بررسی جداکشت‌های مختلف بر باززایی گیاه بگونیا *Begonia*

مریم سعادتی[1] و دکتر سید محمد مهدی حمدی[2] (نویسنده مسئول **mm_hamdi@asia.com**)

۱- دانشگاه آزاد اسلامی واحد گرمسار ۲- دانشگاه آزاد اسلامی واحد رودهن

چکیده

گیاه بگونیا (Begonia SPP_) از خانواده Begonia Ceae که در این تیره ۱۲۰۰ گونه جود دارد. گونه ای که در این پژوهش انجام شده از نوع بگونیای ریشه افشان و حالت بوته ای و از نوع همیشه گلدار است و در ۵ رقم (سفید، زرد، نارنجی، قرمز، هیبرید) برای دست یافتن بهترین تیمار موثر در باززایی در کشت بافت و بررسی تعداد گیاهچه های تولید شده انجام شد. بررسی میزان باززایی در کل گیاه، از ریز نمونه برگ، دمبرگ، ساقه و دمگل استفاده شد. پس از گندزدایی، استقرار ریز نمونه ها در محیط کشت موراشیگ و اسکوگ حاوی ترکیبات هورمونی مختلف انجام شد. بعد از انکوباسیون کشت ها در شرایط نوری و دمایی مناسب، صفات تعداد شاخساره، زمان باززایی در گیاهچه های باززا شده بررسی شد . نتایج تجزیه واریانس داده ها نشان داد که تیمارها از نظر این صفات با یکدیگر در سطح پنج درصد تفاوت معنی داری دارند. مقایسه میانگین ها نشان داد که بیشترین میزان باززایی، و تعداد گیاهچه مربوط به ریز نمونه برگ مناسب تر از دیگر ریز نمونه ها آزمایش شده است، ریز نمونه برگ با تولید بیش از ۵۰ گیاهچه در هر زیر نمونه و در زمانی کمتر از ۳۵ روز با گیاچه هایی باززایی شده با رشد طولی مناسب تر و تراکم بیشتر به عنوان بهترین ریز نمونه در این ارقام مشخص شد.

کلید واژه‌ها: بگونیا، جداکشت‌ها، باززایی

The evaluation of different explants in the regeneration of Begonia reiger plant

Saadati M. & Hamdi S. M. M.

Garmsar branch, Islamic Azad University, Garmsar, Iran
Roudehen branch, Islamic Azad University, Roudehen, Iran

Abstract

Bagonia spp belongs to the family of Begonicaceae in which there are 1200 species. Species under study is a fibrous-rooted, suffrutescens and always-in- bloom type which has 5 varieties (white, yellow, orange, red, and hybrid). It was evaluated in order to find the best effective treatment for the regeneration in tissue culture and to study the number of shoots generated. Micro samples of leaf, petiole, stem and peduncle were used to evaluate the regeneration of the whole plant. After disinfection, micro samples were placed in the Murashige and Skoog (MS) media containing different hormonal combination. Traits of number of shoots, regeneration time and the number and size of roots were evaluated in suitable lighting and thermal condition after incubation of culture. Analysis of variance results indicated that treatments are significantly different at 5% level with respect to these traits. Mean comparisons demonstrated that highest degeneration rate and number of shoots were associated with micro samples from the leaf. Leaf's micro samples were evaluated as the best sub sample with generating of 50 shoots in each sample and regeneration time period less than 35 days with regenerated shoots having more suitable length and higher density.

Keywords: Begonia, different explants, regeneration

مقدمه

گیاه بگونیا با نام علمی .Begonia spp از خانواده Begoniaceae می‌باشد، که در این تیره ۱۲۰۰ گونه وجود دارد.منشاء اصلی بگونیا[1] نقاط گرم و مرطوب استوایی است. در گیاهان به ندرت می‌توان جنسی را یافت که همانند بگونیاها از نظر شکل، رنگ، شکل بوته و رنگ گل دارای چنین تنوعی باشد. افزون بر این گونه‌ها، تعدادی دو رگه و رقم‌های جدید همواره به دلیل جهش و یا دورگه‌گیری حاصل شده‌اند. تمامی این گیاهان ویژگی‌های مشترکی نیز دارند. گل‌های نر و ماده جدا از هم روی یک پایه قرار دارند. تخمدان سه برچه‌ای در بخش زیرین گل قرار دارد. گل‌ها اغلب به صورت خوشه‌ای و دارای براکته هایی در بخش زیرین می‌باشند. براکته ها ممکن است چسبیده به بخش زیرین دم گل‌ها باشند.

