

اثر ترکیب‌های مختلف تنظیم‌کننده‌های رشد بر روی کالوس‌زایی "به" (*Cydonia oblonga* Mill.)

Effect of growth regulators on callus induction in Quince (*Cydonia oblonga* Mill.)

الهام فاضلی^۱، منصور امیدی^{۲*}، پریسا عبداللهی^۳

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۰۱/۲۵

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۰۳/۱۵

چکیده

گیاه "به" به‌عنوان یک گیاه دارویی شناخته شده است. ریززدیادی درون شیشه‌ای و القای کالوس از ریزنمونه‌های مختلف این گیاه از مراحل مهم و حساس می‌باشد. در مطالعه حاضر قابلیت کالوس‌زایی و باززا شدن مستقیم در محیط کالوس‌زایی در ریزنمونه و ترکیب‌های مختلف تنظیم‌کننده‌های رشد مورد ارزیابی قرار گرفت. از قسمت‌های برگ، ساقه، مریستم، دم‌برگ و کالوس جوانه روی ساقه چوبی گیاه "به" ریزنمونه تهیه شد و جهت ایجاد کالوس‌زایی از محیط کشت MS شامل سه سطح ۱، ۲ و ۴ میلی‌گرم در لیتر هورمون 2,4-D، ۰/۱، ۰/۲ و ۱ میلی‌گرم در لیتر هورمون BAP استفاده گردید، که هر کدام از تنظیم‌کننده‌های رشد به صورت یک آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی در سه تکرار بر روی محیط کشت MS مورد مطالعه قرار گرفت. بر اساس نتایج تجزیه واریانس در تمامی واکشت‌ها اثرات اصلی و متقابل برای همه صفات مورد بررسی بجز اثر اصلی BAP در واکشت اول برای صفت وزن خشک معنی‌دار شد. نتایج مقایسه میانگین در واکشت اول 2,4-D، برای صفت اندازه کالوس تیمار ۴ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D با ریزنمونه کالوس جوانه بر روی ساقه (۱۹/۵ میلی‌متر)، برای صفت وزن تر کالوس تیمار ۱ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D با ریزنمونه کالوس جوانه روی ساقه و برای صفت وزن خشک تیمار ۱ میلی‌گرم در لیتر با ریزنمونه کالوس جوانه روی ساقه را به‌عنوان مناسب‌ترین تیمارها معرفی نمود. در واکشت دوم برای صفات اندازه کالوس و وزن تر کالوس، بهترین تولید کالوس در تیمار ۱ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D با ریزنمونه کالوس جوانه روی ساقه مشاهده گردید. صفت وزن خشک در تیمار ۱ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D با ریزنمونه ساقه پاسخ مطلوبی نشان داد. نتایج مقایسه میانگین برای تنظیم‌کننده رشد BAP نشان داد که تیمار ۱ میلی‌گرم در لیتر BAP با ریزنمونه کالوس جوانه روی ساقه برای هر سه صفت در واکشت اول مشابه می‌باشد. در واکشت دوم صفات اندازه و وزن تر کالوس در تیمار ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر BAP با ریزنمونه مریستم بهترین پاسخ را داشتند. تنها تفاوت وزن خشک با دو صفت ذکر شده در واکشت دوم در ریزنمونه (کالوس جوانه روی ساقه) بود.

کلمات کلیدی: به، ریزنمونه، تنظیم‌کننده رشد، مریستم، گیاهان دارویی.

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات تهران.

۲- استاد پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، کرج.

۳- استادیار، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات.

*- مکاتبه کننده E-mail: momidi@ut.ac.ir

مقدمه

برای القای کالوس‌زایی در گیاهان مختلف از هورمون 2,4-D و BAP در غلظت‌های مختلف استفاده شده است (Mohammadi nasab *et al.*, 2011; Salehiyan, 2012; Khayat zade *et al.*, 2011; Arulselvi *et al.*, 2009. Morini *et al.*, 2000). هدف از مطالعه حاضر بررسی تأثیر غلظت‌های مختلف هورمون‌های رشدی 2,4-D و BAP در کالوس‌زایی ریزنمونه‌های مختلف گیاه "به" بود.

مواد و روش‌ها

تحقیق حاضر در مجتمع آزمایشگاه رازی واقع در دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران صورت پذیرفت. به علت مشکل بیماری باکتریایی آتشک سرشاخه‌های رقم "به" ترش اصفهان روی پایه ذالزالک از بهستان فجر اصفهان واقع در رحمت آباد اصفهان تهیه شد. برگ‌ها از ساقه‌ها جدا گردیدند و برش ساقه‌ها با ۱ الی ۲ جوانه جانی در هر ساقه صورت گرفت و ساقه‌ها با قارچ کش ریدومیل به مدت ۱۵ دقیقه تیمار و سپس با چند قطره مایع ظرف شویی ششو گردیدند و به مدت ۱۵ دقیقه زیر آب جاری قرار گرفتند. ساقه‌ها به مدت ۲۵ دقیقه با ۰/۲ گرم در لیتر آنتی بیوتیک سفاتوکسین تیمار و توسط کلراید جیوه ۰/۳۵ گرم در لیتر و ۱۰۰ سی‌سی هیپوکلریت سدیم ۱۰ درصد به مدت ۳ دقیقه ضد عفونی انجام شد و در نهایت با آب مقطر استریل شده سه بار ششو داده شدند. بعد از انجام ضد عفونی، ریزنمونه‌ها به محیط کشت استقرار VS (محیط کشت حاوی آهن قرمز) بدون هورمون انتقال یافتند (شکل ۱). با سپری شدن مدت زمان نزدیک به ۲ ماه مشاهده شد که اولین جوانه‌ها شروع به سبز شدن کردند و بعد از گذشت ۳ ماه امکان استفاده از این جوانه‌های سبز شده در محیط کالوس‌زایی میسر گردید (شکل ۱).

