فصلنامه (علمی – پژوهشی)

زیست شناسی تکوینی

سال سیزدهم، شماره ۳، تابستان ۱۴۰۰ ص. ۶۶-۵۵

مقاله پژوهشی

باززایی تمشک سیاه بیخار رقم مرتون از جوانه جانبی در محیط کشت بافت تحت تاثیر هورمون، سیلسیک اسید، ساکارز و زغال فعال

عباسعلی دهپور جویباری[۱*]، سعید سلطانی[۱]، رویا بیشه کلایی[۱]، کامران قاسمی[۳]، زهرا رجب زاده[۲]

[۱] گروه زیست شناسی دانشگاه آزاد اسلامی واحد قائمشهر

[۲] گروه زیست شناسی دانشگاه آزاد اسلامی واحد قائمشهر

[۳] گروه باغبانی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری

[*] (نویسنده مسئول مکاتبات): dehpour@gmail.com

تاریخ دریافت: آذر ۱۳۹۹ تاریخ پذیرش: اسفند ۱۳۹۹

چکیده

هدف از این تحقیق بررسی تاثیر تنظیم کننده‌های رشد گیاهی میزان سیلیس، ساکارز و زغال فعال بر باززایی و تکثیر درون شیشه گیاه تمشک بیخار رقم مرتون می‌باشد. جوانه جانبی در محیط ۱/۲ موراشیک و اسکوگ حاوی ۰/۱ درصد زغال فعال کشت گردید و پس از سه هفته شاخه جدید حاصل از کشت جوانه برای اعمال تیمارها بدست آمد.جوانه‌های جدید در محیط MS حاوی غلظت‌های متفاوت هورمون بنزیل آدنین، ایندول بوتیریک اسید و نفتالین استیک اسید جهت باززایی شاخه کشت شدند. بهترین تیمار شاخه‌زایی تمشک در محیط‌کشت MS حاوی ۱/۵ میلی‌گرم بر لیتر بنزیل آدنین به همراه ۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر IBA بدست آمد. همچنین شاخه‌های باززایی شده در محیط حاوی ۰/۲، ۰/۵، ۱ و ۲ میلی‌گرم بر لیتر هورمون NAA و IBA جهت ریشه‌زایی کشت شدند. پس از تعیین بهترین تیمار ریشه زایی از نظر میزان هورمون، شاخه‌ها برای بهبود ریشه‌زایی در محیط‌های مختلف نظیر غلظت‌های متفاوت زغال فعال (۰/۰۱، ۰/۰۲، ۰/۰۵، ۰/۱ و ۰/۲ درصد)، سیلیسیک اسید در غلظت‌های (۰، ۱، ۵، ۱۰ و ۲۰ میلی‌گرم بر لیتر) و همچنین ساکارز در غلظت‌های (۱، ۲، ۳، ۴، ۵ درصد) منتقل شدند. ساکارز در غلظت ۴ درصد موجب افزایش طول ریشه، وزن ریشه و میزان کلروفیل برگ شد. اضافه کردن زغال فعال به محیط‌کشت موجب افزایش طول ریشه و ساقه در محیط‌کشت گردید. افزودن سیلیسیک اسید موجب کاهش تعداد شاخه‌های باززایی شده نسبت به محیط شاهد شد اما با افزایش غلظت تا ۵ میلی‌گرم بر لیتر طول شاخه افزایش یافت. استفاده از سیلیسیک اسید در غلظت ۱ میلی‌گرم بر لیتر موجب افزایش طول ریشه و در غلظت ۵ میلی گرم بر لیتر موجب افزایش وزن ریشه نسب به شاهد گردید.

کلیدواژه‌ها: تمشک بی‌خار، هورمون، سیلسیک اسید، شاخه‌زایی، ریشه‌زایی.

مقدمه

تمشک سیاه با نام علمی *Rubus fruticosus* و نام انگلیسی Blackberry یکی از گیاهان خانواده Rosaceae، حاوی ۱۲ زیرجنس[1] و تعداد زیادی گونه می‌باشد[۱]. تمشک گیاهی است دوساله که در ایران دارای هشت گونه گیاه علفی و درختچه‌ای و غالباً تیغ دار با نام عمومی تمشک است و عمدتاً در مناطق جنگلی و غیر جنگلی شمال کشور در استان‌های گیلان، مازندران و گلستان می‌روید (2). میوه‌های تمشک، خوراکی است و به دلیل آنتی اکسیدان بالا مصرف آن بسیار مفید است. تمشک سیاه دارای ایزوستریک و مالیک اسید، قند طبیعی، پکتین، مونوگیلیکوزید سیانیدین، تانن (که به مقدار زیاد در پوست ریشه و برگ‌ها یافت می‌شود) آلکالوئیدها، فلاونوئیدها، اسید اسکوربیک، آهن،کربوهیدرات، سدیم، منیزیم، ویتامین A و C است[۳].

تولید تمشک سیاه در پانزده تا بیست سال گذشته توسعه یافته است و نیاز به تکثیر ارقام برتر با استفاده از مواد گیاهی سالم و گواهی‌شده به‌منظور تولید تجاری و حداکثری، یکی از نکات ضروری و اولیه در احداث باغ تمشک است [۴]. روش‌های معمول تکثیر غیرجنسی در تمشک شامل خوابانیدن، قلمهٔ چوب نرم و قلمهٔ ریشه می‌باشد. در ایران نهالستان‌ها، به‌طور عمده با استفاده از روش افکندن انتهایی، اقدام به تکثیر می‌کنند که سرعت پایین این روش تکثیر و انتقال آلودگی‌های قارچی و ویروسی از معایب این روش تکثیر می‌باشد [۵].

کشت بافت، جایگزین مهمی برای شیوه‌های مرسوم تکثیر گیاه می‌باشد. این تکثیر، فرآوری گیاهان را از بخش‌های کوچک گیاه، در بر می‌گیرد. (برای مثال: جوانه‌ها، گره‌ها، قطعات برگ، قطعات ریشه، و غیره). کشت بافت گیاه تمشک که با استفاده از جوانه انتهایی و جوانه جانبی انجام می‌شود، ویروس‌ها را حذف کرده و تولید انبوه گیاهان کلون یا شبیه به مادری را ممکن می‌سازد. تولید گیاهان یکسان و سالم در مدت زمان نسبتا کوتاه در فضای کوچک بدون محدودیت فصل تکثیر و همچنین بازده بالای میوه‌ها ازلحاظ وزنی و فنوتیپی از مزایای کشت بافت گیاه تمشک است [۶]. به همین جهت افزایش کیفیت گیاهان حاصل از کشت بافت روی میزان عملکرد گیاهان تولید شده و همچنین مقاومت نهال‌ها به شرایط تنش‌زای محیط مزرعه موثر خواهند بود. فاکتورهای زیادی بر روی میزان تکثیر و همچنین کیفیت نهال‌های حاصل از کشت بافت موثرند که شامل تنظیم کننده‌های رشد گیاهی، عناصر معدنی محیط کشت، شیوه تکثیر مناسب، شرایط فیزیکی اتاقک رشد و غیره می‌باشند. براساس گزارش‌های پیشین محیط‌کشت موراشیک و اسکوگ (MS) بیشترین کاربرد را در کشت بافت گیاهان جنس Rubus دارد [۷]. ترکیب هورمونی برای تکثیر ریزنمونه نوک شاخه در جنس Rubus ۱ تا ۲ میلی‌گرم بر لیتر بنزیل آدنین (BA)، ۰/۱ تا ۱ میلی‌گرم بر لیتر ایندول بوتیریک اسید (IBA) یا ۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر نفتالین استیک اسید (NAA) و ۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر اسید جیبرلیک (GA3) بوده است [۸]. در پرآوری ارقام مختلف تمشک سیاه از جوانه‌های موجود در شاخه استفاده گردیده است. بالاترین میزان تکثیر در تمشک سیاه رقم Cacanska در غلظت‌های هورمونی ۱ میلی‌گرم بر لیتر BA و ۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر IBA و ۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر GA3 بدست آمد. بالاترین طول شاخه در غلظت‌های ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر BA همراه با ۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر IBA و ۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر GA3 تولید شد. برای ریشه‌دهی از محیط کشت MSتغییر یافته (کاهش نمک‌های معدنی به نصف میزان مذکور بدون تغییر در ترکیبات ارگانیک) همراه با ۱ میلی‌گرم بر لیتر IBA، ۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر GA3 و ۱ گرم بر لیتر زغال فعال استفاده گردید [۹].

