مجله علوم باغبانی ایران
دوره ۴۳، شماره ۴، ۱۳۹۱ (۳۹۱-۳۸۱)

بررسی اثر تنظیم کننده‌های رشد پیکلورام و 2,4-D بر کالوس‌زایی ریزنمونه‌های برگ، دمبرگ و آندوسپرم گیاه سیکاس (*Cycas revoluta* Thunb.)

خدیجه محیسنی[1*]، روح انگیز نادری[2] و منصور امیدی[3]
۱، ۲، ۳، دانشجوی سابق کارشناسی ارشد، دانشیار و استاد، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی
(تاریخ دریافت: ۹۰/۴/۵- تاریخ تصویب: ۹۰/۱۰/۱۸)

چکیده

سیکاس (*Cycas revoluta* Thunb.) گیاهی زینتی و همیشه سبز است که شرایط خاصی برای رشد و نمو خود نیاز دارد. این گیاه بسیار زیبا مخصوص مناطق گرم و مرطوب بوده و اولین بار در چین پیدا شده است و تکثیر آن به روش جنسی (بذر) و غیرجنسی (پاجوش) صورت می‌گیرد. با توجه به مزایای تکثیر درون شیشه‌ای نسبت به روش‌های رایج ازدیاد، در پژوهش حاضر اثر نوع و غلظت‌های مختلف مواد تنظیم کننده رشد **2,4-D** (صفر، ۱، ۲ و ۴ میلی‌گرم در لیتر) و پیکلورام (صفر، ۱، ۲/۵، ۵ و ۱۰ میلی‌گرم در لیتر) و نوع ریزنمونه (برگ، دمبرگ و آندوسپرم) بر القای کالوس‌زایی گیاه سیکاس به عنوان یک مرحله اساسی در تکثیر درون شیشه‌ای موفق آن و از طریق اندازه‌گیری صفات وزن‌تر، سطح و حجم کالوس، درصد و زمان کالوس‌زایی بررسی شد. مطالعه بر پایه آزمایش فاکتوریل و در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار صورت گرفت. مطابق نتایج، بیشترین سطح (۳/۳ سانتی مترمربع) و حجم (۵/۸ سانتی متر مکعب) کالوس در ریزنمونه آندوسپرم در غلظت ۱۰ میلی‌گرم در لیتر پیکلورام و کمترین سطح (صفر) و حجم (صفر) کالوس در ریز نمونه برگ در غلظت ۱۰ میلی‌گرم در لیتر پیکلورام بدست آمد. بیشترین وزن‌تر کالوس (۸/۱ گرم) در ریزنمونه دمبرگ در غلظت ۱ میلی‌گرم در لیتر پیکلورام بدست آمد که با مقادیر بدست آمده در اثر پیکلورام ۲/۵ و ۵ میلی‌گرم در لیتر در ریزنمونه دمبرگ و همچنین پیکلورام ۱۰ میلی‌گرم در لیتر در ریزنمونه آندوسپرم تفاوت معنی‌دار نداشت. کمترین وزن‌تر کالوس (صفر) در ریزنمونه برگ در غلظت ۱۰ میلی‌گرم در لیتر پیکلورام مشاهده شد. همچنین، بیشترین درصد کالوس‌زایی در غلظت ۱ میلی‌گرم در لیتر پیکلورام (۱۰۰ ٪) در ریزنمونه های دمبرگ و برگ و کمترین درصد کالوس‌زایی در غلظت ۱۰ میلی گرم در لیتر پیکلورام (صفر) در ریزنمونه برگ مشاهده شد. کمترین زمان کالوس‌زایی (۱۲روز) در ریزنمونه‌های برگ و دمبرگ در غلظت‌های ۱، ۲/۵ و ۵ میلی‌گرم در لیتر پیکلورام و بیشترین زمان کالوس‌زایی (۲۵ روز) نیز در ریزنمونه آندوسپرم با غلظت ۱ میلی‌گرم در لیتر پیکلورام مشاهده شد. به طور کلی تیمار **2,4-D** با غلظت ۴ میلی‌گرم در لیتر برای کالوس‌زایی در هر سه اندام مناسب بود، اگرچه برای آندوسپرم تیمار پیکلورام با غلظت ۱۰ میلی‌گرم در لیتر بهترین تیمار بود. در تیمار شاهد (بدون هورمون) به‌جز در ریزنمونه‌های دمبرگ کالوس‌زایی مشاهده نشد. در این مطالعه بافت و رنگ کالوس حاصل از دو نوع تنظیم کننده رشد مورد استفاده و همچنین نوع ریزنمونه متفاوت بود، به طوری که بافت کالوس حاصل از **2,4-D** شکری و کرم مایل به زرد و کالوس حاصل از پیکلورام خمیری و شیری رنگ بود.

واژه های کلیدی: تنظیم کننده های رشد گیاهی، ریزنمونه، کالوس‌زایی، کشت بافت، سیکاس.

* نویسنده مسئول: خدیجه محیسنی تلفن: ۰۹۳۶۹۹۸۰۸۷۰ E-mail: khmohaiseni@ut.ac.ir

مقدمه

گیاه سیکاس (*Cycas revoluta* Thunb.)، به دلیل دارا بودن برگ‌های زیبا و شرایط خاص نگهداری، یک گیاه آپارتمانی گران‌قیمت محسوب می شود. این گیاه دارای برخی خواص دارویی است و در درمان سرطان و هپاتیت کاربرد دارد (Hill, 1993). سیکاس با نام عمومی Japanese sago palm شناخته می‌شود و متعلق به راسته Cycadales و خانواده Cycadaceae می‌باشد. راسته مذکور شامل ۲ زیر راسته، ۳ خانواده، ۹ جنس و ۱۸۵ گونه بوده و حدواسط بازدانگان و سرخس‌ها به‌شمار می‌رود و گیاهان متعلق به آن در مناطق گرمسیری و نیمه گرمسیری دنیا پراکنش دارند(Jones, 1993).

سیکاس گیاهی دو پایه و همیشه سبز با برگ های سبز روغنی است که برگچه‌های باریک آن به سمت داخل برگشته‌اند (Gilman, 1999). به‌طور کلی سیکاس‌ها گیاهانی کند رشد هستند و برای رسیدن به مرحله زایشی به حدود ۳ تا ۱۰ سال زمان نیاز دارند (Dyer, 1965).