ولاندر[2] در سال ۱۹۷۷ راندمان باززایی دمبرگ ۱۷ رقم بگونیا روی محیط کشت‌های مختلف با ترکیب هورمونی متفاوت بررسی کرد. در این آزمایش ثابت شد که راندمان تشکیل شاخساره و ریشه از دمبرگ ارقام به ترکیب تنظیم‌کننده‌های رشد، ترکیب محیط کشت، انتخاب رقم و تیمار گیاهان مادری وابسته بود.

کاسلز[3] و همکاران در سال ۱۹۸۷ واکنش دمبرگ شش رقم بگونیا رکس روی یک نوع محیط کشت با ترکیب متفاوتی از هورمون‌های بنزیل آمینوپیورین و نفتالین استیک اسید بررسی کردند. واکنش ارقام برای باززایی در غلظت‌های مختلف هورمونی متفاوت بود

رینگ[4] و نیچ در سال ۱۹۶۸ ریزنمونه برگ، دمبرگ و دمگل چند گونه و رقم بگونیا را روی محیط کشت موراشیگی و اسکوگ قرار دادند و گزارش کردند که وجود بنزیل آدنین، آدنین و ایندول استیک اسید برای تشکیل حداکثر تعداد شاخساره نابجا به ویژه روی دمگل و دمبرگ لازم است و جوانه‌های گل روی برگ و دمگل تشکیل ولی روی دمبرگ تشکیل نشد و گل‌ها همه از نوع نر بودند.

ناوال و همکاران (۲۰۰۱) یافتند تعداد شاخه‌های تولید شده در ریزنمونه برگ و دمبرگ بگونیای Tuber hybrida در محیط کشت حاوی BAP یا محیط کشت حاوی BAP به همراه NAA و یا TDZ به شدت کاهش می‌یابد.

ولاندر[5] در سال ۱۹۷۷ راندمان باززایی دمبرگ ۱۷ رقم بگونیا روی محیط کشت‌های مختلف با ترکیب هورمونی متفاوت بررسی کرد. در این آزمایش ثابت شد که راندمان تشکیل شاخساره و ریشه از دمبرگ ارقام به ترکیب تنظیم‌کننده‌های رشد، ترکیب محیط کشت، انتخاب رقم و تیمار گیاهان مادری وابسته بود.

سیموندز،[6] پیک[7] و همکاران در سال ۱۹۸۴ نتیجه گرفتند به عنوان منبعی برای تغذیه کربوهیدرات در محیط کشت با غلظت ۱/۵ تا ۴ درصد به کار بردند ولی به طور کلی در اغلب کشت‌ها با غلظت ۳٪ به کار می‌رود تاکایاما و همکاران در سال ۱۹۸۲ در یک آزمایش تمایزیابی در ۳۰ تا ۶۰ گرم در لیتر صورت گرفته و نشان دادند که ۹۰ گرم ساکاروز در لیتر مانع تمایزیابی می‌شود و غلظت بهینه برای تمایزیابی ریشه ۳۰ گرم در لیتر و غلظت بهینه برای تمایزیابی جوانه ۱۰ گرم در لیتر بود. در گزارش‌هایی دیگر، ۲۰ گرم در لیتر استفاده شده است (فونس بچ ۱۹۷۴ و میکلسن و سینک ۱۹۷۸)

میکلسن و سینک[8] ۱۹۷۸ در یک بررسی اثرات نفتالن استیک اسید به میزان صفر تا ۱۰ میلی گرم در لیتر و بنزیل آدنین به میزان صفر تا ۱ میلی گرم در لیتر در باززایی قلمه دمبرگ بگونیا مقایسه شد. نفتالن استیک اسید به میزان ۰/۱ و بنزیل آدنین از ۰/۱ تا ۱ میلی گرم در لیتر بعد از ۳ هفته باعث تشکیل شاخساره شد. در صورتی که بعد از ۵ هفته

---

1. Begonia
2. Welander, T
3. Cassels etal.
4. Ringe and Nitsch
5. Welander, T
6. Simmonds
7. Piek etal
8. Mikkelsen

شاخسار و ریشه تشکیل شد. اما در غلظت ۱۰ میلی گرم در لیتر نفتالن اسیتیک اسید، پینه و ریشه تشکیل شد.