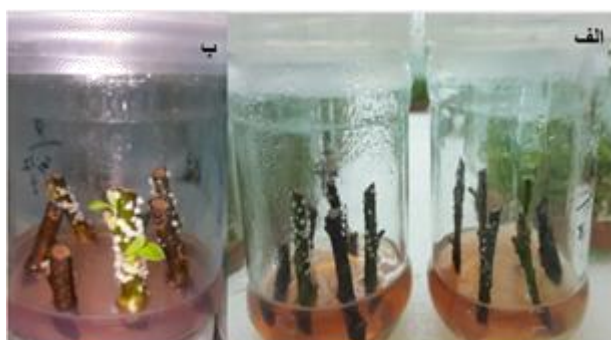
بعد از رشد کردن جوانه‌های روی ساقه از بخش‌های برگ، ساقه، دم برگ، مریستم و کالوس جوانه روی ساقه (شکل ۲) برای بررسی کالوس‌دهی ریزنمونه تهیه شد. این ریزنمونه‌ها در محیط کشت MS دارای ۳۰ گرم در لیتر ساکارز و ۷ گرم در لیتر آگار و غلظت‌های مختلف

درخت "به" (*Cydonia oblonga*) تک گونه‌ای از خانواده Rosaceae، می‌باشد (Postman, 2009). این گیاه با آب و هوای گرم و مدیترانه‌ای سازگاری دارد (Lim, 2012). گیاه "به" سومین عضو مهم و اقتصادی درختان میوه دانه‌دار که نسبت به دیگر درختان معتدله، درختی کم توقع است (Sabeti, 1996). این درخت در ایران به صورت وحشی در جنگل‌های شمال کشور از آستارا تا کتول گرگان پراکنش داشته و به‌طور عمده در استان‌هایی نظیر اصفهان، خراسان، قزوین، تهران و اردبیل در ایجاد باغ استفاده می‌شود (Khoram Del *et al.*, 2010). موسیلاژی که از سلول‌های اپیدرمی پوشش دانه این گیاه به بیرون ترشح می‌شود کاربردهای زیادی در صنایع مختلف از جمله صنایع غذایی و صنایع بهداشتی دارد و از دوران باستان برای بهبود گلو درد و بیماریهای تنفسی از آن استفاده می‌شود (Nikoofar *et al.*, 2013; Azad bakht, 2007; Lim, 2012). جوشانده برگ درخت "به"، ورم چشم را مداوا می‌کند. آب "به" و هیدروالکلی "به" برای درمان بیماری کولیت زخمی (پس روده آماس) مؤثر واقع بوده است (Minaiyan, 2012). همچنین عصاره استخراج شده از برگ و میوه و پوست "به" در درمان بیماری چربی خون و فشار خون بالا مؤثر بوده است (Ablat Abliz, 2014; Wen-ting Zhou, 2014; Elzira Abdusalam, 2014). کشت بافت و سلول‌های گیاهی در محیط کشت حاوی مواد مغذی، به‌عنوان منبع تأمین کننده مواد ارزشمند و باززایی از آن‌ها، از کاربردهای بیوتکنولوژی می‌باشد و به‌عنوان روشی برای کاهش هزینه‌های تولید این مواد با ارزش گزارش شده است. از جمله کارکردهای بیوتکنولوژی، مهندسی کشت بافت و تکنیک‌های وابسته به آن است که کاربردهای بسیاری در علوم مختلف از جمله کشاورزی دارد. در گیاه "به" عمدتاً به‌منظور کالوس‌زایی و باززایی از ریزنمونه‌های برگ استفاده شده است (Morini *et al.*, 2000. Bllocchi *et al.*, 2001; Fisichella *et al.*, 2000). در اکثر مطالعات

اثر ترکیب‌های مختلف تنظیم‌کننده‌های رشد بر روی کالوس‌زایی ...

کالوس‌ها اندازه‌گیری شدند و در کل مراحل کالوس‌ها در شرایط تاریکی و دمای 25 ± 2 قرار گرفتند. این تحقیق به صورت یک آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کامل تصادفی با ۳ تکرار انجام شد و جهت تجزیه و تحلیل داده‌های حاصل از آزمایش از نرم افزار آماری Mstat-C و محیط Excel استفاده شد.