این گیاهان نیازمند شرایط گرم با دما و رطوبت هستند به‌طوری که برای رشد و پرورش بهتر آن‌ها رطوبت نسبی بالای ۸۰ درصد ضروری است. گیاه سیکاس عموماً از طریق بذر و پاجوش تکثیر می‌شود. به‌هر حال، جنین بذرها بعد از برداشت نابالغ بوده و برای بلوغ آن در این گونه ۱۲-۴ ماه زمان نیاز است (Broome, 2001). از سوی دیگر، تکثیر سیکاس از طریق پاجوش مقرون به صرفه نیست چرا که هر پایه مسن و بالغ سیکاس پس از گذشت زمان طولانی تنها ۷-۳ پاجوش تولید می‌کند. سرعت رشد کم، نیاز به شرایط خاص محیطی جهت تولید بذر و قوه‌نامیه کم بذر، بقای سیکاس‌ها را با مشکل مواجه کرده است. امروزه تکنیک‌های کشت درون شیشه‌ای، روش مطلوب جهت تولید انبوه گیاهان به‌شمار می‌روند و به‌عنوان یکی از روش‌های نگهداری گونه‌های در معرض خطر انقراض مطرح هستند (Pick Kiong et al., 2008). با توجه به ویژگی‌های خاص گیاه سیکاس که در بالا ذکر شد تکثیر درون شیشه‌ای این گیاه با محدودیت‌های بسیاری همراه است و به‌همین دلیل مطالعات اندکی در زمینه آن صورت گرفته است.

اولین مطالعه در زمینه کشت درون شیشه‌ای سیکاس رولوتا در سال ۱۹۹۵ به منظور استخراج متابولیت‌های ثانویه انجام شده است. بدین منظور، تولید کالوس از جنین بذر گیاه سیکاس در محیط کشت MS حاوی ۱۰ ppm تنظیم کننده رشد 2,4-D حدود ۲ هفته پس از کشت صورت گرفت. هدف از این تحقیق تولید کالوس و سپس استخراج متابولیت ثانویه سیکازین از کالوس تولید شده بود که این متابولیت در درمان بیماری‌های کبدی بسیار مؤثر است (Tadera et al., 1995). در آزمایشی دیگر جنین‌های بذر گیاهان *Encephalartos dyerianus* و *E. natalensis* که دو گیاه دیگر راسته سیکادالس هستند در محیط حاوی صفر، ۰/۵، ۱ و ۲ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D و صفر، ۱، ۲ و ۳ میلی‌گرم در لیتر کینتین قرار گرفتند. محیط کشت مورد استفاده حاوی نمک‌های ماکرو B_5 (Gamborg et al., 1968) و نمک‌های میکرو MS (Murashige & Skoog., 1962) بود. بهترین کالوس‌زایی نمونه‌ها در تیمار ۱ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D و ۱ میلی‌گرم در لیتر کینتین بدست آمد (Jager & Staden, 1996). در مطالعه‌ای در سال ۱۹۹۹ روی اثر سه محیط کشت MS، SH (Schenk & Hildebrandt) و KK (Klimaszewska & Keller) جهت تولید شاخه‌های نابجا از جنین‌های جنسی و گیاهچه‌های حاصل از بذر سیکاس انجام گرفت، مشخص شد که تعداد شاخه حاصل از بذر در محیط SH به طور معنی‌داری بیشتر از MS بوده است (Rinaldi, 1999). Motohashi و همکاران (۲۰۰۸) نیز از تنظیم کننده رشد BAP با غلظت‌های ۰/۲ و ۲ میلی‌گرم در لیتر و 2,4-D با غلظت‌های صفر و ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر در محیط SH حاوی ۳٪ سوکروز، ۲٪ شیر نارگیل و ۰/۶٪ آگار برای تولید جنین نابجا از جنین‌های جنسی گیاه سیکاس رولوتا استفاده کردند که بیشترین میزان پرآوری جنین‌های نابجا (۸۸/۷٪) در محیط با غلظت ۰/۲ میلی‌گرم BAP و ۰/۲میلی‌گرم در لیتر 2,4-D بدست آمد. در مطالعه‌ای، تأثیر

تنظیم کننده رشد 2,4-D و پیکلورام با غلظت‌های مشابه ۵، ۱۰ و ۲۰ میکرومولار بر لیتر در محیط ½ MS بر کالوس‌زایی ریز نمونه آندوسپرم بذر سیکاس رولوتا مورد بررسی قرار گرفت و بدین منظور غلظت ۲۰ میکرومولار بر لیتر پیکلورام بهترین غلظت کالوس‌زایی در ریزنمونه آندوسپرم این گیاه شناخته شد (Pick Kiong et al., 2008).

با توجه به مزایای تکثیر درون شیشه‌ای نسبت به روش‌های رایج ازدیاد، مطالعه حاضر با هدف بررسی اثر نوع و غلظت‌های مختلف مواد تنظیم کننده رشد و نوع ریزنمونه بر القای کالوس‌زایی گیاه سیکاس که می‌تواند به عنوان یک مرحله اساسی در تکثیر درون شیشه‌ای این گیاه مطرح شود صورت گرفت.

مواد و روش ها

در این مطالعه از ریزنمونه‌های مختلف شامل برگ، دمبرگ و آندوسپرم به منظور القای کالوس‌زایی استفاده شد. ریزنمونه‌های برگ و دمبرگ از کلکسیون واقع در گلخانه‌های گروه علوم و مهندسی باغبانی و فضای سبز پردیس کشاورزی کرج تهیه شدند. بذرهای این گیاه از شمال کشور خریداری و جهت کشت آندوسپرم استفاده شدند. برگ‌های جوان و سالم که یک هفته تا ۱۰ روز سن داشتند از گیاهان پایه انتخاب و جدا شدند. پیش سترون سازی ریزنمونه‌های برگی و دمبرگی با قرار دادن ریزنمونه‌ها در یک ظرف و افزودن چند قطره مایع ظرفشویی و سپس قرار دادن آن‌ها زیر آب جاری به مدت یک ساعت جهت حذف خاک‌ها و دیگر مواد سطحی انجام شد و برای مراحل ضدعفونی نهایی آماده شدند. ریز نمونه‌ها ابتدا در اتانول ۷۰٪ به مدت ۲ دقیقه ضدعفونی شدند. تیمار زمانی ۱۵ دقیقه جهت ضدعفونی نمودن ریز نمونه‌های برگ و دمبرگ با استفاده از هیپوکلریت سدیم ۵ درصد به همراه ۳-۲ قطره توئین ۲۰ اعمال گردید. برای استفاده از آندوسپرم، ابتدا پوسته گوشتی نارنجی رنگ بذر یا سارکوتستا Sarcotesta و پوسته استخوانی آن یا اسکلروتستا Sclerotesta جدا شده و به مدت یک ساعت در زیر آب جاری با اضافه کردن چند قطره مایع ظرفشویی شستشو داده شد و تمامی مراحل ضدعفونی بالا روی آن صورت گرفت. در مرحله ضدعفونی بذر با هیپوکلریت سدیم ۵ درصد تیمار زمانی ۲۵ دقیقه اعمال گردید. سپس نمونه‌ها بوسیله آب مقطر دو بار استریل شده ۴-۳ بار شستشو داده شدند. پس از ضدعفونی سطحی، جهت مقایسه کالوس‌زایی در شرایط درون شیشه‌ای هر یک از ریز نمونه‌ها به طول یک سانتی‌متر برش داده شدند. برای القای کالوس زایی در ریز نمونه‌های برگ، دمبرگ و آندوسپرم، محیط کشت MS حاوی ۳۰ گرم در لیتر ساکارز، ۶ گرم در لیتر آگار- آگار و غلظت‌های مختلف تنظیم کننده‌های رشد 2,4-D (صفر، ۱، ۲ و ۴ میلی‌گرم در لیتر) و پیکلورام (صفر، ۱، ۲/۵، ۵ و ۱۰ میلی‌گرم در لیتر) استفاده شد و pH محیط روی ۵/۹-۵/۷ تنظیم گردید. پس از توزیع محیط کشت، شیشه‌های حاوی ۴۰ میلی لیتر از محیط کشت به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد اتوکلاو شدند. در مرحله بعد شیشه‌ها به زیر هود لامینارفلو انتقال داده شدند و ریزنمونه‌ها روی سطح آنها به طور افقی کشت شدند. شیشه‌های محتوی ریز نمونه در اتاقک رشد در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد تحت شرایط تاریکی نگهداری شدند. واکشت نمونه‌ها هر چهار هفته یکبار انجام شد. پس از گذشت حدود ۸ هفته، ریزنمونه‌های مورد آزمایش بررسی و فرایند کالوس‌زایی در آنها با اندازه‌گیری صفاتی مانند وزن‌تر، سطح و حجم کالوس، درصد و زمان کالوس‌زایی ارزیابی شد. محاسبه ابعاد کالوس‌های حاصل با اندازه‌گیری سطح و حجم آن‌ها صورت گرفت. با توجه به این موضوع که برای اندازه‌گیری سطح کالوس به دلیل نامنظمی شکل کالوس‌ها، می‌بایست از یک روش مطمئن استفاده گردد به همین دلیل جهت اندازه‌گیری سطح کالوس بزرگ‌ترین طول و عرض کالوس ریزنمونه اندازه‌گیری و از حاصل ضرب آنها سطح کالوس بدست آمد. حجم کالوس نیز از ضرب سطح کالوس در بزرگ‌ترین ارتفاع کالوس ریزنمونه حاصل شد. مطالعه بر پایه آزمایش فاکتوریل و در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار و چهار ریز نمونه در هر

