Iranian Journal of Horticultural Science
Vol 51, No 2, Summer 2020 (355-364)
DOI: 10.22059/ijhs.2019.276378.1604

علوم باغبانی ایران
دورهٔ ۵۱، شمارهٔ ۲، تابستان ۱۳۹۹ (ص ۳۶۴-۳۵۵)

ازدیاد درون‌شیشه‌ای و سازگاری آدنیوم به‌عنوان یک گیاه زینتی ارزشمند

فاطمه زارعیان[۱]، مینا تقی‌زاده[۲*] و علیرضا خالقی[۲]
۱ و ۲. دانش‌آموخته کارشناسی ارشد و استادیار، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه اراک
(تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۱۲/۷ - تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۳/۲۶)

چکیده

شرایط کشت درون‌شیشه‌ای آدنیوم به‌عنوان یک گیاه زینتی وارداتی با ضریب ازدیاد کم، می‌تواند زمینه خوبی را برای تکثیر انبوه در تولید این گیاه ارزشمند فراهم آورد. بدین منظور این پژوهش به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی طی آزمایش‌های شاخساره‌زایی، پرآوری و ریشه‌زایی جهت بهینه‌کردن اندام‌زایی در دو گونه آبسوم و عربیکوم انجام شد. بیشترین شاخساره‌زایی در محیط کشت MS دارای BA ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر برای گونه آبسوم و برای گونه عربیکوم در محیط کشت MS دارای ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BA به‌همراه ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر TDZ بود. اندام‌زایی در گونه عربیکوم بیشتر به‌صورت برگ و ریشه مشاهده شد و انگیزش شاخساره در آن نسبت به گونه آبسوم در مدت زمان طولانی‌تر رخ داد. نتایج نشان داد می‌توان از غلظت ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BA برای پرآوری شاخساره‌های انگیزش یافته در هر دو گونه آدنیوم استفاده کرد. بهترین تیمار در مرحله ریشه‌زایی محیط MS کامل به‌همراه ۰/۳ درصد زغال فعال بدون تنظیم‌کننده رشد حاصل شد. سازگاری تدریجی گیاهچه‌ها ابتدا در پرلیت استریل دارای MS یک دوم غلظت و سپس در بستر کشت خاک باغچه، ورمی‌کمپوست و پرلیت انجام گرفت.

واژه‌های کلیدی: رز صحرا، ریزازدیادی، سیتوکینین، شاخساره‌زایی، کالوس.

In vitro propagation and acclimatization of *Adenium* sp. as valuable ornamental plant

Fatemeh Zareian[1], Mina Taghizadeh[2*] and Alireza Khaleghi[2]
1, 2. Former M. Sc. Student and Assistant Professor, Faculty of Agriculture and Natural Resources, Arak University, Arak, Iran
(Received: Feb. 26, 2019- Accepted: June 16, 2019)

ABSTRACT

Optimizing the tissue culture condition for *Adenium* sp as an imported ornamental plant with a low propagation rate can deliver the way for mass propagation to multiplication of this ornamental plant. So, this research was carried out in a factorial experiment based on a completely randomized design to optimize organogenesis of *Adenium abessum* and *Adenium arabicum* during shoot induction, proliferation and root induction experiments. The highest rate of shoot regeneration for *Adenium obesum* was achieved in MS medium containing 0.5 mgl^{-1} BA, and for *Adenium arabicum* was achieved in MS medium containing 0.5 mgl^{-1} BA in combination with 0.5 mgl^{-1} TDZ. Organogenesis was more observed as leafy and rooted in *A. arabicum* and shoot induction in that was longer compare with *A. abessum*. The result showed that 0.5 mgl^{-1} BA can be used to prolifered shoots induced in both specie of *Adenium*. The full strength of free plant growth regulator MS medium supplemented with 0.3% activated charcoal was the best treatment at root induction stage. The plantlet gradually became first adapted in sterile perlite with 1/2 MS concentration and then in the culture media contained soil, vermicompost and perlite.