تنظیم‌کننده رشد 2,4-D (۱، ۲ و ۴ میلی‌گرم در لیتر) و تنظیم‌کننده رشد BAP (۱/۰، ۲/۰ و ۱ میلی‌گرم در لیتر) با $5/8 \text{pH}$ کشت گردیدند. ریزنمونه‌ها پس از قرار گیری در محیط کشت ذکر شده برای القای کالوس‌زایی چهار هفته در تاریکی قرار داده شدند و سپس واگشت اول ریزنمونه‌ها صورت گرفت و بعد از گذشت چهار هفته واگشت دوم ریزنمونه‌ها انجام شد و در هر مرحله اندازه وزن تر و خشک



شکل ۱- قرار گرفتن ساقه‌ها در محیط کشت (الف)، جوانه زدن جوانه‌ها (ب)
Figure 1. We shoot in medium (A), germinating buds (B)



شکل ۲- ایجاد کالوس در اطراف جوانه‌های روی ساقه
Figure 2. Create callus around the buds on the stems

نتایج تجزیه واریانس صفات مورد بررسی در واگشت اول و دوم به ترتیب در جدول ۱ و ۲ ارائه شده است. بر اساس نتایج بدست آمده، اختلاف معنی‌داری میان سطوح مختلف تنظیم‌کننده رشد نامبرده در سطح احتمال ۱ درصد برای تمامی صفات مورد بررسی در واگشت اول و دوم ملاحظه گردید. معنی‌دار شدن این عامل نشان از وجود پاسخ‌های متفاوت گیاه "به" به سطوح مختلف هورمون مذکور از لحاظ کالوس‌دهی می‌دهد. اثر ریزنمونه در سطح احتمال ۱

نتایج و بحث

مطالعه حاضر به منظور گزینش بهترین ترکیب هورمونی جهت کالوس‌زایی انجام شد که در مجموع از ۶ ترکیب هورمونی مختلف استفاده شد. اولین واکنش ریزنمونه‌ها به تشکیل کالوس بعد از یک هفته مشاهده گردید.

اثر تنظیم‌کننده رشد 2,4-D بر کالوس‌دهی

D با ریزنمونه برگ عکس العمل مطلوبی از خود نشان نداد. در واکشت دوم برای صفات اندازه کالوس و وزن تر کالوس، بهترین تولید کالوس در تیمار یک میلی گرم در لیتر 2,4-D با ریزنمونه کالوس جوانه روی ساقه و کمترین کالوس زایی در تیمارهای چهار میلی گرم در لیتر 2,4-D با ریزنمونه برگ و ساقه مشاهده گردید. صفت وزن خشک در تیمار یک میلی گرم در لیتر 2,4-D با ریزنمونه ساقه پاسخ مطلوبی نشان داد.

به عبارت دیگر در واکشت اول برای تشکیل کالوس، محیط کشت پایه MS با غلظت ۴ میلی گرم در لیتر مطلوب بود؛ اما در واکشت بعدی در غلظت ۱ میلی گرم در لیتر کالوسها پاسخ مناسبی نشان دادند. نکته قابل توجه این می باشد که در هر دو واکشت، ریزنمونه کالوس جوانه روی ساقه ثابت بوده است و تغییری در سطوح این عامل وجود نداشته است. روی و همکاران (Roy et al., 2008) گزارش کردند که محیط کشت حاوی 2,4-D به تنهایی جهت تولید کالوس مؤثر نیست، نتایج آزمایش حاضر یافته های محققین یاد شده را تأیید نمی کند. مورینی و همکاران (Morini et al., 2000) نیز برای کالوس زایی گیاه "به" از ریزنمونه برگ با غلظت های مختلف 2,4-D و طول دوره القای نورهای مختلف مورد آزمایش قرار دادند و اذعان نمودند با افزایش مقدار غلظت 2,4-D و افزایش دوره القا نوردهی کالوس دهی افزایش می یابد. این نتایج تا حدودی با نتایج حاصل از آزمایش حاضر مطابقت داشت.

درصد معنی دار و نشان از وجود تفاوت در بین سطوح مختلف ریزنمونه ها برای همه صفات داد. اثرات متقابل تنظیم کننده رشد با ریزنمونه برای تمامی صفات معنی دار بود و این نشان می دهد که اثرات اصلی فارغ از سطوح مختلف عامل دیگر عمل نمی کند به عبارتی اثرات اصلی با تغییر سطوح عامل دیگر تحت تأثیر قرار می گیرد و پاسخ متفاوتی نشان می دهد.

با توجه به معنی دار شدن اثر متقابل تنظیم کننده رشد با ریزنمونه و اهمیت بالای آن نسبت به اثرات اصلی، از آزمون چند دامنه ای دانکن در سطح احتمال ۱ درصد جهت انجام مقایسه میانگین تیمارها استفاده شد و نتایج آن در جدول شماره ۳ (واکشت اول) و ۴ (واکشت دوم) ارائه گردید. طبق نتایج حاصله، در واکشت اول برای صفت اندازه کالوس تیمار ۴ میلی گرم در لیتر 2,4-D با ریزنمونه کالوس جوانه بر روی ساقه نسبت به سایر ترکیبات تیمارها عکس العمل مطلوبی نشان داد و در گروه برتر آماری (a) قرار گرفت. تیمار یک میلی گرم در لیتر 2,4-D با کالوس جوانه روی ساقه برای این صفت با کمترین کالوس دهی در ضعیف ترین گروه آماری قرار گرفت. تیمار ۱ میلی گرم در لیتر 2,4-D با ریزنمونه کالوس جوانه روی ساقه برای صفت وزن تر بهترین کالوس دهی و تیمار ۴ میلی گرم در لیتر 2,4-D با ریزنمونه دم برگ برای صفت مذکور نامناسب ترین پاسخ را نشان داد. در صفت وزن خشک تیمار ۱ میلی گرم در لیتر با ریزنمونه کالوس جوانه روی ساقه با بهترین عملکرد کالوس دهی داشت و تیمار ۲ میلی گرم بر لیتر 2,4-D

جدول ۱- جدول تجزیه واریانس صفات مورد مطالعه برای واکشت اول 2,4-D

Table 1. Studied analysis of variance table for first subculture 2,4-D.