تکرار صورت گرفت. در پایان آزمایش، داده‌ها با استفاده از نرم افزار SAS مورد آنالیز واریانس قرار گرفتند و میانگین‌ها نیز مطابق آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ۵ درصد با یکدیگر مقایسه شدند.

نتایج

در این آزمایش، اثر تنظیم کننده های رشد 2,4-D(در غلظت های صفر، ۱، ۲ و ۴ میلی‌گرم در لیتر) و پیکلورام (در غلظت های صفر، ۱، ۲/۵، ۵ و ۱۰ میلی‌گرم در لیتر) بر کالوس‌زایی اندام‌های برگ، دمبرگ و آندوسپرم گیاه سیکاس بررسی شد. نتایج تجزیه واریانس نشان داد که اثر ساده نوع تنظیم کننده رشد و نوع ریزنمونه مورد استفاده و همچنین اثر متقابل آنها بر صفات اندازه‌گیری شده شامل وزن-تر، سطح و حجم کالوس، درصد و زمان کالوس‌زایی در سطح احتمال ۱٪ معنی دار بود (جدول ۱).

جدول ۱- نتایج تجزیه واریانس (میانگین مربعات) اثر نوع ریزنمونه و غلظت تنظیم کننده رشد مورد استفاده بر صفات اندازه‌گیری شده در آزمایش

منابع تغییرات	درجه آزادی	وزن‌ترکالوس (گرم)	سطح کالوس (سانتی‌مترمربع)	حجم کالوس (سانتی‌مترمکعب)	درصدکالوس زایی (٪)	زمان کالوس‌زایی (روز)
تنظیم کننده رشد	۷	۲/۳۵**	۱/۱۴**	۱/۶۱**	۱۳۴۶۹/۸۰**	۱۳۳/۴۰**
ریزنمونه	۲	۹/۷۸**	۲/۴۵**	۳/۶۶**	۱۵۸۵۴/۲۷**	۷۴۴/۱۹**
ریزنمونه × تنظیم کننده رشد	۱۴	۱/۲۷**	۰/۴۱**	۰/۸۵**	۳۵۶۰/۶۶**	۲۲۵/۸۸**
خطای آزمایشی	۱۳۷	۰/۱۲	۰/۰۳	۰/۰۶	۷۷/۴۴	۰/۰۶
کل	۱۶۰					
C.V.	_	۱۶/۶۳	۱۰/۷۸	۱۵/۶۷	۱۳/۲۹	۱/۷۷

** معنی‌دار در سطح احتمال ۱ درصد

نتایج مقایسه میانگین‌ها، در سطح احتمال ۵٪ نشان داد که همه تیمارهای مورد استفاده به‌طور معنی‌داری موجب افزایش وزن‌تر، سطح و حجم کالوس، درصد و زمان کالوس‌زایی ریزنمونه‌های مورد آزمایش شدند. در این مطالعه بالاترین سطح (۲/۹۱ سانتی‌متر مربع)، حجم (۳/۵۳ سانتی‌متر مکعب)، وزن‌تر کالوس (۵/۲۹ گرم) و درصد کالوس‌زایی (۹۵٪) در تیمار ۴ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D بدست آمد. کمترین زمان کالوس‌زایی نیز مربوط به غلظت ۱۰ میلی‌گرم در لیتر پیکلورام (۱۰/۹ روز) و بعد از آن غلظت ۴ میلی‌گرم در لیتر (۱۴/۲ روز) مشاهده شد (جدول ۲).

جدول ۲- اثر نوع تنظیم کننده رشد و غلظت مورد استفاده بر تولید کالوس درگیاه سیکاس رولوتا بعد از ۸ هفته از کشت

تیمار هورمونی (میلی‌گرم در لیتر)	وزن‌تر کالوس (گرم)	سطح کالوس (سانتی متر مربع)	حجم کالوس (سانتی متر مکعب)	درصد کالوس زایی (٪)	زمان کالوس‌زایی (روز)
شاهد	۰/۲۲c	۰/۰۰d	۰/۰۰d	۳/۹۴f	۳۰a
۱ Pic	۳/۹۸b	۱/۳۹c	۱/۲۳c	۸۶/۶۶b	۱۷/۷b
۲/۵ Pic	۳/۹۸b	۱/۴۸c	۱/۴۹c	۶۳/۴۷d	۱۵/۶c
۵ Pic	۴/۷۷ab	۱/۵۴c	۱/۶۹c	۶۲/۶۱d	۱۵/۰c
۱۰Pic	۳/۷۷b	۱/۴۹c	۲/۳۵b	۴۸/۱۸e	۱۰/۹e
۱ 2,4-D	۴/۳۵ ab	۱/۲۷c	۱/۳۱c	۸۰/۶۲c	۱۵/۵c
۲ 2,4-D	۴/۱۴b	۲/۲۰b	۲/۵۸b	۹۰/۵ab	۱۵/۵c
۴ 2,4-D	۵/۲۹a	۲/۹۱a	۳/۵۳a	۹۵a	۱۴/۲d

در هر ستون، اختلاف میانگین‌های دارای حداقل یک حرف مشترک مطابق آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ۵٪ معنی‌دار نمی باشد.

