید. این اثر تحریکی نور در تقسیم سلولی همچنین در مرحله اندام‌زایی نیز مشهود بود. بطوریکه تشکیل جوانه‌های رویشی بر روی توده‌های کالوسی تنها در شرایط نوری مشاهده گردید.

اثر سطوح مختلف 2ip بر اندام‌زایی

در جدول (۲) همانگونه که مشاهده می‌گردد ٤۲ محیط با غلظت‌های هورمونی مختلف اکسین- سیتوکینین پیشنهاد شده است که بر هر محیط ۳ قطعه کالوس

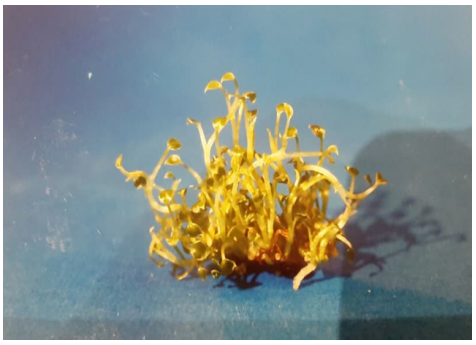
واکشت گردید. در هر محیط معیارهای حجم زی‌توده، تمایزیابی و ارتفاع ساقه مورد بررسی قرار گرفت.
در محیط‌های دارای ۰، ۰/۵ و ۱ میلی‌گرم بر لیتر ۲ip با غلظت‌های متغیر IAA عملاً هیچگونه رشدی در توده‌های کالوسی مشاهده نگردید و قطعات کشت شده پس از ٦ هفته قهوه‌ای شده و رشدشان متوقف گردید.
در محیط‌های دارای ۲ میلی‌گرم بر لیتر ۲ip و غلظت‌های متغیر IAA هرچه مقدار هورمون از ۰/۲۵ میلی‌گرم بر لیتر بالاتر می‌رفت رشد زی‌توده کمتر و سپس در ۱ میلی‌گرم بر لیتر و یا بالاتر متوقف می‌گردید در عوض در غلظت ۱ میلی‌گرم بر لیتر بیشتر طویل شدن شاخه‌ها تا حد ۳ میلی‌متر مشاهده می‌گردید.
در محیط‌های دارای ٤ میلی‌گرم بر لیتر ۲ip با غلظت‌های متغیر IAA قطعات کشت شده رشد مناسبی را آشکار ساختند. در این سری از نمونه‌ها رنگ قطعات کشت شده کاملاً سبز بوده و در غلظت ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر IAA بزرگترین حجم توده سبز رنگ بدست آمد. هرچه غلظت اکسین به‌کاررفته از ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر بالاتر می‌رفت از حجم قطعات کاسته شده در عوض شاخه‌های نابجا افزایش یافت. همچنین در این غلظت هورمون سیتوکینین بیشترین طول ساقه در این پژوهش مشاهده گردید که در غلظت ۱میلی گرم IAA وبه میزان۱/٦۱ سانتی متر بود.
در محیط‌های با غلظت ۵ میلی‌گرم بر لیتر ۲ip و غلظت‌های متغیر IAA نیز رشد مناسب زی توده مشاهده گردید ولی میزان رشد در مقایسه با غلظت ٤میلی گرم بر لیتر۲IP در غلظت بالاتر IAAاتفاق افتاد.
در این سری از محیط‌ها نیز طول ریز ساقه‌های تشکیل شده بر محیط‌های دارای ٤میلی‌گرم بر لیتر IAA بیش از محیط‌های دارای ۱ و۲ میلی‌گرم بر لیتر IAA ثبت گردید.
در این غلظت هورمون سیتوکینین افزایش میزان هورمون اکسین باعث طویل شدن طول ساقه تا حد ۱/۲ سانتی متر گردید.

ریشه‌زایی

بلندترین ریزساقه‌های بدست آمده در محیط‌های in vitro با غلظت‌های مختلف هورمون IBA واکشت گردید که هیچ نشانه‌ای از ریشه‌زایی مشاهده نگردید و ریشه‌زایی موفق در محیط خارج شیشه در بستر پرلیت بعد از یک ماه مشاهده گردید.