مندی و همکاران (۲۰۰۹) از غلظت مختلف BA (۲ ، ۱ ، ۰/۵ ، ۰) میلی‌گرم بر لیتر به همراه NAA (۱ ، ۰/۵ ، ۰) میلی لیتر در محیط کشت MS استفاده کردند

دانگ تان نات و همکاران (۲۰۱۰) در پروتکل خود محیط کشت پایه MS حاوی ۰/۲ Mg/L TDZ[9] برای کشت لایه نازکی از بافت دمبرگ را پیشنهاد کردند.

مواد و روش

برای انجام این پژوهش آزمون‌های مختلف در قالب طرح کاملاً تصادفی (CRD) با ۵ تکرار طراحی شد. در ۵ رقم این گیاه زینتی، داده‌های به دست آمده با استفاده از نرم‌افزار آماری SPSS مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفتند.سایر داده‌ها بر اساس آزمون چند دامنه‌ای دانکن و در سطح ۵ درصد مقایسه شدند برای رسم نمودارها از نرم‌افزار excel استفاده شد

فاکتورهای مورد بررسی شامل بررسی اثرات هورمون‌های مختلف با غلظت‌های متفاوت و نیز جداکشت‌های مختلف از بافت‌های گیاهی گیاه گلدانی بگونیا بود که به طور جداگانه انجام شد.

جهت گندزدایی سطحی مواد گیاهی بگونیا تیمارهای ضد عفونی مختفی آزمایش شدند.در روش اول بافت های مورد نظر گیاه به مدت ۳۰ دقیقه در زیر آب جاری قرار گرفت سپس ماده گیاهی به مدت ۱ دقیقه در اکل ۷۰٪ جهت تأثیر بهتر مواد ضد عفونی‌کننده، غوطه‌ور گردید.چند قطره از ماده‌ی شوینده (مایع ظرف‌شویی) به غلظت ۱٪، جهت پائین آوردن تورژسانس سطحی، اضافه شد.پس از شستشوی مجدد با آب به مدت ۷ تا ۱۰ دقیقه در هیپوکلریت سدیم ۱/۵٪ (W/V) غوطه‌ور شدند. بافت در سه نوبت ۵ دقیقه‌ای در آب مقطر سترون شستشو گردید. روش دوم برای ضد عفونی ساقه و دمگل استفاده شد.

نمونه‌ها در ظروف جداگانه توسط چند قطره توئین ۲۰ (ریکا) به همراه آب جاری به مدت ۳۰ دقیقه شستشو داده شد.سپس توسط اتانول ۷۰ درصد به مدت چند ثانیه ضد عفونی و با آب مقطر یک بار شستشو داده شد. مقدار ۲۵۰ میلی گرم کلرید جیوه زیر هود شیمیایی در یک شیشه استریل به مقدار ۲۵۰cc آب مقطر حل شد. شیشه‌های حاوی نمونه‌های گیاهی را چندین بار تکان داده تا عمل ضد عفونی به خوبی صورت پذیرد.نمونه‌های گیاهی را بعد از گذشت ۵ دقیقه در زیر هود لامنیار از محلول خارج و درون شیشه استریل قرار داده شد. نمونه‌ها ۳ الی ۵ بار با آب مقطر استریل شستشو داده شدند تا عمل ضدعفونی کامل صورت پذیرد.

بعد از استریل کردن، برگ‌ها توسط اسکالپر استریل به قطعات ۰/۷×۰/۷ سانتی‌متر ،ریزنمونه‌های دمبرگ به اندازه ۰/۲ سانتی‌متر تقسیم و از قسمت برش خورده روی سطح محیط کشت قرار گرفتند،ریزنمونه‌های ساقه با رعایت قطب‌گرایی توسط اسکالپر استریل به قطعاتی به اندازه ۰/۳ سانتی‌متر ،ریزنمونه‌ها دمگل به قطعاتی به اندازه ۰/۲ سانتی‌متر تقسیم و از قسمتی که برش داده شده بود بر روی محیط کشت قرار گرفت. سپس ظروف کشت داده شده در دمای ۱ ± ۲۳ درجه سانتی‌گراد و شرایط ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی قرار داده شد.پس از ۳۰ روز صفات مورد نظر اندازه‌گیری شدند. در این آزمون به جزء میزان باززایی مستقیم از ریزنمونه‌ها، مدت زمان باززایی نیز مورد بررسی قرار گرفت.

محیط کشت پایه در این پژوهش محیط کشت موراشیک و اسکوک همراه با هورمون ۰/۲ میلی گرم در لیتر TDZ , ۰/۲ میلی گرم در لیتر NAA , ۰/۲ میلی گرم در لیتر BA , ۳۰ گرم ساکارز و مقدار ۷/۲ گرم آگار به محیط کشت اضافه گردید. پی. اچ (pH) نهایی ۵/۸۵ تنظیم گشت. محیط‌های کشت به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد و در فشار ۱/۲ بار اتوکلاو گردید.