منابع تغییر	درجه آزادی	اندازه کالوس	وزن تر	وزن خشک
S.O.V	Df	Callus size	Wet weight	Dry weight
2,4-D	2	0.057**	0.093**	0.005**
Explant	4	1.26**	2.67**	0.024**
2,4-D×Explant	8	0.047**	0.054**	0.006**
Error	30	0.003	0.001	0.0000085
Cv (%)		4.68	9.04	7.17

*, **, ns: معنی دار در سطح احتمال ۵ و ۱ درصد و غیر معنی دار

*, **, and ns: Significant at 5 percent, 1 percent and non-significant

اثر ترکیب‌های مختلف تنظیم‌کننده‌های رشد بر روی کالوس‌زایی ...

جدول ۲- جدول تجزیه واریانس صفات مورد مطالعه برای واكشت دوم 2,4-D

Table 2. Studied analysis of variance table for second subculture 2,4-D

منابع تغییر	درجه آزادی	اندازه کالوس	وزن تر	وزن خشک
S.O.V	Df	Callus size	Wet weight	Dry weight
2,4-D	2	3.08**	2.03**	0.194**
Explant	4	0.132**	0.26**	0.049**
2,4-D×Explant	8	0.162**	0.16**	0.061**
Error	30	0.014	0.001	0.0001
Cv(%)		8.39	8.90	14.80

*, **, ns: معنی دار در سطح احتمال ۵ و ۱ درصد و غیرمعنی دار

*, **, and ns: Significant at 5 percent, 1 percent and non- significant

جدول ۳- نتایج مقایسه میانگین ترکیبات تیمارها در واكشت اول 2,4-D

Table 3. Results of the average concentrations of 2,4-D in the first subculture 2,4-D

ردیف	ترکیبات تیمارها	اندازه کالوس	وزن تر کالوس	وزن خشک کالوس
Row	Treatment combinations	Callus size	Wet weight	Dry weight
1	1 mg.l ⁻¹ 2,4-D + Shoot	0.950de	0.146d	0.070c
2	1 mg.l ⁻¹ 2,4-D + Leaf	0.950de	0.101defg	0.011gh
3	1 mg.l ⁻¹ 2,4-D + Leaf tail	0.750f	0.058efd	0.001i
4	1 mg.l ⁻¹ 2,4-D + Meristem	0.933de	0.156d	0.016fgh
5	1 mg.l ⁻¹ 2,4-D + Callus buds on stem	1.467c	1.633a	0.123b
6	2 mg.l ⁻¹ 2,4-D + Shoot	0.966d	0.045fg	0.019f
7	2 mg.l ⁻¹ 2,4-D + Leaf	0.950de	0.066efg	0.010h
8	2 mg.l ⁻¹ 2,4-D + Leaf tail	0.966d	0.129de	0.017fg
9	2 mg.l ⁻¹ 2,4-D + Meristem	0.816ef	0.054efg	0.010gh
10	2 mg.l ⁻¹ 2,4-D + Callus buds on stem	1.817b	1.026c	0.044d
11	4 mg.l ⁻¹ 2,4-D + Shoot	0.950de	0.105defg	0.015fgh
12	4 mg.l ⁻¹ 2,4-D + Leaf	1.000d	0.124def	0.011gh
13	4 mg.l ⁻¹ 2,4-D + Leaf tail	0.783f	0.040g	0.025e
14	4 mg.l ⁻¹ 2,4-D + Meristem	0.950de	0.059efg	0.011gh
15	4 mg.l ⁻¹ 2,4-D + Callus buds on stem	1.950a	1.265b	0.226a

اعداد دارای حروف مشترک، تفاوت معنی داری بر اساس آزمون چند دامنه‌ای دانکن ندارند.

Numbers with same letter do not significant difference base Duncan multiple range test

جدول ۴- نتایج مقایسه میانگین ترکیبات تیمارها در واكشت دوم 2,4-D

Table 4. Results of the average concentrations of 2,4-D in the second subculture 2,4-D

ردیف	ترکیبات تیمارها	اندازه کالوس	وزن تر کالوس	وزن خشک کالوس
Row	Treatment combinations	Callus size	Wet weight	Dry weight
1	1 mg.l ⁻¹ 2,4-D + Shoot	2.000ab	0.766b	0.563a
2	1 mg.l ⁻¹ 2,4-D + Leaf	1.800bc	0.606c	0.353b
3	1 mg.l ⁻¹ 2,4-D + Leaf tail	1.617c	0.369de	0.010e
4	1 mg.l ⁻¹ 2,4-D + Meristem	1.833bc	0.768b	0.060d
5	1 mg.l ⁻¹ 2,4-D + Callus buds on stem	2.133a	1.438a	0.105c
6	2 mg.l ⁻¹ 2,4-D + Shoot	1.100de	0.157fg	0.012e
7	2 mg.l ⁻¹ 2,4-D + Leaf	1.267de	0.166f	0.015e
8	2 mg.l ⁻¹ 2,4-D + Leaf tail	1.333d	0.306e	0.026e
9	2 mg.l ⁻¹ 2,4-D + Meristem	1.030e	0.090fgh	0.013e
10	2 mg.l ⁻¹ 2,4-D + Callus buds on stem	1.100de	0.113fg	0.005e
11	4 mg.l ⁻¹ 2,4-D + Shoot	0.700f	0.025h	0.005e
12	4 mg.l ⁻¹ 2,4-D + Leaf	1.168de	0.084gh	0.009e
13	4 mg.l ⁻¹ 2,4-D + Leaf tail	0.700f	0.024h	0.005e
14	4 mg.l ⁻¹ 2,4-D + Meristem	1.267de	0.110fg	0.010e
15	4 mg.l ⁻¹ 2,4-D + Callus buds on stem	1.333d	0.437d	0.116c