سیلیسیوم یک شبه فلز چهارظرفیتی و دومین عنصر فراوان بعد از اکسیژن در خاک است که تقریباً ۲۸ درصد از پوسته خارجی زمین را شامل می‌شود. با این وجود، بیش‌تر منابع سیلیسیوم در خاک به‌صورت آلومینوسیلیکات‌های متبلور است که نامحلول و به‌طور مستقیم قابل‌استفاده برای گیاه نیست [۱۰]. سیلیسیوم برای گیاهان تیره گندم، جگن و دم اسب به عنوان یك عنصر ضروری شناخته شده است . در حالی که این عنصر برای دولپه‌ای‌ها لازم نیست. این عنصر

[1] Subgenera

می‌تواند باعث افزایش تولید و کیفیت محصول، کاهش تبخیر و تعرق، افزایش مقاومت به تنش شوری، خشکی و سمیت فلزات سنگین، افزایش تحریك تولید برخی آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان و کاهش حساسیت به بعضی بیماری‌های قارچی شود [۱۱]. نتایج برخی پژوهش‌ها نشان می‌دهد که سیلیسیم در گیاهان یك عامل فعال کننده است. در واقع این عنصر ممکن است به عنوان علامتی برای فعال کردن پاسخ‌های دفاعی در برابر بیماری‌های گیاهی عمل کند. افزایش فعالیت آنزیم کیتیناز توسط سیلیسیوم به اثبات رسیده است. سیلیسیم هم چنین فعال شدن آنزیم‌های پراکسیداز و پلی‌فنل اکسیداز در حضور عوامل بیماریزای قارچی را تسریع می‌کند [۱۲]. همچنین کاربرد سیلیسیوم محلول جهت تولید غلظت‌های بالاتر آنزیم ریبولوز بیوفسفات کربوکسیلاز در برگ لازم است. این آنزیم سوخت و ساز دی اکسید کربن را تنظیم کرده و در نتیجه کارایی تثبیت دی اکسید کربن توسط گیاهان را افزایش می‌دهد و در نهایت منجر به بهبود فتوسنتز در گیاه می‌شود [۶]. تأثیر سیلیسیم بر عملکرد گیاه ممکن است به دلیل رسوب آن در پهنای برگ، افزایش استحکام برگ‌ها و نیز افزایش غلظت کلروفیل در واحد سطح برگ باشد که از این طریق توانایی گیاه برای استفاده مؤثر از نور را بالا می‌برد [۱۳].

سیلیسیوم با ته نشین شدن در دیواره سلولی آوندهای چوبی از فرو ریختن آن‌ها در شرایط تعرق زیاد جلوگیری می‌کند و با استحکام ساقه موجب کاهش خوابیدگی بوته می‌شود [۱۴]. در مطالعه‌ای آمده است، مصرف سیلیسیوم باعث افزایش ارتفاع گیاه، طول خوشه، طول میانگره و گشتاور خمشی میانگره سوم، سلولز، همی‌سلولز و لیگنین شده است [۱۵]. نتایج تحقیقات صورت گرفته در محیط کشت بافت نشان داد که سیلیس افزایش رشد کالوس، درصد باززایی، القا ریشه و جنین‌زایی رویشی شده است. سیلیسیوم در محیط درون شیشه باعث افزایش متابولیت‌های ثانویه مانند ترکیبات فنلی، آنتوسیانین، کیتیناز، گلوکوناز، تغییر سنتز هورمون‌های درونی گیاه و همچنین افزایش جذب عناصر موجود در کشت، کشش سطحی سلول، میزان رطوبت نسبی، پایداری ساختار سلول‌های نگهبان روزنه و کاهش جذب فلزات سنگین می‌شود. اسلام و همکاران (۲۰۰۵) نتیجه گرفتند که استفاده از سیلیکات پتاسیم در محیط‌کشت بافت میزان القا کالوس و همچنین باززایی کالوس‌های تشکیل شده در گیاه برنج را افزایش داده است [۱۶]. استفاده از سیلیس در غلظت ۵ میلی‌گرم بر لیتر در گیاه کاتالیا *Calathea zebrina* موجب افزایش میزان باززایی شاخه، تعداد ریشه و همچنین افزایش سطح برگ گیاهان حاصل از ریز نمونه شد [۱۷]. در یک مطالعه بررسی اثر سیلیسیوم بر روی افزایش تحمل شوری توسط تغییر آنزیم آنتی‌اکسیدان درگیاه *Ajuga multiflora Bunge* مورد بررسی قرار گرفت. نتایج به دست‌آمده نشان داد بعد از اعمال تنش شوری استفاده از سیلیکون موجب افزایش درصد شاخه‌های باززایی شده گردید. در محیط حاوی NaCl افزودن سیلیس به محیط‌کشت به طور معنی‌داری، سوپراکسیددیسموتاز SOD، پراکسیداز POD، آسکوربات پراکسیداز APX و فعالیت کاتالاز CAT در جوانه‌های ساقه‌ی بازسازی شده در مقایسه با شاهد را افزایش داد [۱۸].

در بررسی دیگری اثر نانو سیلیس بر پرآوری و بهبود برخی صفات رشد سیب رقم گالا در شرایط درون شیشه‌ای در غلظت‌های ۲۵ تا ۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج حاصل از این آزمایش نشان داد که با کاربرد نانو سیلیس وزن‌تر، وزن خشك، طول شاخه، تعداد شاخساره، تعداد گره، طول میان گره و شاخص کلروفیل در نمونه‌های حاوی نانوسیلیس افزایش یافت، که بیشترین افزایش‌ها در غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر مشاهده شد [۱۹]. براگا و همکاران (۲۰۰۹) منابع متفاوت تامین‌کننده‌ی سیلیس مانند سیلیکات پتاسیم، سیلیکات سدیم و سیلیکات کلسیم را روی باززایی گیاه توت فرنگی مورد مطالعه قرار دادند و نشان دادند که سیلیکات سدیم در غلظت ۱ گرم بر لیتر بهترین منبع برای توت فرنگی جهت افزایش وزن تر و خشک شاخه‌ها باززای شده در محیط کشت موراشیک و اسکوگ بوده است [۲۰].

هدف از این تحقیق، بررسی تاثیر غلظت‌های تنظیم کننده‌های رشد، سیلیسیوم، میزان قند و زغال فعال بر تکثیر درون شیشه گیاه تمشک بیخار رقم مرتون می‌باشد.

مواد و روش‌ها

تهیه ریز نمونه گیاهی

جهت کشت ریز نمونه گیاهی، رقم بیخار مرتون از مزرعه تجاری واقع در شهرستان ساری انتخاب گردید و سرشاخه‌های جوان و سالم گیاه نمونه برداری شده و به محیط آزمایشگاه منتقل گردید. ابتدا سرشاخه‌ها به قطعات ۲-۳ سانتی‌متر حاوی جوانه جانبی تقسیم شده و بمدت ۳۰ دقیقه در زیر شیر آب قرار گرفتند. سپس جهت ضدعفونی بافت جوانه جانبی در زیر هود لامینار توسط الکل ۷۰ درصد بمدت ۱ دقیقه و محلول هیپوکلریت ۱/۵ درصد حاوی ۳ قطره توییین ۲۰ بمدت ۲۳ دقیقه استریل شده و پس از آن سه مرتبه بوسیله آب مقطر استریل شستشو صورت گرفت. در نهایت ریز نمونه‌ها حاوی تک جوانه در قطعات ۱ سانتی متر در محیط کشت 1/2 MS حاوی ۰/۱ درصد زغال فعال جهت جلوگیری از فنله شدن گیاه کشت شدند.