Keywords: Desert rose, callus, cytokinine, micropropagation, shoot regeneration.

* Corresponding author E-mail: taghizadeh@ut.ac.ir, m-taghizadeh@araku.ac.ir

مقدمه

یکی از جنبه‌های مهم روش بیوتکنولوژی گیاهی، کشت سلول، بافت‌ها و اندام‌های گیاهی در شرایط درون‌شیشه‌ای است. روش کشت بافت در گونه‌های گیاهی نقش کلیدی در موفقیت روش‌های انتقال ژن و مطالعات سلولی دارد. امروزه روش‌های کشت درون‌شیشه‌ای گیاهان ابزار و بستری مهم برای دستکاری‌های ژنتیکی محسوب می‌شود. ازدیاد درون‌شیشه‌ای روشی است که جاذبه تجاری بالایی دارد، زیرا به‌کمک آن می‌توان به‌سرعت تعداد زیادی از ارقام جدید گیاهی را در فضای آزمایشگاهی محدود و کنترل‌شده تولید نمود یا برای تولید گیاهان مادری عاری از بیماری از آن بهره جست (Davey *et al*., 2005; Deein *et al*., 2013). گیاه آدنیوم (*Adenium* sp.) یا رز صحرا (Desert rose) از تیره خرزهره (Apocinaceae) به‌عنوان یک گیاه زینتی کند رشد، ظاهری بن‌سای گونه با داشتن گل‌های قرمز، صورتی، سفید و غیره بسیار مورد توجه در بازارهای بین‌المللی دنیا قرار گرفته است (Win *et al*., 2012; Oyen, 2008). آدنیوم را می‌توان با بذر، قلمه و پیوند تکثیر کرد، اما این یک روش ناکارآمد برای گیاه است، زیرا دارای ضریب تکثیر بسیار پایین است. رشد گیاه با بذر تا تولید گیاهچه در حدود ۱۲ ماه طول می‌کشد (Dimmitt & Hanson, 1991). روش‌های باززایی آدنیوم از طریق کشت کالوس و اندام‌زایی برای پاسخگویی به تقاضاهای رو به رشد، تجارت و پرورش این گیاه کاربرد دارد (Talukdar, 2012). پژوهش‌های بسیار کمی در زمینه کشت درون‌شیشه‌ای آدنیوم در دسترس می‌باشد و بیشتر مطالعات در زمینه ازدیاد درون‌شیشه‌ای سایر جنس‌های خرزهره بوده است. Talukdar (2012) برای کالوس‌زایی آدنیوم از محیط کشت‌های B5، MS و N6 استفاده کرد. در بین محیط‌های استفاده‌شده، محیط کشت MS بهترین محیط کشت برای کالوس‌زایی در ریزنمونه برگ بود. بیشترین درصد کالوس در محیط کشت MS تکمیل‌شده با دو میلی‌گرم در لیتر NAA به‌دست آمد، درحالی‌که یک میلی‌گرم در لیتر جیبرلین در کل محیط‌ها (MS, B5, N6) هیچ پاسخی نداشت و در محیط کشت N6 غلظت‌های مختلف جیبرلین بدون پاسخ بود. در پژوهشی دیگر تغییرات غلظت نمک در مرحله کالوس‌زایی آدنیوم مورد بررسی قرار گرفت. کشت ریزنمونه برگ در غلظت‌های مختلف کلرید سدیم (۰، ۵۰، ۷۵ و ۱۰۰ میلی‌لیتر) به‌مدت نه ماه متوالی مورد ارزیابی قرار گرفت و بیشترین درصد کالوس‌زایی در محیط کشت دارای ۵۰ میلی‌مولار کلرید سدیم به‌دست آمد (Talukdar, 2012). Rasad *et al*. (2015) اثر ترکیبات مختلف اکسین و سیتوکینین را در انگیزش کالوس در کشت درون‌شیشه‌ای آدنیوم مورد بررسی قرار دادند. کالوس‌زایی پس از چهار هفته در محیط کشت MS دارای ترکیب NAA در غلظت‌های ۰/۵، ۱ و ۱/۵ و BAP در غلظت‌های ۰/۵، ۱، ۱/۵ و ۲ میلی‌گرم در لیتر از ریزنمونه ساقه و برگ صورت گرفت. نمو کالوس و باززایی گیاه آدنیوم در محیط کشت MS تکمیل شده با ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA به‌همراه یک میلی‌گرم در لیتر BAP و یک میلی‌گرم در لیتر NAA به‌همراه ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP به‌ترتیب برای ریزنمونه برگ و ساقه بهترین نتیجه را داد. اندام‌زایی یکی از ابزارهای اجتناب‌ناپذیر برای باززایی گیاهان و گیاهان تراریخته در روش‌های کشت درون‌شیشه‌ای است. در مطالعه‌ای ۱۰۰ درصد شاخساره‌زایی آدنیوم در محیط کشتMS دارای ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BA به‌دست آمد. شاخساره‌های باززایی‌شده برای ریشه‌زایی به محیط کشت MS به‌همراه ۰/۳ درصد زغال فعال واکشت شدند (Kanchanapoom *et al*., 2010).