همان طور که در جدول۳ نشان داده شده است میان ریزنمونه های مورد استفاده، ریزنمونه دمبرگ از بالاترین وزن‌تر (۵/۷۷ گرم) و سطح کالوس (۲/۲۷ سانتی‌متر مربع)، درصد کالوس‌زایی (۸۵/۹۴٪)

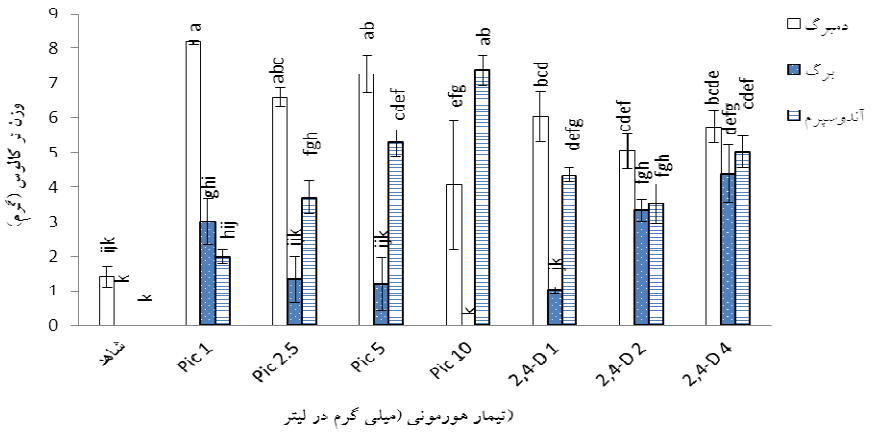
برخوردار بوده است. از سوی دیگر، میزان تولید کالوس به‌طور معنی‌داری در برگ بیشتر از دمبرگ و آندوسپرم بوده است. تفاوت معنی‌داری بین دمبرگ و آندوسپرم در حجم کالوس وجود نداشت در حالی‌که هر دو این ریزنمونه‌ها نسبت به برگ حجم کالوس بیشتری داشتند. در مقایسه بین ریزنمونه‌های آندوسپرم و دمبرگ، وزن‌تر کالوس (۵/۷۷ گرم)، سطح کالوس (۲/۲۷ سانتی‌متر مربع) و درصد کالوس‌زایی (۸۵/۹۴٪) دمبرگ به‌طور معنی‌داری بیشتر از آندوسپرم بود و ریزنمونه های برگ در همه موارد کمترین مقادیر را نشان دادند.

جدول ۳- اثر نوع ریزنمونه مورد استفاده بر تولید کالوس در گیاه سیکاس رولوتا بعد از ۸ هفته از کشت

ریزنمونه	وزن‌تر کالوس (گرم)	سطح کالوس (سانتی متر مربع)	حجم کالوس (سانتی متر مکعب)	درصد کالوس‌زایی (٪)	زمان کالوس‌زایی (روز)
دمبرگ	۵/۷۷a	۲/۲۷a	۲/۴۰a	۸۵/۹۴a	۱۴/۱b
برگ	۱/۵۲c	۰/۵۸c	۰/۵۷b	۳۸/۰۲c	۱۳c
آندوسپرم	۳/۸۴b	۱/۶۹b	۲/۳۰a	۷۰b	۱۹/۵ a

در هر ستون، اختلاف میانگین‌های دارای حداقل یک حرف مشترک مطابق آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ۵٪ معنی‌دار نمی باشد.

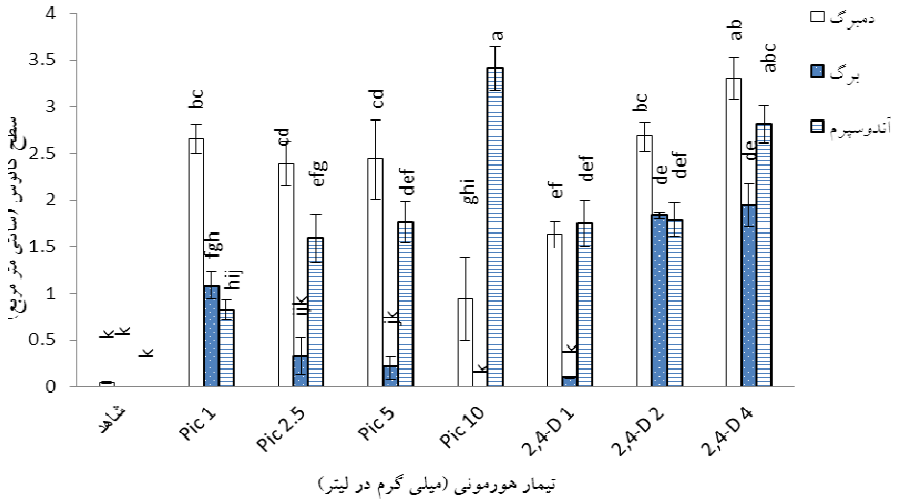
در بررسی اثر متقابل تنظیم کننده رشد (2,4-D و پیکلورام) در نوع ریزنمونه بر وزن‌تر کالوس بیشترین وزن کالوس (۸/۱ گرم) در غلظت ۱ میلی-گرم در لیتر پیکلورام در ریزنمونه دمبرگ مشاهده شد و غلظت‌های ۲/۵ و ۵ میلی‌گرم در لیتر پیکلورام نیز تفاوت معنی‌داری با آن نداشتند. در ریزنمونه برگی کمترین وزن‌تر کالوس (۴ گرم) در غلظت ۱۰ میلی‌گرم در لیتر پیکلورام مشاهده شد. در ریزنمونه برگ، با افزایش غلظت 2,4-D وزن‌تر کالوس افزایش بافت و بیشترین وزن‌ترکالوس (۴/۴ گرم) در غلظت ۴ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D بدست آمد. در ریزنمونه برگ با افزایش غلظت پیکلورام وزن‌تر کالوس کاهش یافت، به‌طوری که کمترین وزن‌تر کالوس (صفر) در غلظت ۱۰ میلی‌گرم در لیتر پیکلورام مشاهده شد. بر خلاف برگ، در ریزنمونه‌های آندوسپرم با افزایش غلظت پیکلورام، وزن‌تر کالوس افزایش یافت و غلظت ۱۰ میلی‌گرم در لیتر پیکلورام بیشترین وزن‌تر کالوس (۷/۳ گرم) را نشان داد. بنابراین برای دمبرگ غلظت ۱ میلی‌گرم در لیتر پیکلورام، برای برگ غلظت ۴ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D و برای آندوسپرم غلظت ۱۰ میلی‌گرم در لیتر پیکلورام بیشترین وزن‌تر کالوس را نشان دادند (شکل ۱).