تاثیر تنظیم کننده‌های رشد گیاهی بر شاخه زایی

۳ هفته پس از کشت جوانه‌های جانبی در محیط 1/2 MS جوانه‌ها فعال شده و شاخه جدید حاوی جوانه جانبی سالم تشکیل شد. به منظور بررسی باززایی تمشک، تک جوانه‌ها در محیط‌کشت MS حاوی غلظت‌های مختلف تنظیم کننده‌های رشد گیاهی کشت شدند. برای دستیابی به بهترین محیط‌کشت باززایی شاخه هورمون‌های سیتوکنین (بنزیل آدنین (BA) و کینتین (KIN)) در غلظت‌های (۰/۲، ۰/۵، ۱، ۱/۵ و ۲ میلی‌گرم بر لیتر) در ترکیب با هورمون ایندول بوتیریک اسید (IBA) در غلظت‌های ۰/۱ و ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر کشت شده و پس از ۶ هفته صفات درصد باززایی، تعداد شاخه‌ها در ریزنمونه و طول شاخه مورد بررسی قرار گرفت.

تاثیر تنظیم کننده‌های رشد گیاهی، زغال فعال و ساکارز بر ریشه زایی شاخه‌های تمشک

گیاهان حاصل از بهترین تیمار شاخه‌زایی تمشک انتخاب شده و به محیط‌کشت 1/2 MS حاوی غلظت‌های مختلف هورمون‌های اکسین نفتالین استیک اسید NAA و ایندول بوتیریک اسیدIBA حاوی غلظت‌های ۰/۲، ۰/۵، ۱، ۲ میلی‌گرم بر لیتر از کشت شدند. در نهایت ۶ هفته پس از کشت صفات درصد ریشه‌زایی، طول ریشه، طول شاخه، وزن ریشه و وزن ساقه اندازه گیری شد.

پس از تعیین بهترین غلظت تنظیم کننده رشد گیاهی، زغال فعال در غلظت‌های متفاوت (۰/۰۱، ۰/۰۲، ۰/۰۵، ۰/۱، ۰/۲ درصد) به محیط‌کشت اضافه شده تا بهترین غلظت جهت تاثیر بر ریشه‌زایی شاخه‌های تولید شده مورد بررسی قرار گیرد. ۶ هفته پس از کشت در غلظت‌های مورد نظر صفات درصد ریشه زایی، طول ریشه، طول ساقه، وزن ریشه، وزن ساقه، میزان کلروفیل، کاروتنوئید و قند کل برگ مورد بررسی قرار گرفت.

ساکارز در غلظت‌های مختلف (۱، ۲، ۳، ۴، ۵ درصد) به محیط کشت اضافه شده تا بهترین غلظت جهت تاثیر بر ریشه زایی شاخه‌های تولید شده مورد بررسی قرار گیرد. ۶ هفته پس از کشت در غلظت‌های مورد نظر صفات درصد ریشه زایی، طول ریشه، طول ساقه، وزن ریشه، وزن ساقه، میزان کلروفیل، کاروتنوئید و قند کل برگ مورد بررسی قرار گرفت.

اعمال تیمار سیلیس بر باززایی شاخه و ریشه در محیط کشت بافت

ماده سیلیسیک اسید ($Sio_2.xH_20$) از شرکت مرک آلمان خریداری شد. محلول استوک پایه سلیسیک اسید در غلظت ۳۰۰ میلی‌گرم در لیتر بدین صورت تهیه گردید. ابتدا مقدار مورد نظر در پنج سی سی محلول سود ۵۰ درصد اضافه شده و روی هات پلیت در دمای ۱۵۰ سانتی‌گراد قرار گرفت. سپس ۲ سی سی محلول آب اکسیژنه اضافه شده و ده دقیقه در این حالت قرار داده شد تا حل شود و در نهایت با آب مقطر به حجم مورد نظر رسانده شد. از روی محلول استوک غلظت‌های (۰، ۱، ۵، ۱۰، ۲۰ میلی‌گرم بر لیتر سیلیس خالص (Si) به محیط کشت قبل از اتوکلاو کردن در دو مرحله شاخه‌زایی و ریشه‌زایی اضافه گردید تا تاثیر سیلیس بر روی شاخه‌زایی و ریشه‌زایی تمشک مورد ارزیابی قرار گیرد.

همه ترکیبات محیط کشت قبل از انجام اتوکلاو به محیط کشت پایه MS اضافه گردید. pH محیط کشت با استفاده از محلول HCl و NaOH نیم نرمال بین محدوده ۵/۶ - ۵/۸ تنظیم گردید. دمای اتاق کشت بین ۲۴ - ۲۶ درجه سانتی گراد تنظیم شده و شیشه‌های کشت با استفاده از لامپ فلورسنت سفید و شدت نور ۲۵۰۰ لوکس نگهداری شدند.

اندازه‌گیری صفات رویشی نظیر طول ریشه و ساقه با استفاده از کاغذ شطرنجی میلی‌متری صورت گرفت. همچنین برای اندازه‌گیری کلروفیل یک گرم از برگ تمشک خرد شده و در ۲۰ میلی‌لیتر استون ۸۰ درصد در هاون چینی کوبیده شد تا کلروفیل برگ استخراج گردد. سپس از کاغذ صافی واتمن شماره ۲ عبور داده شده تا صاف گردد و در نهایت در سانتریوفیوژ با دور ۵۰۰۰ دور در دقیقه بمدت ۵ دقیقه قرار گرفت. جهت تعیین مقدار رنگیزه‌ها شده با استفاده از دستگاه طیف سنج نور مرئی (اسپکتروفتومتر) در طول موج‌های ۴۸۰، ۶۶۳،۶۴۵ میزان جذب محلول قرائت شد [۲۱].

اندازه‌گیری قند کل نیز با استفاده از ماده آنترون و روش مک کردی و همکاران (۱۹۵۰) صورت گرفت [۲۲]. بدین صورت که ۴۰ میلی‌گرم از بافت گیاهی در ۵ سی سی اتانول ۸۰ درصد در دمایی ۷۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شده و در سانتریوفیوژ با دور ۱۰۰۰ دور در دقیقه بمدت ۱۵ دقیقه قرار داده شد تا محلول قندی بدست آید. برای استخراج حداکثر قند موجود در بافت این مرحله ۴ بار دیگر نیز تکرار شد. جهت تعیین میزان قند کل ۲۰۰ میکرولیتر از محلول قندی با ۳ سی سی محلول آنترون تهیه شده ترکیب شده و بمدت ۲۰ دقیقه در حمام آب گرم در دمایی ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. میزان جذب محلول در نهایت با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر Unico2100 در طول موج ۶۲۰ نانومتر قرائت گردید.

طرح آزمایشی و آنالیز آماری

در بخش باززایی آزمایش به صورت فاکتوریل بر پایه طرح کاملا تصادفی با دو فاکتور غلظت‌های مختلف هورمون بنزیل آدنین (شامل ۵ سطح ۰/۲،۰/۵،۱،۱/۵،۲) و ایندول بوتیریک اسید (شامل ۲ سطح ۰/۱ و ۰/۵) بر روی شاخه‌زایی و در بخش ریشه‌زایی به صورت طرح کاملا تصادفی با دو هورمون اکسین (IBA در ۵ سطح ۰/۲، ۰/۵ ، ۱، ۱/۵، ۲) و (NAA در ۵ سطح ۰/۲، ۰/۵، ۱، ۱/۵، ۲) در مجموع ۱۰ تیمار با ۱۰ تیمار با سه تکرار و هر تکرار شامل ۴ریزنمونه انجام گرفت. در بخش مربوط به اثر سیلیس بر شاخه زایی و ریشه زایی تمشک نیز از طرح کاملا تصادفی استفاده شد. به منظور تجزیه و تحلیل داده‌ها از نرم‌افزار SAS نسخه ۹/۱ استفاده گردید و مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون حداقل اختلاف معنی‌دار (LSD) در سطح احتمال ۵ درصد انجام شد.