[9] . Thidia Zuron

نتایج

۱- بررسی باززایی جداکشت های مختلف گیاه بگونیا reiger :

جهت ارزیابی باززایی جداکشت های مختلف و تعیین بهترین جداکشت برای تولید بیشترین باززایی در کوتاه ترین زمان ۴ تیمار مختلف شامل جداکشت های مختلف گیاه بگونیا که از بافت های برگ، دمبرگ، ساقه و دمگل در پنج رقم مختلف و چهار تکرار مورد بررسی قرار گرفت.

در این آزمایش بعد از قرار گرفتن ریز نمونه ها درون محیط کشت ms با غلظت هورمونی tdz۰.۲ برای جداکشت ساقه و دمگل و NAA ۰.۲و BAP۰.۲ و شرایط نوری و دمایی مناسب, بسیاری از ریز نمونه ها واکنش نشان دادند و در بسیاری از آنها باززایی مشاهده شد. (شکل۱)

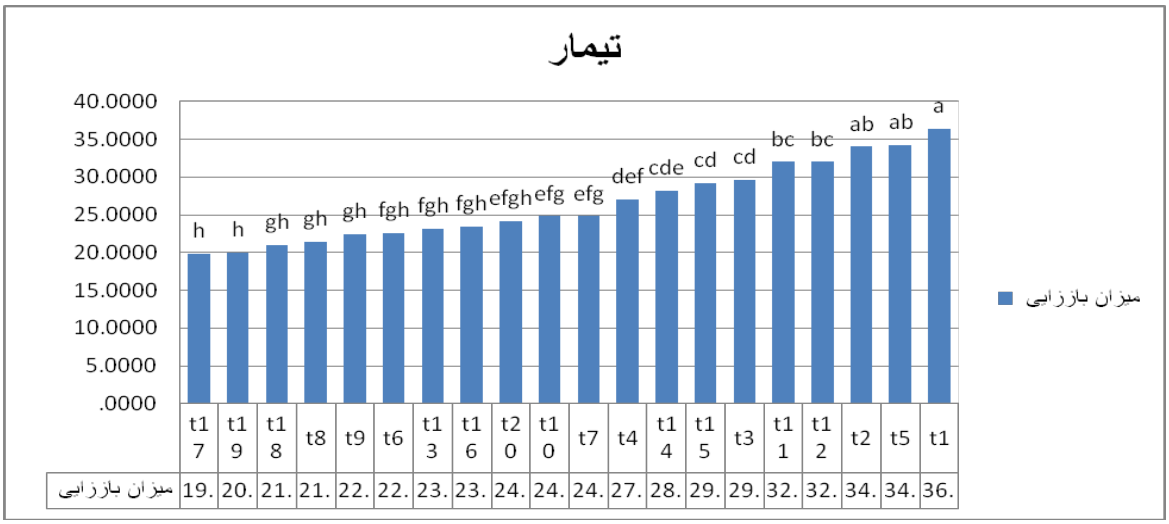
صفات تعداد گیاهچه های باززا شده و تعداد روز باززایی بررسی شد.

طبق جدول تجزیه واریانس (جدول۱)، بین ارقام مختلف و ریزنمونه ها و همچنین تیمارها در میزان باززایی اختلاف معنی دار مشاهده می‌شود.

لذا می توانیم نتیجه بگیریم که حداقل بین دو میانگین تفاوت معنی دار وجود دارد. برای بررسی این تفاوت از آزمون دانکن استفاده شد.