شکل ۱- اثر متقابل غلظت‌های مختلف 2,4-D و پیکلورام و نوع ریزنمونه بر وزن‌ترکالوس سیکاس رولوتا ($p<۰/۰۵$)

در ریزنمونه دمبرگ، بیشترین سطح کالوس به ترتیب ۳/۲ و ۲/۶ سانتی‌متر مربع در غلظت ۴ و ۲ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D و ۱ میلی‌گرم در لیتر پیکلورام (۲/۶ سانتی‌مترمربع) و کمترین سطح

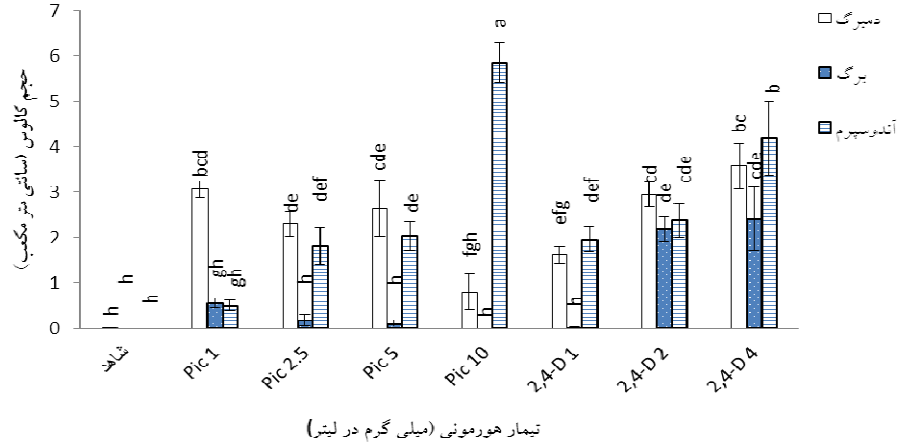
کالوس (۰/۹ سانتی‌متر مربع) در غلظت ۱۰ میلی‌گرم در لیتر پیکلورام مشاهده شد. در ریزنمونه برگ با افزایش غلظت 2,4-D سطح کالوس افزایش یافت، به طوری که در غلظت‌های ۲ و ۴ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D به ترتیب (۱/۸ و ۱/۹ سانتی‌متر مربع) بیشترین سطح کالوس بدست آمد. از طرفی با افزایش غلظت پیکلورام سطح کالوس در ریزنمونه برگی کاهش یافت، به‌طوری که کمترین سطح کالوس (صفر) در غلظت ۱۰ میلی‌گرم در لیتر پیکلورام مشاهده شد. در ریز نمونه آندوسپرم با افزایش غلظت هر دو تنظیم کننده رشد، سطح کالوس افزایش یافت. بیشترین سطح کالوس (۳/۳ سانتی‌متر مربع) در غلظت ۱۰ میلی‌گرم در لیتر پیکلورام و ۴ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D (۲/۸ سانتی‌متر مربع) و کمترین سطح کالوس (۰/۸ سانتی‌متر مربع) در غلظت ۱ میلی‌گرم در لیتر پیکلورام دیده شد. به‌طور کلی، غلظت ۴ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D در هر سه ریزنمونه سطح کالوس بیشتری نشان داد، اگرچه غلظت ۱۰ میلی‌گرم در لیتر پیکلورام تأثیر بیشتری در افزایش سطح کالوس در ریزنمونه آندوسپرم داشت (شکل ۲).



شکل ۲- اثر متقابل غلظت‌های مختلف 2,4-D و پیکلورام و نوع ریزنمونه بر سطح کالوس سیکاس رولوتا ($p<۰/۰۵$)

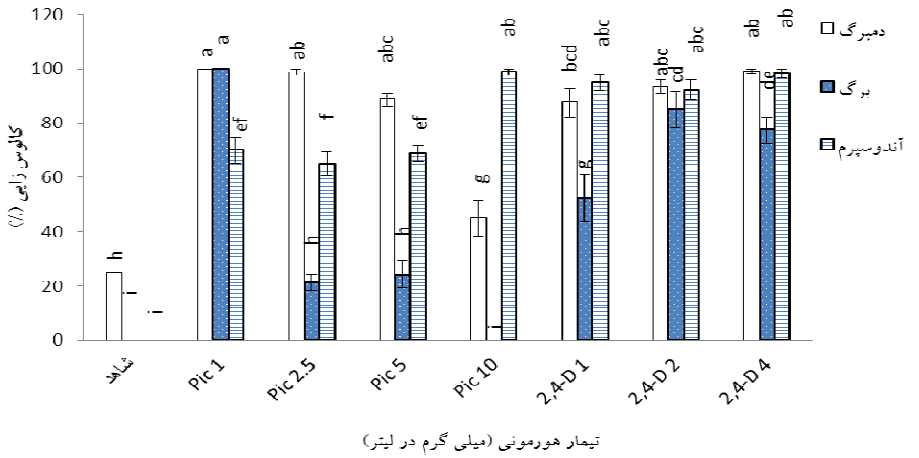
در ریزنمونه دمبرگ، بیشترین حجم کالوس به ترتیب ۳/۵ و ۲/۹ سانتی‌متر مکعب در غلظت‌های ۴ و۲ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D و غلظت ۱ میلی‌گرم در لیتر پیکلورام و کمترین حجم کالوس (۰/۸سانتی‌متر مکعب) در غلظت ۱۰ میلی‌گرم در لیتر پیکلورام مشاهده شد. در ریزنمونه برگ، تنها غلظت‌های بالای 2,4-D (۲ و ۴ میلی‌گرم در لیتر) حجم کالوس را نسبت به شاهد افزایش دادند. در ریزنمونه آندوسپرم با افزایش غلظت هر دو تنظیم کننده رشد پیکلورام و 2,4-D ، حجم کالوس افزایش یافت و بیشترین حجم کالوس (۵/۸ سانتی‌مترمکعب) در آندوسپرم در غلظت ۱۰ میلی‌گرم در لیتر پیکلورام و کمترین حجم کالوس (۰/۵سانتی‌متر مکعب) در غلظت ۱ میلی‌گرم در لیتر پیکلورام مشاهده شد. در مجموع غلظت ۴ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D برای هر سه ریزنمونه نسبت به همه تیمارها بیشترین حجم کالوس را نشان داد. به‌طور کلی افزایش غلظت 2,4-D از ۱ به ۴ میلی‌گرم در لیتر در هر سه ریزنمونه سبب افزایش حجم کالوس شد، در حالی‌که با افزایش غلظت پیکلورام از ۱ به ۱۰ میلی‌گرم در لیتر حجم کالوس فقط در ریزنمونه آندوسپرم افزایش یافت (شکل ۳). در ریزنمونه دمبرگ، بیشترین درصد کالوس‌زایی (۱۰۰٪) در غلظت ۱ میلی‌گرم در لیتر پیکلورام بدست آمد، اگرچه غلظت‌های ۲/۵ و ۵

میلی‌گرم در لیتر پیکلـورام و غلظت‌های ۲ و ۴ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D تفاوت معنی‌داری با آن نداشتند. همچنین در ریزنمونه برگ بیشترین درصد کالوس‌زایی (۱۰۰٪) در غلظت ۱ میلی‌گرم در لیتر پیکلورام و کمترین درصـد کـالوس‌زایـی (صفر) در غلظت ۱۰ میلی‌گرم در لیتر پیکلورام مشاهده شد. در ریزنمونه آندوسپرم، غلظت ۱۰ میلی‌گرم در لیتر پیکلورام (۹۸/۷۵٪) و غلظت‌های ۱، ۲ و ۴ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D بیشترین درصد کالوس‌زایی را نشان دادند.