اعداد دارای حروف مشترک، تفاوت معنی داری بر اساس آزمون چند دامنه‌ای دانکن ندارند.

Numbers with same letter do not significant difference base Duncan multiple range test.

اثر تنظیم کننده رشد BAP بر کالوس دهی

نتایج حاصل از انجام تجزیه واریانس نشان داد که اختلاف معنی داری ($P < 0.001$) در عامل BAP برای صفات اندازه و وزن تر کالوس در واکشت اول وجود دارد به بیان دیگر با تغییر سطوح اثر BAP صفات ذکر شده پاسخ های مختلفی بروز می دهند. صفت وزن خشک کالوس به تغییرات سطح BAP واکنشی نشان نداد و در تمامی سطوح پاسخ یکسانی داشت (جدول ۵). اثر این هورمون در واکشت دوم برای تمامی صفات اختلاف معنی داری را نشان داد. عامل ریزنمونه در هر دو واکشت برای همه صفات مورد مطالعه (اندازه کالوس، وزن تر کالوس، وزن خشک کالوس) معنی دار شد و نشان داد که سطوح مختلف ریزنمونه، تولید کالوس را تحت تأثیر قرار می دهد. اثر متقابل تنظیم کننده رشد و ریزنمونه برای تمامی صفات مورد بررسی در هر دو واکشت اختلاف معنی داری را در سطح احتمال ۱ درصد نشان داد (جدول ۵ و ۶).

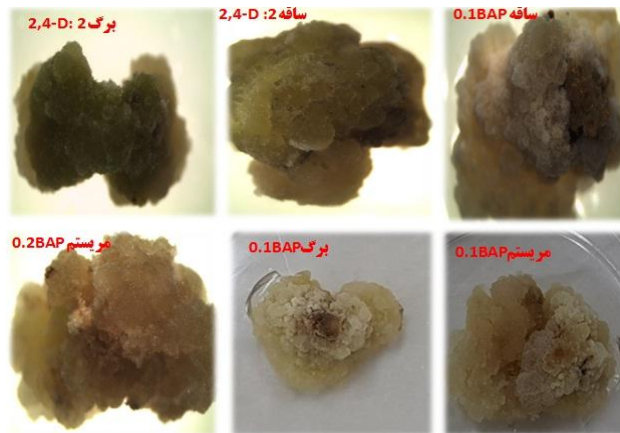
نتایج مقایسه میانگین (جدول ۷ و ۸) حاکی از آن بود که تیمار یک میلی گرم در لیتر BAP با ریزنمونه کالوس جوانه روی ساقه برای واکشت اول در تمامی صفات مورد مطالعه در بیشترین حجم تولید کالوس خود بوده و به تنهایی در گروه آماری (a) قرار گرفت. با توجه به این که سه صفت اندازه کالوس، وزن تر کالوس و وزن خشک از لحاظ بهترین ترکیب پاسخ مشابهی داشتند، اما از لحاظ نامناسب ترین ترکیبات تیماری مشابه نبودند و هر یک از صفات در تیمارهای مختلفی پاسخ های نامناسبی نشان داد (جدول ۷). نتایج مقایسه میانگین واکشت دوم برای صفات اندازه کالوس و وزن تر کالوس تیمار ۰/۱ میلی گرم در لیتر BAP با ریزنمونه مریستم را به عنوان بهترین ترکیب تیماری معرفی نمود، برای صفت وزن خشک تغییری در غلظت هورمون وجود نداشت و تنها عامل ریزنمونه باعث ایجاد تغییر در مقایسه با مناسب ترین ترکیب هورمونی دو صفت اندازه

کالوس و وزن تر کالوس با بهترین ترکیب تیماری وزن خشک کالوس شد به عبارتی در ترکیب ۰/۱ میلی گرم در لیتر BAP با ریزنمونه کالوس جوانه روی ساقه برای صفت مذکور مطلوب ترین نتیجه حاصل گردید (جدول ۸). نتایج مقایسه میانگین با آزمون چند دامنه ای دانکن حاکی از این موضوع است که کالوس زایی تنها تحت تأثیر تیمارهای هورمونی نمی باشد بلکه عامل ریزنمونه نیز در تشکیل کالوس دخالت دارد.