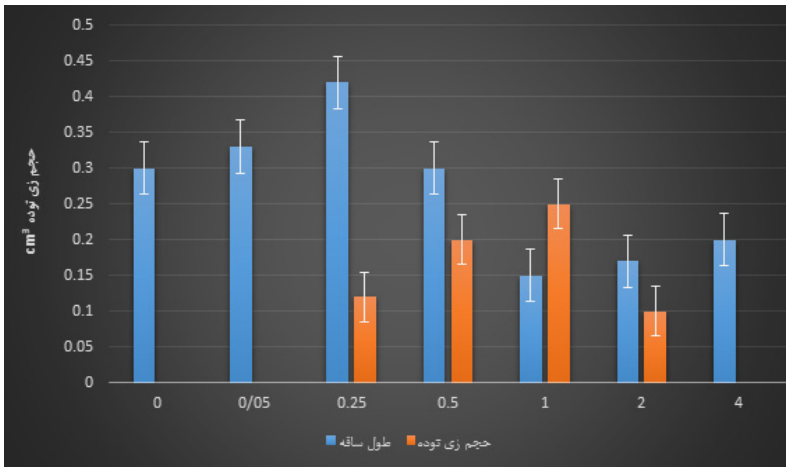
جدول (٤) میزان حجم کالوس و ارتفاع ریزساقه‌ها در دامنه‌های هورمونی مختلف

IAA mg/L	۲ip ۲mg/L		۲ip ۴mg/L		۲ip ۵mg/L	
	حجم زی‌توده cm^3	ارتفاع شاخه cm	حجم زی‌توده cm^3	ارتفاع شاخه cm	حجم زی‌توده cm^3	ارتفاع شاخه cm
۰	۰/۳±۰/۰۷۵	—	۱/۲۰±۰/۱۱	—	۰/۸±۰/۱۸	—
۰/۰۵	۰/۳۲±۰/۰۵	—	۱/۳۱±۰/۱۲	—	۰/۸±۰/۱۸	—
۰/۲۵	۰/۴۳±۰/۰۶	۰/۱۲±۰/۰۴	۱/۷۰±۰/۱۱	—	۱/۱۸±۰/۱۷	—
۰/۵	۰/۳۱±۰/۰۴	۰/۲±۰/۰۵	۱/۸۰±۰/۱۰	۰/۲۱±۰/۲۷	۱/۴۱±۰/۱۸	۰/۲۱±۰/۲۱
۱	۰/۱۵±۰/۰۶	۰/۲۵±۰/۰۴	۱/۶۱±۰/۱۱	۱/۶۱±۰/۲۴	۱/۶۰±۰/۱۷	۰/۳۱±۰/۲۱
۲	۰/۱۷±۰/۰۶	۰/۱±۰/۰۴	۱/۲۰±۰/۱	۱/۰±۰/۲۴	۱/۴۰±۰/۱۸	۰/۶±۰/۲۲
۴	۰/۲± ۰/۰۴	—	۱/۲± ۰/۱۱	۱/۰± ۰/۲۴	۰/۶± ۰/۱۷	۱/۲± ۰/۲۲