شکل ۳- اثر متقابل غلظت‌های مختلف 2,4-D و پیکلورام و نوع ریزنمونه بر حجم کالوس سیکاس رولوتا ($p<۰/۰۵$)

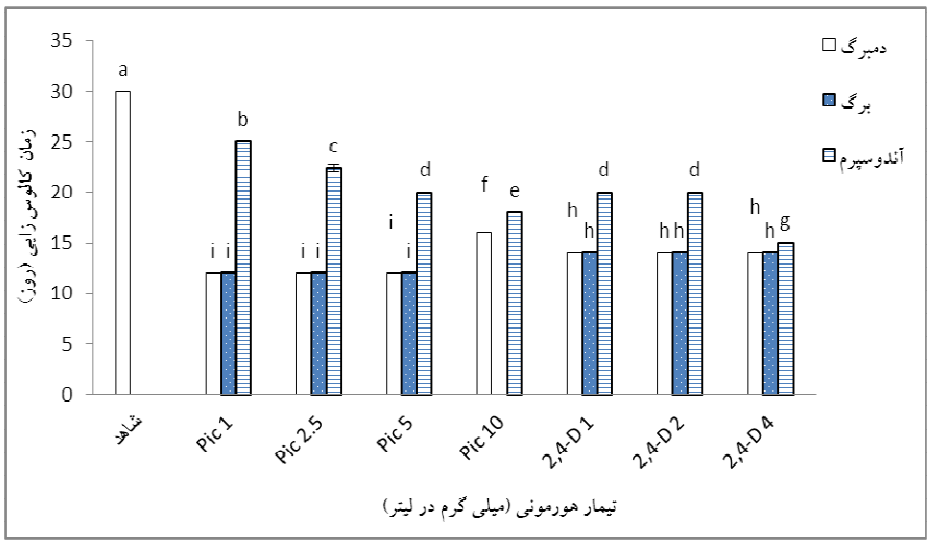
نتایج حاصل نشان داد که با افزایش سطوح 2,4-D از ۱ به ۴ میلی‌گرم در لیتر، افزایش معنی‌داری در درصـد کالـوس‌زایـی در هر سه ریزنمونه ایجاد شد، در صورتی‌که با افزایش غلظت پیکلورام درصـد کـالوس زایی در ریزنمونه آنـدوسپرم افزایش یـافت (شکل ۴).



شکل ۴- اثر متقابل غلظت‌های مختلف 2,4-D و پیکلورام و نوع ریزنمونه بر درصد کالوس‌زایی سیکاس رولوتا ($p<۰/۰۵$)

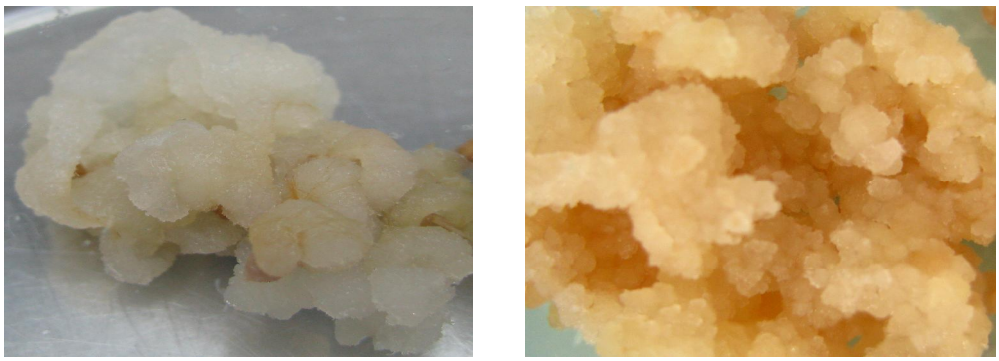
در ریز نمونه برگ و دمبرگ کمترین مدت زمان کالوس‌زایی (۱۲ روز) در غلظت‌های ۱، ۲/۵ و ۵ میلی‌گرم در لیتر و بالاترین زمان کالوس‌زایی پس از شاهد (۱۶ روز) در غلظت ۱۰ میلی‌گرم در لیتر

پیکلورام بود. در ریزنمونه آندوسپرم با افزایش غلظت هر دو تنظیم کننده رشد زمان کالوس‌زایی کاهش یافت و کمترین زمان کالوس‌زایی (۱۵ روز) در غلظت ۴ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D و بیشترین زمان کالوس‌زایی پس از شاهد (۲۵ روز) در غلظت ۱ میلی‌گرم در لیتر پیکلورام مشاهده گردید. در مجموع در ریزنمونه های برگ و دمبرگ غلظت‌های پائین پیکلورام و در ریزنمونه آندوسپرم غلظت ۴ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D، بهترین غلظت‌ها برای کاهش مدت زمان کالوس‌زایی بودند (شکل ۵).



شکل ۵- اثر متقابل غلظت‌های مختلف 2,4-D و پیکلورام و نوع ریزنمونه بر زمان کالوس‌زایی سیکاس رولوتا ($p<۰/۰۵$)

در این مطالعه، نوع بافت و رنگ کالوس حاصل از کاربرد مواد تنظیم کننده رشد مختلف متفاوت بود. بافت کالوس شکری و رنگ کرم مایل به زرد (شکل۶- سمت راست) در تنظیم کننده رشد 2,4-D و بافت کالوس خمیری، آبکی و رنگ شیری (شکل۶- سمت چپ) در پیکلورام مشاهده شد. در ریزنمونه‌های دمبرگ و برگ بافت کالوس شکری و در ریزنمونه آندوسپرم بافت کالوس خمیری بیشتر مشاهده گردید.



شکل ۶- بافت متفاوت کالوس‌های حاصل از 2,4-D (شکری، سمت راست) و پیکلورام (خمیری، سمت چپ)

بحث

ریز نمونه های آندوسپرم و برگ گیاه سیکاس در تمامی صفات اندازه گیری شده و همچنین ریزنمونه دمبرگ در بعضی از صفات در محیط کنترل (شاهد) پاسخ منفی به کالوس‌زایی نشان دادند و در محیط شاهد نکروزه شده و پس از یک ماه از بین رفتند.