نتیجه گیری کلی

این تحقیق به ما نشان داد که غلظت های مختلف هورمون های رشدی بر تولید کالوس در محیط کشت پایه MS تأثیر به سزایی دارد و پاسخ ریزنمونه های مختلف به ترکیبات هورمونی متفاوت است. به طور کلی در تنظیم کننده های رشد BAP و 2,4-D بهترین کالوس دهی در واکشت اول و دوم متعلق به ریزنمونه کالوس جوانه روی ساقه چوبی بود و بدترین کالوس دهی در واکشت اول و دوم مربوط به ریزنمونه دم برگ بود. نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که جهت کالوس زایی از ریزنمونه های مختلف گیاه "به"، وجود تنظیم کننده های رشد ضروری است. در این رابطه توسط سایر محققان در دیگر گونه های گیاهی نتایج مشابهی ثبت گردیده است (Ahmad et al., 2011; Jayasree et al., 2001; Yasmin et al., 2003; Abd Elaleem et al., 2009). تغییر مقدار ترکیبات تنظیم کننده های رشد BAP و 2,4-D تفاوت چشم گیری در روند کالوس زایی اعمال می کند که مطالعات متعددی در این رابطه وجود دارد که تأیید کننده نتایج آزمایش حاضر است (Sujatha et al., 2007; Basalma et al., 2008). پس از بررسی های آماری نتایج نشان داد که تمام ترکیبات هورمونی در این تحقیق کالوس زایی را در ریزنمونه های مختلف به همراه داشته است (شکل ۳).

اثر ترکیب‌های مختلف تنظیم‌کننده‌های رشد بر روی کالوس‌زایی ...



شکل ۳- استفاده از ریزنمونه‌ها و غلظت‌های مختلف هورمون 2,4-D و BAP
Figure 3. Used explants and different concentrations 2,4-D and BAP

جدول ۵- جدول تجزیه واریانس صفات مورد مطالعه برای واگشت اول BAP

Table 5. Studied analysis of variance table for first subculture BAP

منابع تغییر	درجه آزادی	اندازه کالوس	وزن تر	وزن خشک
S.O.V	Df	Callus size	Wet weight	Dry weight
BAP	2	0.125**	0.17**	0.00003 ^{ns}
Explant	4	3.68**	3.28**	0.01**
BAP×Explant	8	0.39**	0.29**	0.001**
Error	30	0.005	0.002	0.00003
Cv (%)		5.59	8.075	14.76

*, **, و ns: معنی‌دار در سطح احتمال ۵ و ۱ درصد و غیر معنی‌دار

*, **, and ns: Significant at 5 percent, 1 percent and non- significant.

جدول ۶- جدول تجزیه واریانس صفات مورد مطالعه برای واگشت دوم BAP

Table 6. Studied analysis of variance table for second subculture BAP

منابع تغییر	درجه آزادی	اندازه کالوس	وزن تر	وزن خشک
S.O.V	Df	Callus size	Wet weight	Dry weight
BAP	2	4.45**	2.34**	0.23**
Explant	4	2.12**	4.93**	0.20**
BAP×Explant	8	0.74**	0.84**	0.10**
Error	30	0.018	0.003	0.0001
Cv (%)		8.87	6.40	11.82

*, **, و ns: معنی‌دار در سطح احتمال ۵ و ۱ درصد و غیر معنی‌دار

*, **, and ns: Significant at 5 percent, 1 percent and non- significant.

جدول ۷- نتایج مقایسه میانگین ترکیبات تیمارها در واکشت اول BAP

Table 7. Results of the average concentrations of BAP in the first subculture BAP

ردیف	ترکیبات تیمارها	اندازه کالوس	وزن تر کالوس	وزن خشک کالوس
Row	Treatment combinations	Callus size	Wet weight	Dry weight
1	1 mg.l ⁻¹ BAP + Shoot	0.493g	0.092f	0.017g
2	1 mg.l ⁻¹ BAP + Leaf	1.017e	0.064f	0.002h
3	1 mg.l ⁻¹ BAP + Leaf tail	0.476g	0.883d	0.030ef
4	1 mg.l ⁻¹ 2BAP + Meristem	0.993e	0.080f	0.007gh
5	1 mg.l ⁻¹ BAP + Callus buds on stem	2.750a	2.040a	0.125a
6	0.1 mg.l ⁻¹ BAP + Shoot	1.417d	0.320e	0.045d
7	0.1 mg.l ⁻¹ BAP + Leaf	0.996e	0.334e	0.031e
8	0.1 mg.l ⁻¹ BAP + Leaf tail	0.963e	0.107f	0.018fg
9	0.1 mg.l ⁻¹ BAP + Meristem	1.400d	0.409e	0.040de
10	0.1 mg.l ⁻¹ BAP + Callus buds on stem	1.867c	1.217c	0.064c
11	0.2 mg.l ⁻¹ BAP + Shoot	0.783f	0.102f	0.014gh
12	0.2 mg.l ⁻¹ BAP + Leaf	1.033e	0.107f	0.016g
13	0.2 mg.l ⁻¹ BAP + Leaf tail	0.550g	0.083f	0.015g
14	0.2 mg.l ⁻¹ BAP + Meristem	1.517d	0.323e	0.038de
15	0.2 mg.l ⁻¹ BAP + Callus buds on stem	2.300b	1.489b	0.104b

اعداد دارای حروف مشترک، تفاوت معنی داری بر اساس آزمون چند دامنه‌ای دانکن ندارند.