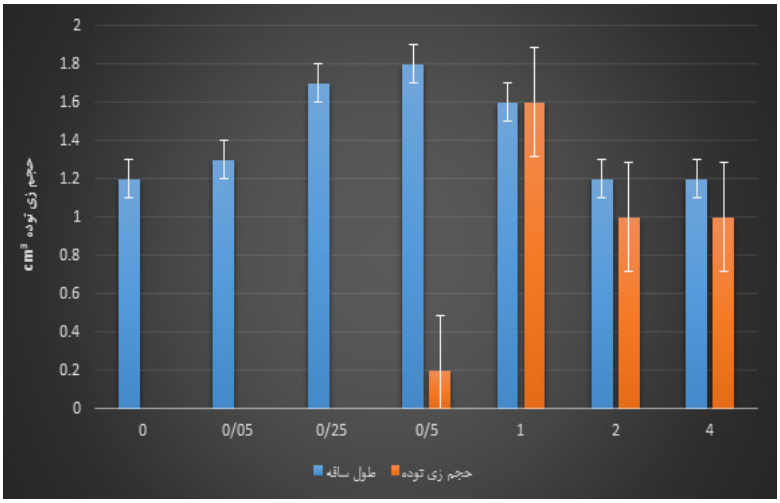


شکل۲: نمونه کشت شده در غلظت ٤میلی گرم بر لیتر ۲ip و ۱میلی گرم برلیتر IAA

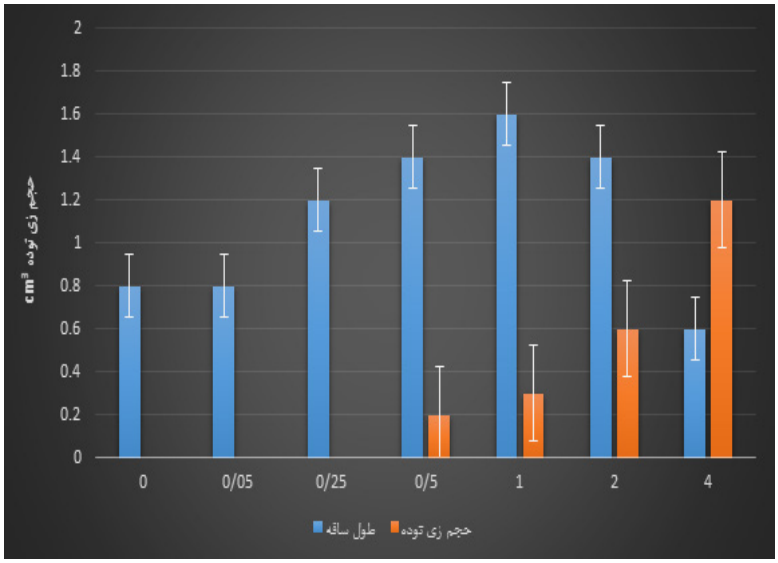
شکل۱: نمونه کشت شده در غلظت ٤میلی گرم برلیتر ۲ip و۰/۵میلی گرم بر لیتر IAA



نمودار ۱: مقایسه اثر مقادیر مختلف IAA و میزان ثابت ۲میلی گرم در لیتر ۲ip بر حجم زی‌توده و ارتفاع ساقه



نمودار ۲: مقایسه اثر غلظت‌های متغیر IAA و میزان ثابت ٤میلی گرم در لیتر۲ip بر حجم زی‌توده و ارتفاع ساقه



نمودار ۳: مقایسه اثر غلظت‌های متغیر IAA و میزان ثابت ۵میلی گرم در لیتر ۲ip بر حجم زی‌توده و ارتفاع ساقه

بحث

اسپورهای قارچی در کنار آلودگی‌های باکتریایی از مهمترین عوامل آلودگی در کشتهای سلول و بافت می‌باشد Bhojwan و Razdan برای کنترل این عوامل زمانهای مختلف تأثیرگذاری اتانول و هیپوکلریت سدیم مورد بررسی قرار گرفت(۹). غلظت الکل به لحاظ نفوذپذیری سطوح مختلف بافتها و تأثیرگذاری از عوامل تعیین‌کننده می‌باشد که در این پژوهش از الکل ۷۰٪ استفاده گردید که در زمان تأثیرگذاری ۲۰ ثانیه مناسب تشخیص داده شد. برای مرحله پایانی سترون‌سازی نیز غلظت و زمان هیپوکلریت سدیم مورد پژوهش واقع گردید، به علت نفوذپذیری کم این ماده از چند قطره مایع ظرفشویی نیز در حین سترون‌سازی استفاده گردید، که زمان ۱۵ دقیق مناسب تشخیص داده شد. موفقیت در مراحل سترون‌سازی در کنار غلظت و زمان تأثیرگذاری سترون شده به حساسیت‌های مختلف عوامل آلوده‌کننده قارچی و باکتریایی و میزبان بستگی دارد(۹).

در محیط‌های کالزایی همواره سطوح مختلف هورمون‌های درون‌زا و برون‌زاد از مهم‌ترین عوامل تعیین‌کننده در تقسیم سلول می‌باشد(۱۰).