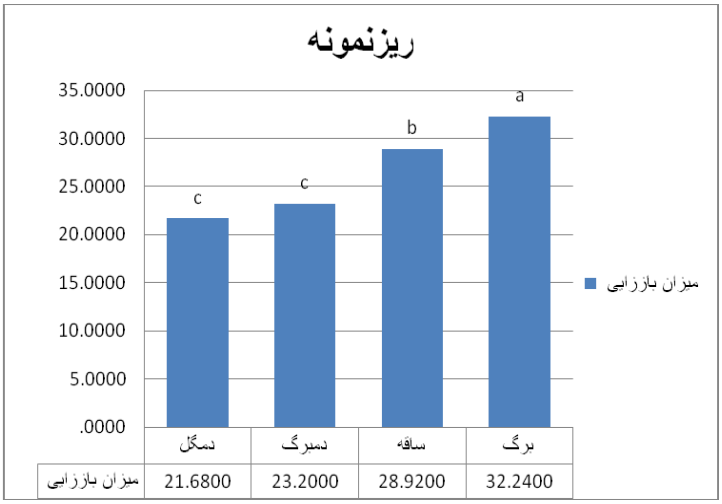
میزان باززایی

در بررسی کلی میان گیاهچه باززایی شده در تیمارهای مختلف ارقام مختلف گیاه بگونیا تفاوت معنی داری نشان داده شد. بهترین تیمار در میزان باززایی تیمار T1 (برگ با رنگ سفید) و کمترین میزان باززایی مربوط به تیمارهای T17 (دمگل با رنگ زرد) و T19 (دمگل با رنگ هیبرید) می‌باشد.(نمودار-۱)



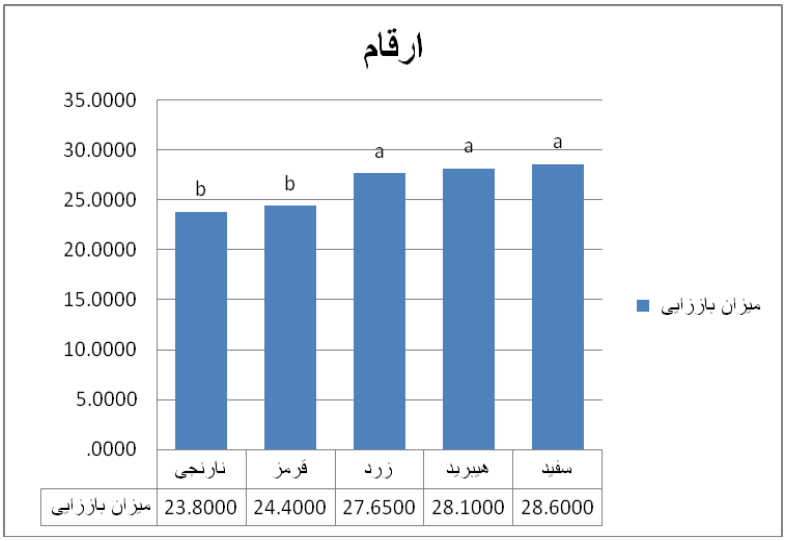
نمودار ۱- میانگین میزان باززایی در تیمارهای گیاه بگونیا

طبق نمودار (۲) در مقایسه بین ریزنمونه ها در میزان باززایی، ریز نمونه برگ مناسب ترین می‌باشد. در ریز نمونه برگ با میزان تولید ۳۵_۴۰ گیاهچه بالاترین میزان باززایی نشان داده شد. دمبرگ و دمگل کمترین باززایی را از خود نشان دادند.



نمودار ۲- میانگین میزان باززایی ریز نمونه های مختلف در رقم های گیاه بگونیا

در مقایسه جداگانه ارقام مختلف گیاه بگونیا(سفید- زرد- نارنجی- قرمز-هیبرید)نتایج بدست آمده در بررسی میانگین های تعداد گیاهچه باززا شده درآزمون دانکن به صورت نمودار ارائه شد (نمودار۴-۳). بهترین رقم در مورد میزان باززایی مربوط به سفید است. رنگ نارنجی با تعداد کمتری باززا شد.



نمودار۳- میانگین میزان باززایی در رقم های گیاه بگونیا

زمان باززایی

طبق جدول تجزیه واریانس در بررسی زمان باززایی بین همه متغیرها اختلاف معنی دار مشاهده شد.(جدول-۱)