نتایج و بحث

همان طور که گفتیم تولید تمشک سیاه به دلیل داشتن مواد مغذی در پانزده تا بیست سال گذشته توسعه یافته و نیاز به تکثیر ارقام برتر با استفاده از مواد گیاهی سالم به‌منظور تولید تجاری و حداکثری، یکی از نکات ضروری و اولیه در احداث باغ تمشک است [۴]. روش‌های معمول تکثیر غیرجنسی در تمشک به دلیل سرعت پایین تکثیر و انتقال آلودگی‌های قارچی و ویروسی از معایب این روش تکثیر می‌باشد [۵]. به همین دلیل کشت سلول وبافت به دلیل حذف ویروس امکان تولید انبوه گیاهان کلون یا شبیه به مادری را فراهم کرده است. تولید گیاهان یکسان و سالم در مدت زمان نسبتا کوتاه در فضای کوچک بدون محدودیت فصل تکثیر و همچنین بازده بالای میوه‌ها ازلحاظ وزنی و فنوتیپی از مزایای کشت بافت گیاه تمشک می‌باشد [۲۳]. با افزایش کیفیت گیاهان حاصل از کشت بافت به کمک تنظیم کننده‌های رشد گیاهی، عناصر معدنی محیط کشت، شیوه تکثیر مناسب، شرایط فیزیکی اتاقک رشد و غیره می‌توان روی میزان عملکرد گیاهان تولید شده و همچنین مقاومت نهال‌ها به شرایط تنش زای محیط مزرعه موثر واقع شد.

بهینه سازی هورمون‌ها در محیط شاخه زایی

اولین مرحله در فرایند بهینه سازی محیط‌کشت بافت، یافتن مقدار و نوع هورمون در محیط شاخه‌زایی می‌باشد.

همانطور که جدول شماره ۱ نشان می‌دهد، ترکیب تیماری بنزیل آدنین ۱/۵ میلی‌گرم بر لیتر به همراه ایندول بوتیریک اسید ۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر بیشترین تعداد شاخساره را تولید نمود که به طور معنی داری بیشتر از تمامی تیمارهای دیگر بود (جدول ۱). البته این تیمار از نظر میانگین طول شاخساره وضعیت متوسطی داشت به طوری که از نظر آماری نسبت به تیمار کینیتین ۱و ایندول بوتیریک اسید نیم میلی‌گرم بر لیتر (که حداکثر میانگین طول شاخه با عدد ۳ سانتی‌متر را داشت) کمتر ولی نسبت به تیمار کینیتین ۰/۲ و ایندول بوتیریک اسید ۰/۲ میلی‌گرم بر لیتر (که حداقل میانگین طول شاخه با عدد ۱/۱۶ سانتی‌متر را داشت) بیشتر بود (جدول ۱).

بیشترین میزان باززایی در گیاهCotoneaster wilsonii زمانی ثبت شد که ریزنمونه های گره‌ای در محیط MS با نیم میلی‌گرم بر لیترTDZ و۰/۱ میلی‌گرم بر لیترNAA پرورش یافتند(24). اکسین‌ها نظیر: IBA و سیتوکنین‌ها مانند BA و KIN رشد کالوس را با تنظیم بیان ژن تحریک می‌کنند. اکسین‌ها برای تمایزیابی بافت و سلول ریز نمونه حیاتی هستند. سایتوکنین‌ها نیز بیوسنتز اسیدهای نوکلئیک، پروتئین‌ها را تحریک می‌کنند و در مقابل از فعالیت ریبونوکلئوزها و پروتنازها ممانعت به‌عمل می‌آورند؛ همچنین این هورمون‌ها فرایند تقسیم سلولی را فعال می‌کنند [۲۵]. طبق گزارشات پیشین، محیط MS رایج ترین محیط کشت بافت برای گیاهان جنس Rubus می‌باشد [۲۶]. ترکیبات تنظیم کننده رشد جهت تکثیر جوانه انتهایی Rubus ۱ تا ۲ میلی‌گرم بر لیتر بنزیل آدنین، ۰/۱ تا ۱ میلی‌گرم برلیتر ایندول بوتیریک اسید، ۰/۱ میلی گرم برلیتر NAA و ۰/۱ میلی‌گرم برلیتر اسید جبرلیک (GA3) بودند [۸]. بیشترین نرخ ازدیاد در تمشک سیاه واریته Cacnska دریک میلی‌گرم برلیتر بنزیل آدنین، ۰/۱ میلی‌گرم برلیتر IBAو ۰/۱میلی‌گرم برلیتر GA3 بدست آمد. بیشترین طول شاخساره در ۰/۵میلی‌گرم برلیتر BA به همراه ۰/۱میلی‌گرم برلیتر IBA و ۰/۱ میلی‌گرم برلیتر GA3 تولید شد [۹].

جدول ۱- مقایسه میانگین تاثیر غلظت‌های مختلف هورمون سیتوکنین و ایندول بوتریک اسید بر میزان باززایی تمشک رقم مرتون

Cytokinin (mg/l)	IBA	درصد شاخه زایی	تعداد شاخه در ریزنمونه	طول شاخه (سانتی متر)
BA 0.2	0.1	۸۰	۲/۳^{e}	۱/۶۶^{fg}
BA 0.5	0.1	۹۱/۶	۲/۱^{f}	۱/۷۶^{f}
BA 1	0.1	۱۰۰	۳/۶^{d}	۱/۶۶^{fg}
BA 1.5	0.1	۱۰۰	۹^{a}	۲/۴^{cde}
BA 2	0.1	۱۰۰	۷^{b}	۲/۴^{cde}
BA 0.2	0.5	۵۰	۱^{g}	۲/۳^{de}
BA 0.5	0.5	۶۵	۱^{g}	۲/۵^{bcd}
BA 1	0.5	۱۰۰	۱/۸^{efg}	۲^{ef}
BA 1.5	0.5	۸۳/۳	۱/۶^{efg}	۱/۶۶^{fg}
BA 2	0.5	۴۰	۱^{g}	۱/۳^{gh}
Kin 0.2	0.1	۳۰/۳	۱/۳^{fg}	۱/۱۶^{h}
Kin 0.5	0.1	۳۵/۳	۱^{g}	۱/۳^{gh}
Kin 1	0.1	۶۹	۱/۶^{efg}	۲/۶^{abcd}
Kin 1.5	0.1	۶۹	۳/۳^{d}	۲/۷^{abc}
Kin 2	0.1	۱۰۰	۴/۸^{c}	۲/۸^{ab}
Kin 0.2	0.5	۴۶	۱^{g}	۲/۶^{abcd}
Kin 0.5	0.5	۳۶/۶	۱/۳^{fg}	۲/۹^{ab}
Kin 1	0.5	۲۰	۱/۱^{g}	۳^{a}
Kin 1.5	0.5	۲۰	۱/۱۶^{g}	۱/۸^{f}
Kin 2	0.5	۲۳/۳	۱/۶^{efg}	۱/۶۶^{fg}

اعداد دارای حروف مشابه از نظر آماری دارای اختلاف معنی‌داری نمی‌باشند.

بهینه سازی هورمون‌ها در محیط ریشه‌زایی

با توجه به اینکه اهمیت صفت تعداد شاخه بیشتر از صفت میانگین طول شاخه است لذا در مجموع تیمار ترکیبی بنزیل آدنین ۱/۵ و ایندول بوتیریک اسید ۰/۱ به عنوان تیمار برتر انتخاب شد و ریزنمونه‌ها جهت تولید گیاهان یکنواخت برای مراحل بعدی در این محیط‌کشت انتخاب شدند. گیاهان تولید شده از محیط کشت شاخه زایی بهینه شده، در مرحله بعدی وارد محیط کشت ریشه‌زایی شدند که در آن دو نوع هورمون اکسین (ایندول بوتیریک اسید (IBA) و نفتالین استیک اسید (NAA) در غلظت‌های مختلف مورد بررسی قرار گرفتند. براساس جدول شماره ۲، بیشترین رشد طولی ریشه در تیمار ایندول بوتیریک اسید ۰/۲ میلی‌گرم بر لیتر بدست آمد. از نظر وزن ریشه نیز تیمار مذکور به همراه NAA 0.2 نفتالین استیک اسید ۰/۲، ۰/۵، ۱ و ۲ میلی‌گرم بر لیتر نسبت به سایر تیمارها بهتر بود.