تفسیر روند کالزایی

جهت بررسی چگونگی تشکیل کالوس همانطور که قبلاً ذکر شد جدا کشتهای مختلف برگی و میانگیره‌ای از گیاهان گلدانی به کار رفتند در اولین قدم کشت قطعات روی محیط An با هورمون‌های 2,4-D و ۲ip در غلظت‌های مختلف صورت گرفت که در برخی از محیط‌ها منجر به تشکیل کالوس گردید البته محیط‌هایی که تنها دارای یک نوع هورمون بودند قادر به از سرگیری تقسیمات سلولی نبودند حتی اگر هورمون مذکور ۲ip بود. نتیجه فوق با گزارش lapichino et al., ۱۹۹۲ که ذکر کرده‌اند کالوس در (Rhododendron P.J.M) تنها با هورمونهای ۲ip و 2,4-D تشکیل می‌شود همسو است(۱۱). عموما در تشکیل کالوس یک هورمون به تنهایی قادر به تقسیم سلولی نبوده و حضور هردو هورمون سیتوکینین واکسین ضروری است. ازطرف دیگر چون تشکیل کالوس با تقسیم بالای سلولی صورت میگیرد مقادیر بالاتر سیتوکینین به اکسین لازم است.

ریخت‌زایی و اندام‌زایی کالوس‌ها

در اندام‌زایی یا رویانزایی در کالوس در بسیاری از

مـــوارد هورمون‌هـــای به‌کاررفتـــه در محیـــط کشـــت نقش دارنـــد بطوریکـــه در برخـــی از مـــوارد این امر بـــه صورت خودبخـــودی و یا در حضـــور مقادیر کم هورمـــون یا بدون هورمـــون شروع می‌شـــود. Bhojwanو Razdan گـــزارش دادند کـــه به غیـــر از هورمون‌ها مـــواد معدنی نیـــز تأثیر گذارنـــد(۵). مثـــلاً غلظـــت بالای نمـــک که در بســـیاری از مـــوارد مانع از رشـــد می‌شـــود می‌تواند باعـــث تحریک در تشـــکیل و نوپدیدی ســـاقه از کالـــوس گـــردد (۱۱). در این پژوهـــش توده‌های کالوســـی به اســـتناد نتایـــج Briggs و همـــکاران راجع بـــه ترکیبات محیـــط اندام‌زایـــی، به محیط اندرســـون دارای هورمون‌هـــای ۲ip (۲ میلی گـــرم بر لیتر) و IAA (۰/۵ میلـــی گرم بـــر لیتر) انتقال داده شـــدند(۱۲) که مشـــاهده گردید توده‌های کالوســـی ســـبز شـــده و در آنهـــا کانون‌های ســـبز رنگ متراکمـــی که بعـــداً هرکدام به یک مریســـتم رویشـــی هوایی تمایـــز یافتند تشـــکیل گردید کـــه نتیجه‌ای اســـت از ســـنتز کلروفیل و شـــاخه‌زایی که در نتیجـــه هورمون‌های اکســـین و ســـیتوکینین القاء می‌شـــود. کال ســـبز رنگ هنگامی به محیط‌هـــای دارای IAA و ۲ip در غلظت‌های مختلف زیر کشـــت گردید نتایـــج مهمی حاصل گشـــت در محیط‌های بـــا غلظتهـــای ۰ و ۰/۵ و ۱ میلی‌گرم بـــر لیـــتر ۲ip کال ســـبز انتقال‌یافته به علت نبـــود یا کمبود سیتوکینین و فقدان اکســـین تمایز معنی‌داری آشکار نشد. در غلظـــت ۲ میلی گرم بر لیـــتر ۲ip و ۰/۲۵ میلـــی گرم بر لیتر IAA در محیـــط پایه اندرســـون به علت تناســـب هورمونی ســـیتوکینین و اکسین رشـــد مناسبی در کال ســـبز مشاهده گردیـــد. هرچه غلظـــت اکســـین بالاتر می‌رفت و نســـبت ســـیتوکینین به اکســـین کمتر می‌شـــد رشـــد کالوس ســـبز کمتر شـــده در عوض طـــول شـــاخه‌های تمایز یافته بیشـــتر می‌گردیـــد البتـــه در بالاتـــر از ۱ میلی‌گرم بر لیـــتر به علت برهـــم خوردن بیش از حد نســـبت اکســـین به ســـیتوکینین رشـــد زیتـــوده متوقف می‌گردیـــد. در محیط‌هـــای دارای ٤ میلـــی گرم بر لیـــتر ۲ip و غلظت‌های متغیر IAA بیشـــترین حجم زی‌تـــوده در غلظـــت ۰/۵ میلی گرم بر لیتر مشـــاهده گردیـــد. در غلظـــت ٤ میلی گرم بـــر لیتر ۲ipمناســـب‌ترین غلظـــت هورمونـــی در ایـــن سری از آزمایش‌ها مشـــاهده گردید که هم باعث بیشـــترین رشـــد زیتـــوده وتولید جوانه های نابجـــا در روی کالوس همراه با غلظـــت ۰/۵ میلی گرم بر لیتر IAA گردید وهم باعث بیشـــترین رشـــد طولی ســـاقه در غلظـــت ۱ میلی گرم بر لیـــتر IAA گردیـــد. در اینجا نیز هرچـــه غلظت IAA افزایش می‌یافت رشـــد توده ســـبز کمتر شـــده و افزایش طول شـــاخه‌های نابجا تا حـــد ۱ میلی گرم بر لیـــتر IAA بیشـــتر می‌گردید. نتایـــج فوق بـــا یافته های Eeckhat et al.,۲۰۱۰ همســـو میباشد(۱۳).