آدنیوم یک گیاه زینتی وارداتی، در معرض انقراض است و ضریب پایین ازدیاد این گیاه باعث ضرورت حفاظت از این گیاه شده است. به‌دلیل ارزش اقتصادی آدنیوم، تسریع برنامه‌های اصلاحی آن مستلزم یک روش آسان و سریع تکثیر است تا بتوان ارقام جدید را به تقاضای بازار رساند. بنابراین بهینه‌کردن شرایط کشت درون‌شیشه‌ای این گیاه زینتی می‌تواند زمینه خوبی را برای تولید انبوه و یکنواخت این گیاه زینتی فراهم آورد. لذا تحقیق حاضر تلاشی برای کشت بافت و ریز ازدیادی آدنیوم به‌عنوان یک ابزار جایگزین روش‌های ازدیاد متداول است.

مواد و روش‌ها

مرحله آماده‌سازی

در این پژوهش از دو گونه گیاه زینتی آدنیوم با نام علمی *Adenium arabicum* و *Adenium abesum* استفاده شد. محیط کشت پایهMS جهت اندام‌زایی دارای ۷ گرم در لیتر آگار و ۳۰ گرم در لیتر ساکارز بود. پس از تنظیم pH روی ۵/۸، محیط کشت در دستگاه اتوکلاو در دمای ۱۲۰ درجه سانتی‌گراد تحت فشار ۱/۲ کیلوگرم بر سانتی‌متر مربع به‌مدت ۲۰ دقیقه استریل شد. دانهال‌های حاصل از بذرهای بالغ آدنیوم به‌عنوان ریزنمونه استفاده شد. تمامی کشت‌ها از مرحله جوانه‌زنی بذر تا ریشه‌دهی گیاهچه‌های باززایی‌شده، در اتاقک رشد با دمای ۱±۲۵ و شرایط ۱۶ ساعت روشنایی و هشت ساعت تاریکی با نور ۳۰۰۰ لوکس نگهداری شدند.