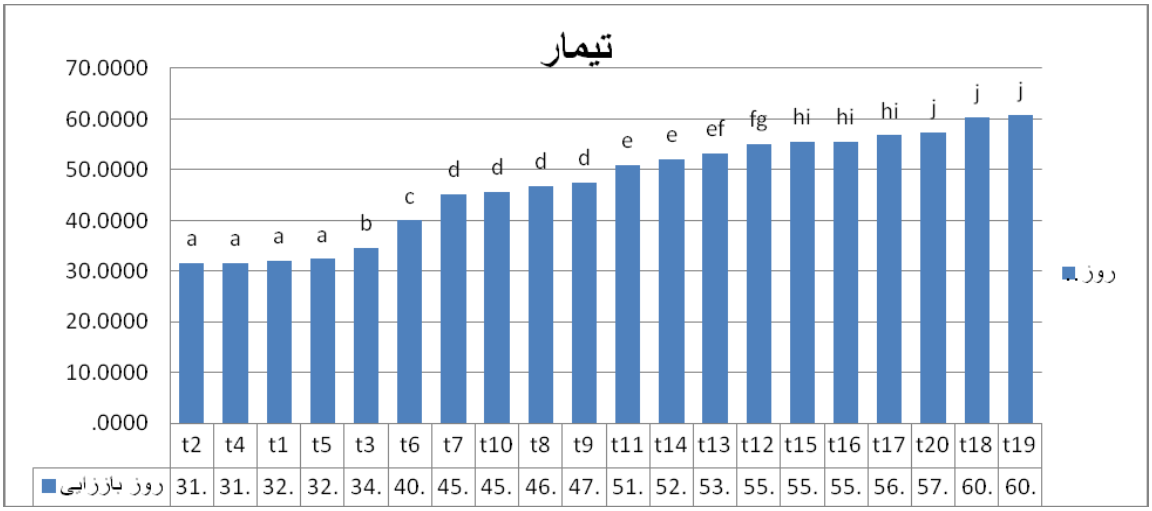
جدول -۱-جدول تجزیه واریانس آزمون ۱

منابع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات	
		باززایی	زمان بازایی
ریزنمونه	3	607.717**	3180.28**
ارقام	4	99.96**	48.8**
تیمار	12	23.533*	15.73**
خطا	80	9.84	2.68

* و ** به ترتیب علامت معنی دار بودن در سطح ۵ درصد و یک درصد است

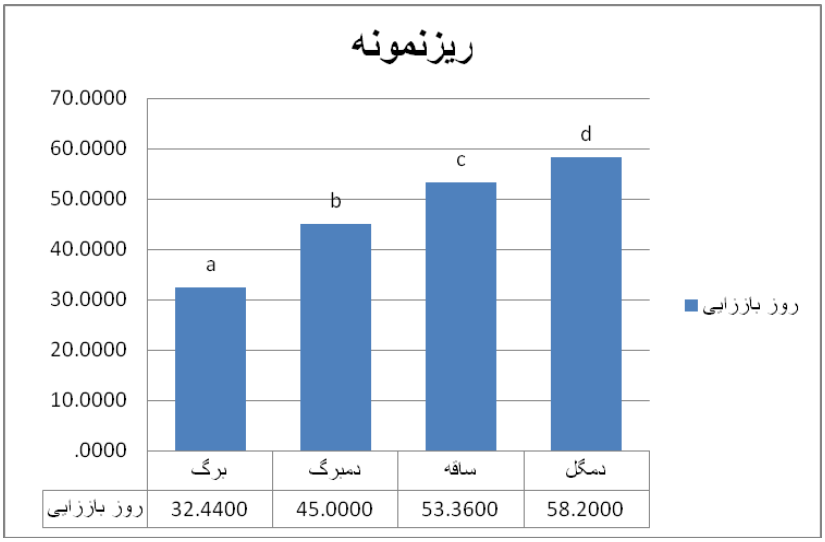
قابل ذکر است در صفت زمان باززایی هر چقدر میانگین کوچکتر باشد به عنوان تیمار مناسب قابل قبول است.

در زمان باززایی، بهترین تیمار مربوط به تیمارهای T1، T2، T4 و T5 به ترتیب (برگ با رنگ سفید، برگ با رنگ زردد، برگ با رنگ قرمز و برگ با رنگ هیبرید) می‌باشد که در کمترین زمان باززا شدند. و تیمار دمگل با رنگ های نارنجی و هیبرید بیشترین زمان را برای باززایی طی کردند.(نمودار-۴)



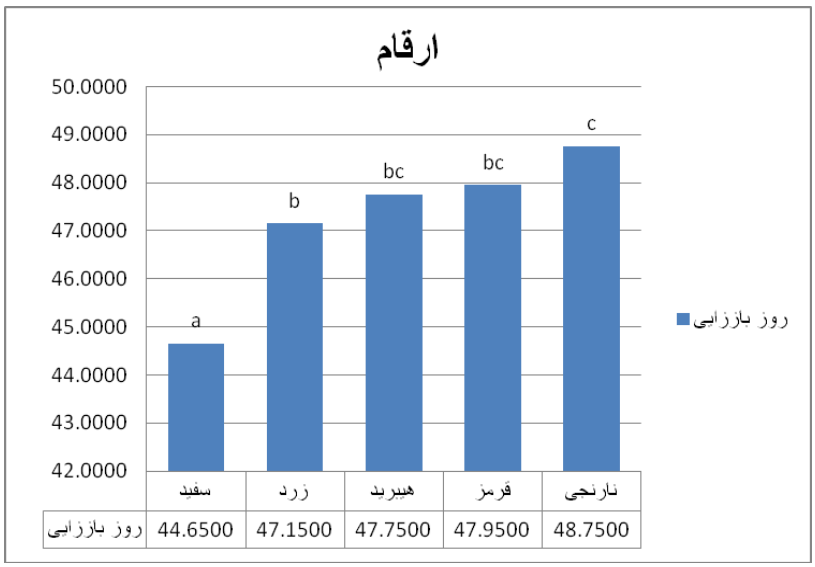
نمودار ٤- میانگین زمان باززایی در تیمارهای گیاه بگونیا