به‌طور مشابه، در آزمایشی که توسط Nin و همکاران (۱۹۹۶) انجام شد، هیچ پاسخ کالوس‌زایی در ریزنمونه برگ و ساقه گیاه *Artemisia absinthium* در محیط بدون هورمون مشاهده نشد و ریزنمونه‌ها بعد از چند روز از بین رفتند. نتایج این مطالعه نشان داد که با افزایش غلظت پیکلورام از ۱ به ۱۰ میلی‌گرم در لیتر در ریزنمونه برگ و دمبرگ وزن‌تر کالوس کاهش یافت اما این افزایش غلظت در ریزنمونه آندوسپرم افزایش وزن‌تر کالوس را به همراه داشت. به‌طور مشابه در مورد 2,4-D نیز همگام با افزایش غلظت آن از ۱ به ۴ میلی‌گرم در لیتر بر خلاف پیکلورام در ریزنمونه‌های برگ افزایش معنی‌داری در وزن‌تر کالوس‌های حاصل اتفاق افتاد. طبق نتایج Khaled و همکاران (۲۰۰۸) حاصل از آزمایشات کشت برگ های اولیه حاصل از بذر F1 گیاه خیار (*Cucumis sativus*) در محیط کشت MS حاوی غلظت‌های 2,4-D (صفر، ۱، ۲ و ۳ میلی‌گرم در لیتر) و غلظت‌های (صفر و ۰/۲۵ میلی‌گرم در لیتر) NAA، بیشترین وزن‌تر کالوس در غلظت ۳ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D بدست آمد که با افزایش سطح 2,4-D، وزن‌تر کالوس افزایش یافت که این نتایج با مشاهدات حاصل از آزمایش ما نیز هم‌سویی دارد. در واقع در ریزنمونه‌های برگ و دمبرگ افزایش غلظت پیکلورام در تولید کالوس تأثیر معنی‌داری نداشت در حالی‌که در غلظت‌های کمتر کالوس‌زایی بهتری صورت گرفت. در مطالعه‌ای، از کشت گل آذین‌های جوان گیاه *Agropyron cristatum* بر روی محیط‌های کشت LS و SH، بیشترین وزن‌تر کالوس نیز در محیط SH (۳/۱۷ گرم) در غلظت ۸ میلی‌گرم در لیتر پیکلورام بدست آمد (Can et al., 2008). در مطالعه حاضر در ریزنمونه‌های برگ و دمبرگ با افزایش غلظت پیکلورام از ۱ به ۱۰ میلی‌گرم در لیتر سطح کالوس کاهش یافت و در برگ به صفر رسید در حالی‌که در ریزنمونه آندوسپرم با افزایش غلظت پیکلورام از ۱ به ۱۰ میلی‌گرم در لیتر بیشترین سطح کالوس مشاهده شد. در مورد 2,4-D، با افزایش غلظت از ۱ به ۴ میلی‌گرم در لیتر در هر سه ریزنمونه افزایش سطح کالوس مشاهده شد. 2,4-D یک تنظیم کننده رشد گیاهی نسبتاً مناسب در القا و تشکیل کالوس در غلظت‌های متفاوت آن می‌باشد. افزایش غلظت پیکلورام بر روی کالوس‌زایی ریزنمونه آندوسپرم بسیار مؤثر بود اما در برگ و دمبرگ افزایش غلظت آن در فرایند کالوس-زایی تأثیر چندانی نداشت. عکس العمل ریزنمونه‌ها در شرایط کشت درون شیشه‌ای به فاکتورهای متعددی بستگی دارد. به طوری که میزان سطح تنظیم کننده های رشد داخلی، غلظت تنظیم کننده رشد خارجی و بر هم‌کنش آن همگی بر پاسخ ریزنمونه مؤثر هستند (Torres, 1989). همچنین در ریزنمونه‌های متفاوت (برگ، دمبرگ و کوتیلدون و...) گیاه کاکائو در ایجاد کالوس تفاوت مشاهده شد که این تغییرات مربوط به شرایط فیزیولوژیکی و عوامل ژنتیکی می‌باشد (Traore & Guiltinan, 2006).

افزایش غلظت پیکلورام در ریزنمونه آندوسپرم بیشترین حجم کالوس را داشته است در حالی‌که در ریزنمونه برگ حجم کالوس به صفر رسید و در دمبرگ کاهش حجم مشاهده شد، ولیکن در هر سه ریزنمونه با افزایش غلظت تنظیم کننده رشد 2,4-D حجم کالوس افزایش یافته است. در مطالعاتی که بر روی ریزنمونه برگ گیاه آنتوریوم صورت گرفت، نشان داد که کاربرد 2,4-D با غلظت ۱ میلی‌گرم در لیتر و کینتین ۴ میلی‌گرم در لیتر بیشترین حجم کالوس را به‌همراه داشت (Ebrahimzade, 2006). همچنین نتایج کشت برگ جوان آنتوریوم در محیط کشت MS حاوی غلظت‌های صفر، ۰/۰۸، ۰/۱۶ و ۰/۲۴ میلی‌گرم در لیتر تنظیم کننده رشد 2,4-D نشان داد که بالاترین حجم کالوس در غلظت ۰/۱۶ میلی‌گرم در لیتر بوده است (Beyramizade & Azadi., 2007). در این مطالعه، با افزایش غلظت پیکلورام در ریزنمونه برگ و دمبرگ کاهش درصد کالوس‌زایی مشاهده شد اما افزایش غلظت آن در مورد ریزنمونه آندوسپرم موجب افزایش درصد کالوس‌زایی شد. در مقابل، افزایش غلظت 2,4-D از ۱ به ۴ میلی‌گرم در لیتر افزایش درصد کالوس‌زایی در هر سه ریزنمونه را به‌همراه داشت. در مطالعاتی مشابه بر روی گیاه سیکاس، تأثیر 2,4-D و پیکلورام

با غلظت مشابه (۵، ۱۰و ۲۰ میکرومولار) برکشت ریزنمونه آندوسپرم مورد بررسی قرار گرفت و نشان داد که افزایش غلظت 2,4-D از ۵ به ۲۰ میکرومولار باعث کاهش کالوس‌زایی شد، در حالی‌که در ریزنمونه آندوسپرم با افزایش غلظت پیکلورام از ۵ به ۲۰ میکرومولار، میزان کالوس‌زایی افزایش یافت (Pick kiong et al., 2008). در مطالعه حاضر، کالوس‌زایی به ویژه در ناحیه دمبرگ‌ها چشمگیر بود که علت آن را می‌توان به وجود مقداری اکسین و سیتوکینین درون زا در خود دمبرگ نسبت داد. از سوی دیگر، اکسین در گیاه در یک مدل قطبی به صورت رو به پائین انتقال می‌یابد (Swarup & Lomax et al., 1995؛ Bennett, 2003). در بعضی موارد تنظیم کننده رشد 2,4-D برای تشکیل کالوس بسیار عالی است، اما فعالیت تنظیم کننده رشد پیکلورام نتایج بهتری از 2,4-D در تشکیل کالوس و سپس القا جنین‌های سوماتیکی در بعضی موارد داشته است (Beyl & Sharma, 1983; Collins et al., 1978). کمترین زمان کالوس‌زایی در ریزنمونه برگ و دمبرگ در غلظت پائین تنظیم کننده رشد پیکلورام مشاهده شد، در حالی‌که ریزنمونه آندوسپرم در غلظت‌های بالاتر آن کمترین زمان کالوس‌زایی مشاهده شد. بررسی کالوس‌زایی ریزنمونه آندوسپرم سیکاس رولوتا در غلظت‌های مشابه (۵، ۱۰ و۲۰ میکرومولار) یا (۱/۱، ۲/۲ و ۴/۴ میلی‌گرم در لیتر) تنظیم کننده‌های رشد 2,4-D، NAA و پیکلورام زمان کالوس‌زایی در غلظت ۲۰ میکرومولار پیکلورام ۰/۵±۱۷/۸ روز بدست آمد که با نتایج تحقیق ما، زمان کالوس‌زایی ۱۸ روز در غلظت بالای پیکلورام در ریزنمونه آندوسپرم مطابقت داشت (Pick Kiong et al., 2008).