با در نظر گرفتن همزمان طول شاخه و وزن شاخه‌ی تولید شده، تیمار نفتالین استیک اسید ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر تیمار برتر بود (جدول ۲). این تیمار دارای وزن ریشه مطلوبی نیز بود لذا در مجموع تیمار نفتالین ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر تیمار برتر این بخش شناخته شد و سایر آزمایشات در این محیط ریشه‌زایی صورت گرفت.

بهینه سازی زغال فعال در محیط ریشه‌زایی

همانطور که جدول ۳ نشان می‌دهد، بیشترین طول ریشه (۵/۳ سانتی‌متر) در زغال فعال ۰/۱ درصد تولید شد و کمترین طول ریشه نیز در غلظت‌های پایین زغال (۰/۰۱ و ۰/۰۲ درصد) حاصل شد. ازنظر وزن ریشه تیمار ۰/۰۵ درصد بیشترین مقدار را نشان داد و کمترین وزن ریشه نیز در کمترین مقدار زغال فعال دیده شد (جدول ۳). به نظر می‌رسد حد بالای زغال فعال برای رشد ریشه مناسب نبوده ولی حد متوسط آن موجب افزایش رشد ریشه می‌گردد. شاخه‌زایی نیز در محیط درون شیشه تحت تاثیر زغال فعال قرار گرفت به طوری که غلظت ۰/۵ و بالاتر از آن بدون اختلاف معنی‌دار با هم، طول شاخساره بیشتری نسبت به غلظت‌های پایین‌تر زغال داشتند (جدول ۴). بیشترین وزن شاخه در غلظت ۰/۰۱ درصد زغال فعال حاصل شد که اختلاف معنی‌داری با غلظت ۰/۰۵ درصد نداشت (جدول ۴).

در مجموع این گونه می‌توان گفت که غلظت ۰/۱ زغال فعال برای رشد رویشی بخش هوایی در کشت درون شیشه تمشک سیاه مناسب‌تر از غلظت‌های پایین‌تر یا بالاتر است. پایین بودن غلظت قند در تیمار زغال فعال ۰/۰۵ و ۰/۱ درصد می تواند به دلیل تخصیص کربوهیدرات به ریشه باشد؛ چرا که در این دو تیمار رشد ریشه حداکثر بوده است (جدول ۳). به نظر می‌رسد کاهش غلظت ذغال فعال مقدار قند را افزایش داد و به همین دلیل از سنتز کلروفیل (ناشی از عدم نیاز برای این ماده) ممانعت کرد. این مسئله می تواند نشان دهد که منبع کربن فعال از Turbulence در کلروپلاست‌ها ممانعت می کند که این خود موجب افزایش فتوسیستم دو می شود. این استدلال به وسیله افزایش مقدار کلروفیل در برگ های سورگوم به اثبات رسیده است (26). ذغال فعال به عنوان ماده غیرسمی در کشت درون شیشه ای استفاده شده است که دارای مزیت‌هایی مانند جذب مواد سمی می‌باشد [۲۷]. برای ریشه‌دهی رازبری‌ها Raspberry از محیط‌کشت تغیریافته MS (کاهش نمک‌های معدنی تا۱/۲ بدون تغییر در ترکیبات آلی) با یک IBA، ۰/۱میلی‌گرم بر لیتر GA3 و یک گرم برلیتر ذغال فعال استفاده شد [۹].

تاثیر میزان ساکارز بر ریشه زایی تمشک

ریشه دهی در تمامی تیمارهای مورد استفاده ساکارز در محیط درون شیشه مشاهده شد. بیشترین میزان ریشه‌زایی در محیط حاوی بین ۳ تا ۵ درصد ساکارز مشاهده گردید. طبق نتایج جدول (جدول ۴) بیش‌ترین میزان طول ریشه و شاخه در محیط حاوی ساکارز ۴ و ۵ درصد اتفاق افتاد. از طرفی بیشترین مقدار کلروفیل در غلظت ۴ و کاروتنوئید نیز در غلظت ۱ درصد ساکارز مشاهده شد. در غلظت‌های بین ۲ تا ۵ درصد ساکارز میزان کربوهیدرات یا قند کل برگ افزایش یافت. افزایش غلظت ساکارز در محیط‌کشت منجربه افزایش تعداد سلول‌های روزنه‌ای، قند و نشاسته در گیاه Alocasia

جدول ۲- مقایسه میانگین تاثیر غلظت‌های مختلف هورمون ایندول بوتریک اسید بر میزان ریشه زایی تمشک رقم مرتون

Auxin(mg/l)	درصد ریشه زایی	طول ریشه (سانتی متر)	طول شاخه (سانتی متر)	وزن ریشه (گرم)	وزن شاخه (گرم)
IBA 0.2	۱۰۰	۳/۴^{a}	۳/۷^{ab}	۰/۰۶^{a}	۰/۰۳^{g}
IBA 0.5	۱۰۰	۳^{ab}	۳/۷^{ab}	۰/۰۱^{c}	۰/۳^{bcd}
IBA 1	۹۱/۶	۲/۲^{cd}	۲/۹^{bc}	۰/۰۱^{c}	۰/۲۹^{cde}
IBA 1.5	۱۰۰	۲/۶^{bc}	۲/۶^{cd}	۰/۰۳^{b}	۰/۲۳^{ef}
IBA 2	۱۰۰	۳/۱^{ab}	۳/۴^{abc}	۰/۰۲^{bc}	۰/۲۱^{f}
NAA 0.2	۱۰۰	۱/۸^{d}	۲/۰۶^{d}	۰/۰۷^{a}	۰/۳۶^{ab}
NAA 0.5	۸۴	۲/۴۶^{c}	۳/۹^{a}	۰/۰۷^{a}	۰/۳۷^{a}
NAA 1	۱۰۰	۳^{b}	۳/۷^{ab}	۰/۰۶^{a}	۰/۳۴^{abc}
NAA 1.5	۹۱	۳ .۲^{cd}	۳/۴^{abc}	۰/۰۲^{bc}	۰/۳۶^{ab}
NAA 2	۱۰۰	۲/۱^{cd}	۳/۵^{abc}	۰/۰۶^{a}	۰/۲۵^{def}

اعداد دارای حروف مشابه از نظر آماری دارای اختلاف معنی‌داری نمی‌باشند.

جدول ۳- مقایسه میانگین تاثیر غلظت‌های مختلف ذغال فعال بر میزان ریشه زایی تمشک رقم مرتون

ذغال فعال (درصد)	درصد ریشه‌زایی	طول ریشه	طول شاخه	وزن ریشه	وزن شاخه	کلروفیل(میلی گرم بر گرم وزن تازه)	کاروتنوئید (میلی گرم بر گرم وزن تازه)	قند کل
۰/۰۱	۷۶/۶^{a}	۲/۳^{c}	۲/۸^{b}	۰/۰۱^{d}	۰/۲۳^{d}	۱/۷^{a}	۰/۶^{a}	۹/۴^{b}
۰/۰۲	۹۱/۶^{a}	۲/۸^{c}	۲/۹^{b}	۰/۰۴^{c}	۰/۳۳^{c}	۰/۵^{c}	۰/۳۸^{b}	۱۲/۱^{a}
۰/۰۵	۹۳^{a}	۴^{b}	۴/۱^{a}	۰/۱^{a}	۰/۴۶^{ab}	۱^{b}	۰/۳۹^{b}	۹/۱^{b}
۰/۱	۱۰۰^{a}	۵/۳^{a}	۴^{a}	۰/۰۶^{b}	۰/۵۳^{a}	۱/۸^{a}	۰/۷۳^{a}	۹/۶^{b}
۰/۲	۹۳^{a}	۳/۷^{b}	۴/۲^{a}	۰/۰۶^{b}	۰/۴۳^{b}	۰/۲۶^{d}	۰/۶۳^{a}	۱۱/۶^{a}

اعداد دارای حروف مشابه از نظر آماری دارای اختلاف معنی‌داری نمی‌باشند.