همچنین در زمان باززایی، بهترین ریزنمونه که در کمترین زمان تولید گیاهچه کرده است، مربوط به برگ است و بیشترین زمان مربوط به دمبرگ است. ریز نمونه برگ بین ۳۰-۳۵ روز باززا شد.(نمودار-۵)



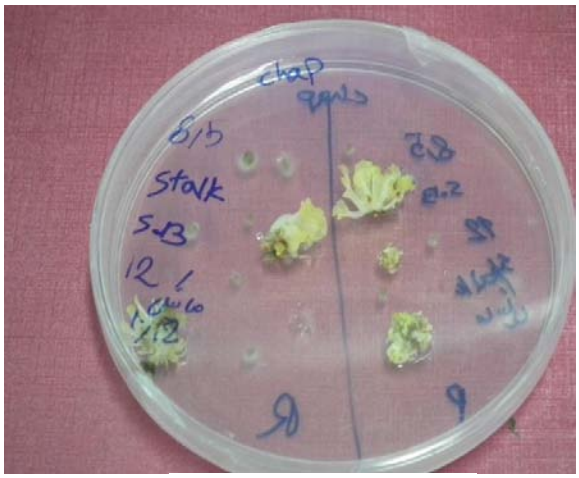
نمودار ٥- میانگین زمان باززایی ریز نمونه های مختلف در رقم های گیاه بگونیا

در مقایسه جداگانه ارقام مختلف گیاه بگونیا(سفید- زرد- نارنجی- قرمز-هیبرید)نتایج بدست آمده در بررسی میانگین های روز باززایی درآزمون دانکن به صورت نمودار ارائه شد (نمودار۶-۴). بهترین ارقام مربوط به سفید، زرد و هیبرید است. رنگ نارنجی و قرمز در دیرترین زمان باززا شد.

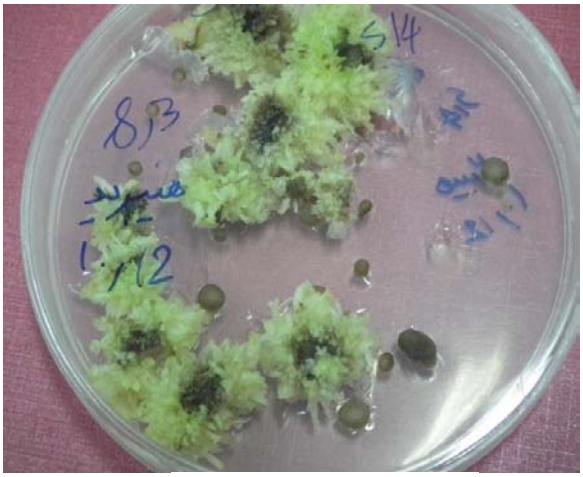


نمودار ٦- میانگین زمان باززایی در رقم های گیاه بگونیا

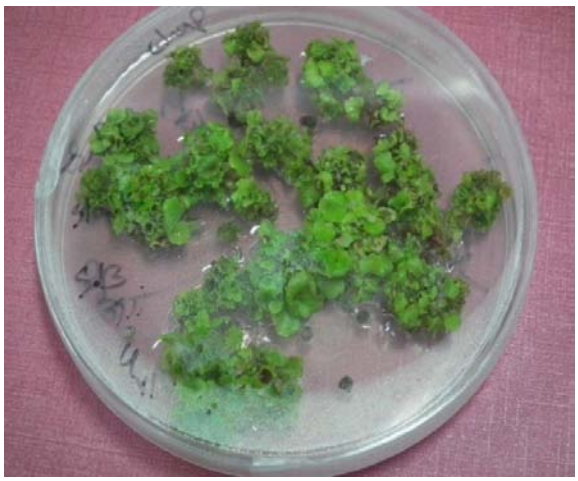
شکل(-۱)