نتایج نشان داد که مقایسه بین تنظیم کننده‌های رشد (اکسین) و نوع ریزنمونه در اکثر موارد در صفات اندازه‌گیری شده مانند: (وزن‌تر کالوس، سطح کالوس و...) تفاوت نشان می‌دهد. اثر هورمون‌های پیکلورام و2,4-D و سه نوع ریزنمونه نتایج متفاوتی نشان دادند، به نحوی که غلظت‌های بالای هورمون پیکلورام (۱۰ میلی‌گرم در لیتر) روی ریزنمونه آندوسپرم و غلظت‌های پائین آن (۱ میلی‌گرم در لیتر) روی ریزنمونه برگ و دمبرگ اثر بهتری نشان داد و بسته به نوع ریزنمونه این اثرات متفاوت بود. با کاربرد تنظیم کننده رشد 2,4-D در اکثر موارد، با افزایش غلظت از ۱ به ۴ میلی‌گرم در لیتر در هر سه ریزنمونه افزایش کالوس زایی وجود داشت که با توجه به بافت ریزنمونه و منشأ ژنتیکی آنها و همچنین نوع تنظیم کننده رشد (اکسین) قابل توجیه می‌باشد. مطابق مطالعات صورت گرفته، تاکنون هیچ گزارشی مبنی بر استفاده از ریزنمونه‌های برگ و دمبرگ در تولید کالوس در گیاه سیکاس آورده نشده است و این اولین گزارش از کشت بافت گیاه سیکاس در تولید کالوس از ریزنمونه برگ و دمبرگ این گیاه می‌باشد.

نتیجه گیری کلی

از میان ریزنمونه ها و تنظیم کننده‌های رشد مورد استفاده، تنظیم کننده رشد 2,4-D در غلظت بالاتر اثر کالوس‌زایی بهتری بر روی ریزنمونه دمبرگ داشته است، اما تنظیم کننده رشد پیکلورام در غلظت بالاتر اثر بهتری بر روی کالوس‌زایی ریزنمونه آندوسپرم داشت. بافت کالوس حاصل از تنظیم کننده رشد 2,4-D شکری بوده در حالی‌که بافت کالوس حاصل از تنظیم کننده رشد پیکلورام خمیری بدست آمد.

REFERENCES

1. Beyl, C.A. & Sharma, G.C. (1983). Picloram induced somatic embryogenesis in *Gasteria* and *Haworthia*. *Plant Cell Tissue Organ Culture*, 2, 123-132.
2. Beyramizadeh, A. & Azadi, P. (2007). Effect of growth regulators on shoot formation of *Anthurium andreanum* Lind. *Pajouhesh & Sazandegi*, 76, 179-184. (In farsi)
3. Broome, T. (2001). Optimizing Cycad Seed Germination. *The Cycad Newletter*, 24(2), 5-7.
4. Can, E., Celiktas, N. & Hatipoglu, R. (2008). Effect of auxin type and concentration in different media on the callus induction and shoot formation of crested wheatgrass (*Agropyron cristatum* (L). *Biotechnology & Biotechnology Equipment*, 3, 782-786.

5. Collins, G.B., Vian, W.E. & Phillips, G.C. (1978). Use of 4-amino-3,5,6-trichloro picolinic acid as an auxin source in plant tissue cultures. *Crop Science*, 18, 286-288.
6. Dyer, R. A. (1965). *The Cycads of Southern Africa*. Bothalia 8.4, Pretoria, SouAfrica. pp. 120.
7. Ebrahimzadeh, M., Shaker, H., Bernard, F. & Khavarinezhad, R. (2006). Effect of hormons and explant in callus induction and plant regeneration in tissue culture of *Anthurium andreanum* var. Tropical, *Pajouhesh & Sazandegi*, 73, 169-176. (In farsi)
8. Gamborg, O. L., Miller, R. A. & Ojima, K. (1968). Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Cell Research*, 50, 151-158.
9. Gilman, E.F. (1999). Cycas revolute: General information and description. Review paper of Institute of Food and Agriculture Sciences. Environment Horticulture Department*, Florida.*
10. Hill, K.D. (1993). *Proc. 3 rd International conference on Cycas Biology*, pp. 139.
11. Jager, A. & Staden, J. (1996). Somatic embryogenesis and organogenesis in *Encephalartos dyerianus* and *E. natalensis*. *Plant Cell Tissue and Organ Culture,* 45, 99-102.
12. Jones, D.L. (1993). *Cycads of the world.* Reed Book, New York BotGard, Chatswood, pp 312.
13. Khaled, M., Elmeer, S. & Michael, H. (2008). Observations on the combined effects of light, NAA and 2,4-D on somatic embryogenesis of cucumber (*Cucumis sativus*) hybrids. *Plant Cell, Tissue, Organ Culture*, 95, 381–384.
14. Lomax, T.L., Muday, G.K., & Ruberty, P.H. (1995). Auxin transport. In: Plant hormones: physiology, biochemistry and molecular in plant hormones: *Physiology, Biochemistry and Molecular Biology*, 509–530.
15. Motohashi, T., Toda, M. & Kondo, K. (2008). Adventitious embryo formation derived from zygotic embryos in *Cycas revoluta*. *Plant Biotechnology*, 25, 589–591.
16. Murashige, T. & Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bio- assays with tobacco tissue cultures. *Plant Physiology,* 15, 473-497.
17. Nin, S., Morosi, E., Schiff, S. & Bennici, A. (1996). Callus culture of *Atremisia absinthium* L. initiation, growth optimization and organogenesis. *Plant Cell Tissue & Organ Culture*, 45, 67-72.
18. Pick kiong, A., Shu Thing, Y., Gansau, J & Hussein, S. (2008). Induction and multiplication of callus from endosperm of *Cycas revoluta. African Journal of Biotechnology*, 7(23), 4279-4284.
19. Rinaldi, L. M. R. (1999). Factors affecting shoot regeneration from zygotic embryo and seedling explants of *Cycas revoluta* THUNB. *Invitro Cell Development Biological plant*, 35, 25-28.
20. Swarup, R. & Bennett, M. (2003). Auxin transport: The fountain of life in plants. *Development Cell*, 5, 824–826.
21. Tadera, K., Ginya, H., Sawada, R., Motani, Y., Aikawa, Y., Nozaki, A., Yagi, F. & Minami, Y. (1995). Cycasin formation in tissue cultures of Japanese Cycad. *Phytochemistry*, 38, 1199-1201.
22. Torres, K.T. (1989). *Tissue Culture Techniques for Horticulture Crop*. Published by Van Nostrand Reinhold New Yourk.
23. Traore, A., Guiltinan, M.J. (2006). Effects of carbon source and xeplant type on somatic embryogenesis of four cacao genotypes. *HortScience*, 41(3), 753-758.