Numbers with same letter do not significant difference base Duncan multiple range test

جدول ۸- نتایج مقایسه میانگین ترکیبات تیمارها در واکشت دوم BAP

Table 8. Results of the average concentrations of BAP in the second subculture BAP

ردیف	ترکیبات تیمارها	اندازه کالوس	وزن تر کالوس	وزن خشک کالوس
Row	Treatment combinations	Callus size	Wet weight	Dry weight
1	1 mg.l ⁻¹ BAP + Shoot	0.75fg	0.023i	0.003h
2	1 mg.l ⁻¹ BAP + Leaf	0.950ef	0.080hi	0.037ef
3	1 mg.l ⁻¹ BAP + Leaf tail	0.566g	0.046i	0.005gh
4	1 mg.l ⁻¹ 2BAP + Meristem	0.516g	0.010i	0.002h
5	1 mg.l ⁻¹ BAP + Callus buds on stem	2.550b	2.158b	0.118c
6	0.1 mg.l ⁻¹ BAP + Shoot	1.600d	0.509g	0.069d
7	0.1 mg.l ⁻¹ BAP + Leaf	1.917c	0.649f	0.063d
8	0.1 mg.l ⁻¹ BAP + Leaf tail	1.750cd	0.515g	0.052de
9	0.1 mg.l ⁻¹ BAP + Meristem	3.000a	2.515a	0.199b
10	0.1 mg.l ⁻¹ BAP + Callus buds on stem	2.317b	1.930c	0.913a
11	0.2 mg.l ⁻¹ BAP + Shoot	1.217e	0.207h	0.029efg
12	0.2 mg.l ⁻¹ BAP + Leaf	1.170e	0.206h	0.023fgh
13	0.2 mg.l ⁻¹ BAP + Leaf tail	0.833fg	0.123hi	0.012gh
14	0.2 mg.l ⁻¹ BAP + Meristem	1.533d	1.305e	0.067d
15	0.2 mg.l ⁻¹ BAP + Callus buds on stem	1.933c	1.450d	0.113c

اعداد دارای حروف مشترک، تفاوت معنی داری بر اساس آزمون چند دامنه‌ای دانکن ندارند.

Numbers with same letter do not significant difference base Duncan multiple range test

References

- Abd Elaleem KG., RS. Modawi., and MM. Khalafalla. 2009.** Effect of plant growth regulators on callus induction and plant regeneration in tuber segment culture of potato (*Solanum tuberosum* L.) cultivar Diamant. *African J. Biotech.* 8 (11): 2529-2534.
- Ablat Abliz, Q. E. (2014).** Effect of *Cydonia oblonga* Mill. leaf extract on serum lipid and liver function in a rat model of hyperlipidaemia. *Journal of Ethnopharmacology* , 970-974.
- Ahmad N., H. Fazal., and R. Zamir. 2011.** Callogenesis and shoot organogenesis from flowers of *Stevia rebaudiana* (Bert.). *Sugar Tech.* 13(2): 174-177
- Arulselvi, I. P., and S. Krishnaveni. 2009.** Effect of hormones, explants and genotypes in in vitro culturing of sorghum. *Journal of Biochemical Technology.* 1(4):96-103
- Asghari, Gh. S. Emami., M. Hojati., A. Shakori., Z. Veliyan., and M. Asghari. 2013.** Evaluation of the production of artemisinin in the plant, callus culture and cell suspension culture *Artemisia aucheri*. *Journal of cell and culture.* 4(3): 243-250
- Basalma D., S. Uranbey., S. Mirici., and O. Kolsarici. 2008.** TDZ×IBA induced shoot regeneration from cotyledonary leaves and *in vitro* multiplication in safflower (*Carthamus tinctorius* L.). *African J. Biotech.* 7(8): 960-966.
- D' Onofrio, C., and S. Morini. 2006.** Somatic embryo, adventitious root and shoot regeneration in in vitro grown quince leaves as influenced by treatments of different length with growth regulators. *Scientia Horticulturae* 107 (2006) 194–199
- Elzira Abdusalam, W. Z. 2014.** Effect of *Cydonia oblonga* Mill. fruit and leaf extracts on blood pressure and blood rheology in renal hypertensive rats. *Journal of Ethnopharmacology* , 464-469.
- Fisichella, M., E. Silvi., and S. Morini. 2000.** Regeneration of somatic embryos and roots from quince leaves cultured on media with different macro element composition. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture.* 63:101-107.
- Jayasree T., U. Pavan., M. Ramesh., and AV. Rao AV. 2001.** Somatic embryogenesis from leaf culture of potato. *Plant Cell Tiss Organ Cult.* 64: 13-17.
- Khoram Del, M., H. Abdollahii., A. ghasemi., and Sh. Haj Mansoor. 2010.** Transfer of SSR markers apple to genotypes quince (*Cydonia oblonga* Mill.). *Seed and Plant journal* 26(4):451-467
- Khosravi Nezhad, F., H. Abdollahi., B. Kashefi., M. Hassani., and Z. Salehi. 2016.** Evaluation of vitro micropropagation of some of the variety quince (*Cydonia oblonga* Mill.). *Journal of Horticultural Science.* (1) 135-144.
- Lim, T. K. 2012.** *Cydonia oblonga*. Pp 371-379. In: Edible medicinal and nonmedicinal plants. Vol 4, Fruits. Springer Science.
- M. Minaiyan, A. G. 2012.** A study of the effects of *Cydonia oblonga* Miller (Quince) on TNBS-induced ulcerative colitis in rats. *Research in Pharmaceutical Sciences* .7(2).103-110.
- Mohammadi-Nasab, A., A. Motallebi-Azar., A. Movafeghi., and M. Dadpour. 2011.** Callus induction and embryogenesis of Alfalfa (*Medicago sativa* L.) using hypocotyl Thin Cell Layer culture. *Russian Agricultural Sciences.* 37(4): 303-306.
- Morini, S., C. D'Onofrio., G. Bellocchi., and M. Fisichella. 2000.** Effect of 2,4-D and light quality on callus production and differentiation from in vitro cultured quince leaves. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture.* 63:47-55.
- Nikoofar, E., M. Hojjatoleslami., and M.A Shariaty. 2013.** Surveying the effect of quince seed mucilage as a fat replacer on texture and physicochemical properties of semi fat set yoghurt. *International Journal of Farming and Allied Sciences.* 2(20):861-865
- Postman, J. 2009** *Cydonia oblonga*: The unappreciated quince. 28th International Horticulture Conference in Lisboa, Portugal. (Available at: [http:// www.ars.usda.gov/pwa/corvallis/ncgr](http://www.ars.usda.gov/pwa/corvallis/ncgr)).