شکل ۱- به ترتیب از سمت راست. کشت جوانه جانبی در محیط ۱/۲ موراشیک و اسکوگ جهت فعال شدن جوانه جانبی. مرحله باززایی شاخه از جوانه جانبی در محیط حاوی ۱/۵ میلی‌گرم بر لیتر BAو ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر IBA. مرحله ریشه زایی شاخه های تمشک در محیط حاوی ۰/۲ میلی‌گرم بر لیتر IBA. کشت شاخه در محیط حاوی ۲۰ میل گرم بر لیتر سیلیس

amozonica گردید، اما از دیگر سو اندازه سلول‌های روزنه‌ای و پتانسیل آب برگ در محیط درون شیشه‌ای کاهش یافت. میزان فتوسنتز گیاهان در محیط کشت حاوی ساکارز به غلظت ۶ و ۹ درصد کاهش یافت که احتمالا ناشی از حضور یک منبع انرژی کافی(ساکارز) برای شکل‌گیری سایر فعالیت‌های متابولیکی بوده است [۲۸]. راناشینگ و

همکاران در سال ۲۰۰۶ گزارش کردند که افزایش غلظت ساکارز تا ۸ گرم برلیتر طول ریشه و نرخ رشد ریشه را به صورت تدریجی افزایش می‌دهد [۲۹]. بیشترین تعداد برگ و بلندترین شاخه در غلظت۳درصد ساکارز بدست آمد و با افزایش بیشتر ساکارز، میزان رشد شاخساره کاهش یافت. غلظت بالای ساکارز (۴۵ و ۶۰ گرم بر لیتر)، تعداد شاخه‌های گیاه Billbergia zebrina را افزایش داد [۳۰]. کربوهیدرات‌ها به عنوان منبع انرژی و همچنین یک فاکتور در حفظ پتانسل اسمزی کشت درون شیشه عمل می‌کنند [۳۱].

رشد ریشه و سرآغازه از جمله مراحل رشدی هستند که نیاز به انرژی بالایی دارند و مواد متابولیتی- عمدتا کربوهیدرات‌ها- را مورد مصرف قرار می‌دهند. در واقع قند ترکیب بسیار مهمی است در انواع محیط‌های کشت و از آنجایی که شرایط رشد معمولا برای فتوسنتز کافی نیست و یا به دلیل تاریکی اتفاق نمی‌افتد؛ این مسئله مهم و ضروری است که قند به محیط کشت اضافه شود. بافت‌های سبز در محیط کشت به اندازه کافی اوتوتروف نیستند و غلظت دی اکسید کربن در لوله آزمایش می‌تواند در انجام فتوسنتز فاکتور محدودکننده باشد. در عمل هم افزودن دی اکسید کربن به درون شیشه خیلی دشوار و گران است)[۳۲]. در میان انواع مختلف کربوهیدرات‌ها، ساکارز به عنوان یک منبع خوب کربنی در شرایط درون شیشه شناخته می‌شود [۳۳]. زیرا مهم‌ترین منبع شناخته شده کربوهیدرات‌ها درشیره پرورده بسیاری از گیاهان ساکارز است. به علاوه ساکارز به آسانی متحرک بوده و پتانسیل اسمزی‌اش را حفظ می کند و نسبت به تجزیه آنزیمی مقاوم است [۳۴].

نتایج پژوهش حاضر نشان داد بهترین واکنش گیاهان درخصوص ریشه‌دهی و رشد در محیط کشت یک دوم MS که حاوی ساکارز بدون هورمون بود مشاهده شد. به هرحال اگرچه هورمون‌ها اثرات متفاوتی روی ریشه‌زایی دارند ولی در موارد بسیاری شاخه‌های باززایی شده در محیط بدون هورمون ریشه‌زایی مطلوبی نشان دادند. تمشک‌ها پتانسیل ریشه‌زایی بالایی دارند، بنابراین به راحتی بدون هورمون اکسین در محیط‌کشت ریشه تولید می‌کنند. تمشک‌ها می‌توانند، به علت داشتن هورمون اکسین درونی بالا، در یک محیط‌کشت غنی تولید ریشه کنند بنابراین جهت کاهش هزینه‌های تولید در تکثیر تجاری توصیه می‌شود از محیط‌کشت MS بدون ساکارز برای ریشه‌دهی تمشک استفاده شود.

تاثیر عنصر سیلیسیم بر شاخه زایی و ریشه زایی

نتایج حاصل از افزودن عنصر سیلیسیم به بهترین محیط‌کشت شاخه‌زایی (حاوی BA 1.5+IBA 0.1) نشان داد که هرچند این عنصر از نظر درصد شاخه‌زایی تاثیر معنی‌داری ایجاد نکرد ولی از نظر تعداد شاخه دارای اثر منفی بوده و به‌طور معنی‌داری مانع تولید شاخه در محیط کشت درون شیشه شد. البته این عنصر توانست میانگین طول شاخه را در دو تیمار سیلیسیم ۱ و ۵ درصد افزایش دهد بطوری که بهتر از شاهد و غلظت‌های بالای سیلیسیم عمل نمود (جدول ۵).

در آزمایش آخر جهت بهینه‌سازی محیط‌کشت، عنصر سیلیسیم به محیط ریشه زایی اضافه شد. نتایج این آزمایش نشان داد که بیشترین طول ریشه در غلظت ۱ درصد سیلیسیم صورت گرفت که بطور معنی‌داری از سایر تیمارها بیشتر بود اما از نظر وزن ریشه اختلاف معنی‌داری بوجود نیامد (جدول ۶).

از نظر شاخه‌دهی در این محیط‌کشت، سیلیسیم تاثیر منفی بر جای گذاشت لذا شاهد، بیش‌ترین تعداد شاخه را داشت ولی از نظر وزن شاخه تنها غلظت بالای سیلیس اثر منفی داشت و اختلاف معنی‌دار بین سایر تیمارها دیده نشد. در مجموع می‌توان سیلیسیم ۱ درصد را در این مرحله توصیه نمود؛ هرچند مقداری کاهش در طول شاخه رخ داد. پس سیلیسیم بیشتر از آنکه رشد شاخه را تحت تاثیر قرار دهد میتواند تاثیر مثبتی بر رشد ریشه‌ها بگذارد. اسید سیلیسیک اثر بازدارنده‌ای روی رشد طولی ریشه‌های تمشک داشت ولی به دلیل افزایش طول عمر ریزنمونه ها رشد شاخساره را افزایش داد. علیرغم کاهش طول ریشه افزایش نسبی میزان سیلیس (۵ میلی‌گرم برلیتر) وزن ریشه را افزایش داد که نشان‌دهنده‌ی افزایش ضخامت ریشه‌ها می‌باشد. سیلیسیم پتانسیل تجمع در برگ‌ها را در باززایی شاخساره‌های گیاه Cotoneaster wilsonii نشان داد و مالون دی آلدهید را در شاخساره‌ها در مقایسه با گیاهان شاهد کاهش داد [۲۴].