نتیجه گیری:

در ایـــن پژوهش امـــکان تولید و تکثیرگیاه ردودندرون با اســـتفاده از قطعات سرشـــاخه گیاهان مزرعه ای با روش کشـــت درون شیشـــه ای مورد بررســـی قـــرار گرفت ونهایتـــا منجر به تولیـــد ریز قلمه های زیـــادی با اســـتفاده از این روش شـــد که براحتی ســـازگار شـــده وتوانســـتند به گیاهان ســـالمی در محیط گلخانه تبدیل شوند.

تشکر و قدردانی

نویسنده از همه کسانی که در اجرای این پروژه یاری رسانده اند سپاسگزار است.

تعارض منافع

نویسندگان اعلام می کنند هیچ تعارض منافعی در انجام این مطالعه وجود نداشته است.

References

1- Blessington TM, Garvey EJ, Howell LM. Effects of application methods of controlled-release fertilizers on growth and quality of Rhododendron obtusum'Hinodegiri'grown in various media.1981, 16(5):676-677.

2- Pierik, RLM, In vitro culture of higher plants. Handbook. Martinus Nijhoff, Dordrecht.1987

3- Samyn G, De Schepper S, Van Bockstaele E. Adventitious shoot regeneration and appearance of sports in several azalea cultivars. Plant cell, tissue and organ culture. 2002, 70:223-227.

4- Chee R. The history of rhododendron micropropagation provides some tips for success.1985, 161(10):42-45

5- Eeckhaut T, Janssens K, De Keyser E, De Riek J. Micropropagation of rhododendron. Protocols for in vitro propagation of ornamental plants. 2010:141-52.

6- Blazich FA, Giles CG, Haemmerle CM. Micropropagation of Rhododendron chapmanii. Journal of Environmental Horticulture. 1986 ,4(1):26-29.

7- Iapichino G, Chen TH, Fuchigami LH. Plant regeneration from somatic tissue of Rhododendron laetum x aurigeranum. Plant cell, tissue and organ culture. 1991, 27:37-43.

8- Anderson WC. A revised tissue culture medium for shoot multiplication of rhododendron. Journal of the American Society for Horticultural Science. 1984,109(3):343-347.

9- Bhojwani SS, Razdan MK. Plant tissue culture: theory and practice. Elsevier; 1986

10- Douglas GC. Propagation of eight cultiv ars of Rhododendron in vitro using agar-solidified and liquid media and direct rooting of shoots in vivo. Scientia Horticulturae. 1984, 24(3-4):337-47.

11- Iapichino G, Chen TH. Genotypic effects on plant regeneration from leaf segments of rhododendron. Advances in Horticultural Science. 1995, 9(4):170-172.

12- Briggs BA, McCulloch SM, Edick LA. Micropropagation of azaleas using thidiazuron. InInternational Symposium on Vegetative Propagation of Woody Species 227. 1987, 17(3):330-333

10.17660/ActaHortic.1988.227.60

13- Eeckhaut T, Van Huylenbroeck J, De Schepper S, Van Labeke MC. Breeding for polyploidy in Belgian azalea (Rhododendron simsii hybrids). InXXII International Eucarpia Symposium, Section Ornamentals, Breeding for Beauty 714. 2006, 29(6) : 113-118.

10.17660/ActaHortic.2006.714.13