- Roy A., S. Ghosh., M. Chaudhuri., and PK. Saha. 2008.** Effect of different plant hormones on callus induction in *Gymnema sylvestris* R.BR. (Asclepiadaceae). African J. Biotech. 7(13) 2209-2211.
- Sabeti, H. 1996** Iranian Forests, Trees and Shrubs. Publications of Agricultural and Natural Resources Organization, Tehran, Iran. 810 pp.
- Safar Nezhad, A., L. Alamdari., H. Doroodi., and M. Delbar. 2016.** The effect of growth regulators (IBA and BAP) on regeneration, proliferation and rooting of pear Natanz culture in vitro. Journal of Plant Biology. 8(29): 77-90.
- Salehiyan Aghbal, H., N.A Babaiean Jelodar., Gh.A Ranjbar., and N.A Bagheri. 2012.** The effect of growth regulators on callus and regenerated several varieties of plant breeding rice. Modified Crops Research 10 (4) 93-80.
- Sujatha M., and V. Dinesh Kumar. 2007.** *In vitro* bud regeneration of *Carthamus tinctorius* and wild *Carthamus* species from leaf explants and axillary bud. Biologia Plantarum. 51(4): 782-786.
- Wen-ting Zhou, A. P. 2014.** Effect of *Cydonia oblonga* Mill. leaf extracts or captopril on blood pressure and related biomarkers in renal hypertensive rats. *Journal of Ethnopharmacology* , 28;152(3):464-9
- Yasmin S., KM. Nasiruddin., R. Begum., and SK. Talukder. 2003.** Regeneration and establishment of potato plantlets through callus formation with BAP and NAA. Asian J. Plant Sci. 2(12): 936-940.

Effect of growth regulators on callus induction in Quince (*Cydonia oblonga* Mill.)**E. Faezi¹, M. Omid^{2*}, P. Abdollahi³**

Received date: 14 April 2017

Accepted date: 05 June 2017

Abstract

The quince plant is known as a medicinal plant. *In vitro* and induction of callus from different species of this plant are important and sensitive stages. In the present study, the ability of callusing and direct regeneration in callus medium in explants and various growth regulators were evaluated. From different parts of leaf, stems, meristem, leaf tail and callus were prepared Callus buds on the stem quince. For making callus formation used the MS medium containing three levels of 1, 2 and 4 mg.L⁻¹ of 2,4-D hormone and 0.1, 0.2 and 1 mg.L⁻¹ BAP hormone, each of growth regulators was studied as a factorial experiment in a completely randomized design with three replications on MS medium. Based on the results of analysis of variance in all subcultures, the main effects and interactions were significant for all studied traits, except for the main effect of BAP in the first subculture for dry weight trait. The mean comparison results for the first subculture of 2-4-D were calculated for the size of the callus size of 4 mg.L⁻¹ 2,4-D treatment with the explant of callus buds on the stem (19.5 mm) for the fresh weight gain of the callus treatment 1 mg.L⁻¹ 2, 4-D with callus buds on stem and for the dry weight trait treatment of 1 mg.L⁻¹ with callus buds on the stem was introduced as the most suitable treatments. In the second subculture, for callous size and fresh callus weights, the best callus production was observed in treatment of 1 mg.L⁻¹ 2,4-D with the callus buds on the stem. The dry weight trait showed a favorable response to treatment with 1 mg.L⁻¹ 2,4-D with stem explant. The mean comparison results for BAP growth regulator showed that the treatment of 1 mg.L⁻¹ BAP with callus buds on stem was similar for all three traits. In the second subculture, the traits of the size and weight of the callus were best responded in the treatment with 0.1 mg.L⁻¹ BAP with Meristem explant. The only difference was dry weight with the two traits mentioned in the explant (callus bud on the stem).

Keyword: Quince, Growth regulators, Meristem, Medicinal plant.

1- M. Sc. student, College of Agricultural, Tehran Science and Research branch, Islamic Azad University.

2- Professor, College of Agricultural and Natural Resource, University of Tehran, Karaj, Iran

3- Assistant Professor, Tehran Science and Research branch, Islamic Azad University

* Corresponding author: momidi@ut.ac.ir