جدول ۴- مقایسه میانگین تاثیر غلظت‌های مختلف ساکارز بر میزان ریشه زایی تمشک رقم مرتون

قند	کارتنوئید (میلی‌گرم بر گرم)	کلرفیل (میلی‌گرم برگرم)	وزن ساقه (گرم)	وزن ریشه (گرم)	طول ساقه (سانتی‌متر)	طول ریشه (سانتی‌متر)	درصد ریشه‌زایی	ساکارز (درصد)
۹٫۲^{b}	۰٫۹۱^{a}	۰٫۴۱^{d}	۰٫۱۵^{d}	۰٫۰۰۹^{c}	۲٫۳^{c}	۰٫۷۳^{e}	۹۳	۱
۱۰٫۲^{ab}	۰٫۸۹^{ab}	۰٫۸۵^{b}	۰٫۲۷^{c}	۰٫۰۳^{b}	۲٫۵^{c}	۱٫۶^{d}	۹۳	۲
۱۱٫۳^{a}	۰٫۶۳^{bc}	۰٫۶۱^{c}	۰٫۳۵^{b}	۰٫۰۸^{a}	۲٫۵^{c}	۳٫۴^{c}	۱۰۰	۳
۱۰٫۳^{ab}	۰٫۴۲^{c}	۰٫۹۶^{a}	۰٫۴۹^{a}	۰٫۰۷^{a}	۴٫۴^{a}	۵٫۱^{a}	۱۰۰	۴
۱۰٫۷^{a}	۰٫۴۲^{c}	۰٫۵۶^{c}	۰٫۴۶^{a}	۰٫۰۹^{a}	۳٫۴^{b}	۳٫۹^{b}	۱۰۰	۵

اعداد دارای حروف مشابه از نظر آماری دارای اختلاف معنی‌داری نمی‌باشند

جدول ۵. مقایسه میانگین تاثیر سیلیس بر میزان شاخه زایی تمشک رقم مرتون

طول شاخه (سانتی متر)	تعداد شاخه	درصد شاخه زایی	سیلیس (میلی گرم بر لیتر)
۱٫۳۶^{b}	۴٫۵^{a}	۱۰۰	۰
۱٫۶^{a}	۳٫۸^{b}	۹۱	۱
۱٫۶^{a}	۳٫۴^{b}	۹۱	۵
۰٫۷^{c}	۱٫۶^{c}	۷۸	۱۰
۰٫۵^{d}	۱٫۷^{c}	۵۶	۲۰

اعداد دارای حروف مشابه از نظر آماری دارای اختلاف معنی‌داری نمی‌باشند

جدول ۶. مقایسه میانگین تاثیر سیلیس بر میزان ریشه زایی تمشک رقم مرتون

وزن ساقه (گرم)	وزن ریشه (گرم)	طول شاخه (سانتی متر)	طول ریشه (سانتی متر)	درصد ریشه زایی	سیلیس (میلی گرم بر لیتر)
۰٫۰۹^{a}	۰٫۰۲^{a}	۴٫۱^{a}	۳٫۳^{b}	۱۰۰^{a}	۰
۰٫۰۸^{a}	۰٫۰۳^{a}	۳٫۱^{b}	۴^{a}	۱۰۰^{a}	۱
۰٫۰۸^{a}	۰٫۱^{a}	۲٫۶^{b}	۱٫۴^{c}	۹۳^{a}	۵
۰٫۰۸^{a}	۰٫۰۲^{a}	۱٫۷^{c}	۲٫۶^{b}	۹۳^{a}	۱۰
۰٫۰۵^{b}	۰٫۰۰۵^{a}	۱٫۶۶^{c}	۱٫۱^{c}	۸۳^{a}	۲۰

اعداد دارای حروف مشابه از نظر آماری دارای اختلاف معنی‌داری نمی‌باشند

تعداد ریشه و رشد گیاه *Cattleya loddigesii* رشدیافته در محیط‌کشت تیمارشده با سیلیکات سدیم ۲۰ میلی گرم برلیتر و سیلیکات پتاسیم ۵ میلی‌گرم برلیتر بیشتر شد (17). براگا و همکاران۲۰۰۹ روی منابع مختلف سیلیسیم مانند سیلیکات پتاسیم، سیلیکات سدیم و سیلیکات کلسیم روی باززایی توت‌فرنگی مطالعه کردند و نشان دادندکه سیلیکات سدیم باغلظت ۱ گرم بر لیتر بهترین تیمار جهت افزایش وزن تر و خشک شاخه‌های باززایی شده در محیط MS بود [۲۰]. اثر سیلیسیم روی عملکرد گیاه ممکن است ناشی از رسوب آن در برگ و افزایش مقاومت آن و افزایش غلظت کلروفیل در واحد سطح باشد، بنابراین افزایش توانایی گیاه برای استفاده از نور زیاد می‌شود. سیلیسیم در دیواره سلولی آوندهای چوب می‌نشیند و از واپاشی آن تحت شرایط تعرق بالا ممانعت می‌کند [۱۳]. در یک مطالعه تیمار سیلیسیم ارتفاع گیاه، طول خوشه، طول میانگره، سلولز، همی سلولز و لیگنین را افزایش داد [۱۵]. سیلیسیم می‌تواند کمیت و کیفیت محصولات گیاهی را افزایش، تبخیر و تعرق را کاهش، مقاومت به تنش‌های خشکی، شوری و سمیت فلزات سمی را افزایش و ترکیبات آنتی‌اکسیدانی را افزایش دهد. مطالعات نشان می‌دهد که

سیلیسیم به عنوان یک سیگنال جهت فعال‌سازی واکنش‌های دفاعی در برابر بیماری‌های دفاعی عمل می‌کند. افزایش فعالیت آنزیم کیتناز توسط سیلیسیم اثبات شده است. سیلیسیم همچنین فعالیت پراکسیداز، پلی‌فنل اکسیداز در حضور پاتوژن‌های قارچ را تشدید می‌کند [۱۲].

نتیجه‌گیری

درسال‌های اخیر استفاده از سیسلیسم به عنوان یک عنصر مفید مورد توجه قرار گرفته است. این عنصر رشد و عملکرد گیاه را از طریق فاکتورهای کمی و کیفی بهبود می‌بخشد. از طریق فعال‌سازی آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی سیلسیسم مقاومت گیاه به تنش‌های محیطی مانند شوری و خشکی و بیماری‌ها و آفات افزایش می‌دهد. علی رغم نقش مهم سیلیسیم در رشد و مقاومت گیاه، مطالعات کمی در حوزه استفاده از سیلیسیم در کشت درون شیشه‌ای انجام شده است. استفاده از این عنصر در محیط کشت بافت می تواند رشد و خصوصیات مورفولوژیکی گیاه را بهبود بخشد. همچنین می تواند جهت دست‌یابی به بهترین کیفیت تمشک در محیط درون شیشه و سازگاری گیاهان قبل از ورود به مرحله بعد، قدرت رشد رویشی و زایشی گیاه و عملکرد اقتصادی گیاه را افزایش دهد.

مصرف ذغال فعال به عنوان ترکیب کربنی احتمالا در افزایش فتوسنتز گیاه از طریق تاثیر بر میزان انتقال الکترون نقش مثبت دارد. استفاده از ذغال فعال می تواند نیاز منبع کربنی هوا را کاهش دهد. بنابراین این احتمال وجود دارد که استفاده از منابع کربنی به عنوان مثال ذغال فعال و همچنین منابعی که به جذب کربن کمک می‌کنند، متابولیسم گیاه را فعال نمایند و در نهایت توانایی فتوشیمیایی گیاه و متابولیسم و عملکرد گیاه بهبود بخشند.

منابع

[1] Jennings DL, Daybeny HA, Moore JN. Blackberries and raspberries. Acta Hortic 1990; 290: 330–389.

[2] Mozaffarian V. A dictionary of Iranin plant, Names. 5th ed 1386. Tehran. Farhang Moaser Publisher. P 466

[3] Rameshvar V, Tushar G, Rakesh Punasiya R Chetan G. Rubus fruticosus (Blackberry) use as an herbal medicine. PHCOG REV. 2014; 8(16): 101-104.

[4] Funt RC, Bartels S, Bartholomew H, Ellis M, Nameth ST, Overmyer RL, et al. Brambles: Production, Management and Marketing. Bulletin 782. The Ohio State University Extension, Columbus, Ohio. 1999.

[5] Weber CL. Propagation. In: RC Funt and Harvey KH (Eds), Raspberries. CABI. 2013; Pp. 83-90.

[6] Adtina MH, Beasford RT. The effects of silicon on cucumber plants grown in recirculating nutrient solution. J. Ann. Bot 1986; 58: 343-351.

[7] Meng R, THH, Chen CE, Finn YLi. Improving In vitro Plant Regeneration from Leaf and Petiole Explants of ‘Marion’ Blackberry. HortScience 2004; 39(2): 316-320.