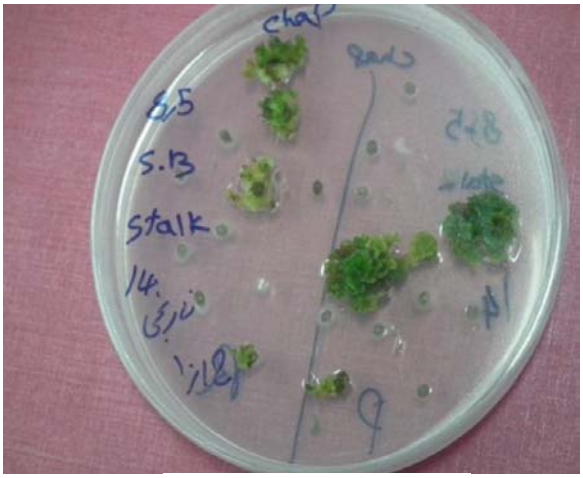
باززایی از دمگل



باززایی از ساقه



باززایی از برگ



باززایی از دمبرگ

٤-۲- آزمون ۲:

بحث

باززایی مستقیم از ریز نمونه های مختلف

در این آزمایش ۴ نوع ریز نمونه (برگ، دمبرگ، دمگل، ساقه) برای باززایی مستقیم انتخاب شد. ریز نمونه های برگ و دمبرگ با استفاده از هورمون TDZ با غلظت ۰/۲ میلی گرم بر لیتر و ریز نمونه ها دمگل و ساقه از هورمون های ۰/۲ میلی گرم بر لیتر نفتالین استیک اسید و ۰/۲ میلی گرم بر لیتر بنزینل آدنین در محیط کشت پایه MS، ۳۰ گرم در لیتر ساکاروز و ۷ گرم در لیتر ۱ گار تهیه شد.

و ریز نمونه ها با زمان های مختلف و تعداد گیاهچه باززایی شده متفاوت واکنش نشان دادند.

میزان باززایی, زمان باززایی و کیفیت گیاهچه ها در زیر نمونه برگ مناسب تر از دیگر ریز نمونه ها آزمایش شده است، ریز نمونه برگ با تولید بیش از ۵۰ گیاهچه در هر زیر نمونه و در زمانی کمتر از ۳۵ روز با گیاچه هایی باززایی شده با رشد طولی مناسب تر و تراکم بیشتر به عنوان بهترین ریز نمونه در این ارقام مشخص شد. باززایی مستقیم در ۳ ریز نمونه دیگر نیز به خوبی مشاهده شد اما به دلیل طولانی تر بودن زمان باززایی و از بین رفتن نمونه ها و کاهش کیفی گیاهچه ها و از نظر افزایش هزینه ها انتخاب نگردید. این پژوهش در رقم دیگر با استفاده از تکنیک کشت بافت توسط دانگ تان نات و همکاران در پروتکل در سال ۲۰۰۹ انجام شده که با این پژوهش مطابقت داشت.

منابع

1. Takayama, S. and M. misava 1982. Factores effecting for differentiation and growth in vitro and a mass – propagation scheme for begonia hiemalis fotsch sci. Hortic. 16: 65-75.
2. Simmonds, K. 1984j. Induction, growth and direct rooting of odventitious shoots of begonia hiemalis fotsch plant cell, tissue and organ culture 3: 283-289.
3. Mikkelsen, E.p. and k.c.sink. 1978. In vitro propagation of rieger Elatior begonaias. Hortscienox 13: 242-244.
4. Fonnersbech, M. 1974a. Temperatare effects on shoot and roof development from begonia chemimantha Evexett petiole seyments grown in vitro. Physiol. Plant. 32: 282-286.
5. Simmonds, K. 1984j. Induction, growth and direct rooting of odventitious shoots of begonia hiemalis fotsch plant cell, tissue and organ culture 3: 283-289.
6. Fonnesbech, M. 1974b. The influenc of NAA, BA and tem peratare on shoot and root development from begonia cheimatha evcerett petiole. Segments grown in vitro physiol. Plant. 32:49-54.
7. Duong Tan Nhut, Nguyen Thanh Hai, and Mai xuan phan. 2009. Ahighly efficient protocol for micropropagation of begonia tuberous – proto cols for in vitro propagation of ornamental plants, methods in molecular biology.
8. Cassels, A.C. and f.n. morish 1987. Genetic, antogenetic and physiological factors and the development of a broad – spectrum medium for Begonia rex putz.caltivars. sci. Hortic. 31: 295-302.
9. Peak, D.E. and B. camming 1984. In vitro propagatior of begonia tubexhybrida voss from leaf sections. Hortscience. 19:395-397.