[8] George EF, Plant Propagation by Tissue Culture, Part 1 and 2. Exegetics Ltd., Basingstoke, England. 1996.

[9] Ruzic D, Lazic T. Micropropagation as Means of Rapid Multiplication of Newly

[10] Developed Blackberry and Black Currant Cultivars. Agric. conspec. Sci 2006; Vol. 71(4): 149-153.

[11] Richmond KE, Sussman M. Got silicon? The non-essential benefi cial plant nutrient. Curr Opin Plant Biol 2003; 6:268–72.

[12] Khoshgoftarmanesh AH.1386. Principles of Plant Nutrition. Isfahan University of Technology Publication Center. P 299-301.

[13] Cherf M, JG. Menzies, DL. Ehret C. Bopgdanof f, Belanger RR. Yield of

[14] cucumber infected with Pythium aphanidermatum when grown with soluble silicon. Hort. Sci 1994; 29: 896-897.

[15] Chaoui A, Mazhoudi S, Ghorbal MH, Ferjani EL. Cadmium and zinc induction of lipid peroxidation and effects on antioxidant enzyme activities in bean (Phaseolus vulgaris L.). Plant Sci 1997; 127: 139-147.

[16] Murillo-Amador BHG, Jones V, Kayac Aguilar RL. Effect of foliar application of calcium nitrate on growth and

physiological attributes of cowpea (Vigna unguiculata) grown under salt stress. Environmental Botany 2006; 58: 188-196.

[17] Dastan S, M. Siavoshi D, Zakavi A, Ghanbari Malidarreh R, Yadi E. Ghorbannia F. Application of Nitrogen and Silicon Rates on Morphological and Chemical Lodging Related Characteristics in rice (Oryza sativa L.) North of Iran. Journal of Agriculture Science, Canada 2012; 4(6): 12-18.

[18] Islam MM, Ahmed M, Mahaldar D. In vitro callus induction and plant regeneration in seed explants of rice (Oryza sativa L.). Res.J.Agri.Biol.Sci 2005; 1, 72–75.

[19] Soares JDR, Pasqual M, Rodrigues FA, Villa F, deAraujo AG. Silicon sources in the micropropagation of the Cattleya group orchid. Acta Sci. Agron 2011; 33: 503–507.

[20] Sivanesan I, Song JY, Hwang SJ, Jeong B. Micropropagation of Cotoneaster wilsonii Nakai—a rare endemic ornamental plant. Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC) 2010; 105: 55-63.

[21] Avestan S, Naseri LA. 1394. Effects of nano silicon (SiO2) application on in vitro proliferation of Gala apple cultivar. Iranian Journal of Horticaltural Sciences. 46(4): P 669-675.

[22] Braga FT, Nunes CF, Favero AC, Pasqual M, Carvalho JG, Castro, EM. Anatomical characteristics of the strawberry seedlings micro propagated using different sources of silicon. Pesqui. Agropecu Bras 2009; 44: 128–132.

[23] Goncalves EM, Cruz RMS, Abreu M, Brandao TR, Silva CL. Biochemical and colour changes of watercress (Nasturtium officinale R. Br.) during freezing and frozen storage. Food Engineering 2009; 93: 32-39.

[24] Mccready R, Guggolz MJ, Silviera V, Owens HS. Determination of starch and amylose in vegetables analytical chemistry 1950; 22: 1156-1158.

[25] Bite A, and Petrevica L. The influence of in vitro propagation on the field behavior

[26] of red raspberry variety 'Norna'. Acta Hortic 2002; 585: 615–617.

[27] Nawrot-Chorabik K. The use callus tissue in forest tree biotechnology: studies in vitro. Cosmos 2015; 64: 305-317.

[28] Netondo GW, Onyango JC, Beck E. Sorghum and salinity: II. Gas exchange and chlorophyll fluoresense of sorghum under salt stress. Crop Sci 2004; 44: 806-811.

[29] Eliane CP, Letíci M, Gonçalves M, Auxiliadora MG, Claudete AM, Maria F. Activated charcoal and graphite for the micropropagation of Cattleya bicolor Lindl. and a orchid double-hybrid 'BLC Pastoral Innocence'. Maringá, 2012; 34 (2): 157-161.

[30] Jo EA, Kumar Tewari R, Hahn EJ, Paek KY. In vitro sucrose concentration

[31] affect growth and acclimatization of Alocasia amazonica plantlets. Plant Cell Tiss. Organ Cult 2009; 96:307-315.

[32] Ranasinghe RATD, Abayagunawardana AGNI, Hettiarachchi HIDD. Eeswara JP. In vitro flower induction in gerbera. Trop Agric Res 2006; 18: 1-10.

[33] Martins JPR, Pasqual M, Martins AD, Ribeira SF. Effects of salts and sucrose concentrations on in vitro propagation of Billbergia zebrina (Herbert) Lindley (Bromeliaceae). Aust J. Crop Sci 2015; 9(1): 85-91.

[34] Ji A, Geng X, Zhang Y, Yang H. Advances in somatic embryogenesis research of horticultural plants. AJPS 2011; 2(6): 727-732.

[35] Pierik RLM. In vitro culture of higher plants. Dordrecht: Springer Science &Business Media. 1997.

[36] Abou-Rayya MS, Kassim NE, Ali EAM. Effect of different cytokinins concentrations and carbon sources on shoot proliferation of bitter almond nodal cuttings. J Am Sci 2011 7(1): 135-139.

[37] Fatima N, Ahmad N, Ahmad I, Anis M. Interactive Effects of Growth Regulators, Carbon Sources, pH on Plant Regeneration and Assessment of Genetic Fidelity Using Single Primer Amplification Reaction (SPARS) Techniques in Withania somnifera L. Appl. Biochem. Biotechnol 2015; 177: 118-136.

Journal of Developmental Biology
Vol. 13, No. 3, Summer 2021

Plant regeneration from blackberry lateral bud culture under a set of hormone, silicic acid, sucrose and activated charcoal

Dehpour A. A.[1*], Soltani S.[1], Bishehkolaei R.[1], Ghasemi K.[3], Rajabzadeh Z.[2]

[1] Department of Biology Qaemshahr branch, Islamic Azad University, Qaemshahr, Iran.

[2] Department of Biology Qaemshahr branch, Islamic Azad University, Qaemshahr, Iran.

[3] Horticulture department of Sari agricultural university and naturalresources.

* (Corresponding author): dehpour@gmail.com

Received: December 2020 Accepted: March.2021

Abstract

The objective of this work was to evaluate The effect of growth regulator, silicic acid, sucrose and activated charcoal used on micro propagation of thornless Blackberry cv. Merton explants. Propagules of cv. Merton were cultivated on a 1/2 Murashige and Skoog (MS) medium. The single buds were cultured in 1/2 MS containing 0.1% activated charcoal and new shoot containing buds were formed 3 weeks after culture. New buds were cultured in MS containing BA, Kin and IBA at concentrations of 0.2, 0.5, 1, 1.5 and 2 mgL-1 for shoot regeneration. New shoot after 6 weeks regenerated and the best medium for shoot regeneration was MS medium contains 1.5 mg/l BA and 0.1 mg/l IBA. Shoots were cultured in 1/2 MS containing 0.2, 0.5, 1, 2 mgL-1 NAA and IBA for root formation. After determining the optimal concentrations of IBA and NAA, activated charcoal in concentrations of 0.01, 0.02, 0.05, 0.1, 0.2%, silicic acid in concentrations of 0, 1, 5, 10, 20 mgL-1, sucrose in concentrations of 1, 2, 3, 4, 5% were added to the culture medium to improve rooting. Sucrose in 4% increased the root length, root weight and chlorophyll content. The addition of activated charcoal in the MS medium resulted in increased shoot and root length. In thornless blackberry cultures, Silicic acid decreased the shoot number but until 5 mg/l increased the shoot length. Silicic acid increased the root length in 1 mg/l and increased the root weight in 5 mg/l rather than control respectively.

Keywords: Thornless blackberry, hormone, silicic acid, shoot regeneration, rooting.