مرحله استقرار و شاخساره‌زایی

بذرهای آدنیوم عربیکوم و آبسوم ابتدا با آب جاری شسته شدند. سپس با الکل ۹۵٪ به‌مدت ۲ دقیقه و محلول وایتکس ۱۰٪ (دارای ۵٪ ماده فعال) به‌مدت ۳۰ دقیقه گندزدایی شدند. بذرهای ضدعفونی شده در محیط کشت جوانه‌زنی بذر (فاقد عناصر غذایی و هورمون و دارای هفت گرم در لیتر آگار) در شرایط نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی دمای ۱±۲۵ درجه سانتی‌گراد کشت شدند. پس از جوانه‌زنی بخش انتهای ساقه‌چه در دانهال‌های استریل ۱۴ روزه به‌طول یک سانتی‌متری جدا شدند و در محیط کشت قرار گرفت. اثر انواع محیط کشت‌های مختلف از نظر دارابودن تنظیم کننده‌های رشد مختلف، آگار و زغال فعال بر انگیزش شاخساره در آدنیوم به‌صورت فاکتوریل با دو عامل که عامل اول در دو سطح (گونه گیاهی) و عامل دوم نوع محیط کشت در چهار سطح مورد بررسی قرار گرفت (جدول ۱). این آزمایش به بررسی اثر دو عامل گونه (آبسوم و عربیکوم) و نوع محیط کشت (۱- محیط کشت جامد دارای ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BA و TDZ، ۲- محیط کشت جامد دارای ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BA، ۳- محیط کشت مایع دارای ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BA و ۴- محیط کشت جامد دارای ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BA و ۰/۳ درصد زغال فعال) پرداخت. با توجه به این‌که گیاه آدنیوم در طی کشت درون‌شیشه‌ای تولید فنل می‌نمود، جهت کاهش این پدیده نامطلوب از تیمارهای زغال فعال و محیط کشت مایع استفاده شد. به‌منظور استقرار ریزنمونه‌ها در محیط کشت مایع، داخل شیشه از توری پلاستیکی استفاده شد. توری‌ها قبل از اتوکلاو به‌اندازه شعاع شیشه برش داده و داخل شیشه مستقر و به‌وسیله اتوکلاو همراه با محیط کشت استریل شدند. برای استفاده زغال فعال در محیط کشت، ابتدا زغال فعال به‌صورت پودر (۰/۳ درصد) به محیط کشت اضافه، pH آن تنظیم و سپس محیط کشت استریل انجام شد. پس از یک ماه صفات تعداد شاخساره‌های انگیزش یافته، تعداد و رنگ برگ (از نظر ظاهری) و میزان کالوس‌زایی براساس ارزیابی براساس رتبه‌بندی از ۱ (کمترین) تا ۴ (بیشترین) مورد ارزیابی قرار گرفتند.

مرحله پرآوری

در این مرحله جهت پرآوری، شاخساره‌های انگیزش یافته در گونه‌های عربیکوم و آبسوم در سه نوع محیط‌کشت MS جامد شامل ۱- BA ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر، ۲- BA یک میلی‌گرم در لیتر و ۳- TDZ یک میلی‌گرم در لیتر واکشت شدند. تعداد شاخساره، طول شاخساره (با استفاده از خط‌کش میلی‌متری) و تعداد برگ در تیمارهای مختلف ثبت گردید. این آزمایش دارای دو عامل که عامل اول در دو سطح (گونه گیاهی) و عامل دوم نوع محیط کشت در سه سطح اجرا گردید.

مرحله ریشه‌زایی

شاخساره‌های رشد کرده دو گونه، به‌منظور انگیزش ریشه در محیط‌های کشت ۱- MS یک دوم غلظت بدون تنظیم‌کننده رشد، ۲- MS یک دوم غلظت به‌همراه یک میلی‌گرم در لیتر IBA، ۳- MS بدون تنظیم‌کننده رشد و زغال فعال ۰/۳ درصد کشت شدند و از نظر میزان ریشه‌دهی و میزان زنده‌مانی گیاهچه‌ها مورد ارزیابی و تجزیه آماری قرار گرفتند. این آزمایش

نیز دارای دو عامل که عامل اول در دو سطح (گونه گیاهی) و عامل دوم نوع محیط کشت در سه سطح اجرا گردید.

مرحله سازگاری

پس از توسعه کامل ریشه‌ها، گیاهچه‌ها به آرامی از ظروف کشت بیرون آورده و ریشه‌های آن‌ها شستشو داده شد تا بقایای آگار حذف شوند. ابتدا گیاهچه‌های ریشه‌دارشده به‌مدت دو هفته در پرلایت استریل دارای محلول MS یک دوم غلظت قرار گرفتند و سپس به بستر کشت خاک باغچه، ورمی‌کمپوست و پرلایت به نسبت ۱:۱:۱ منتقل شدند.

طرح آزمایشی و آنالیز داده

نوع طرح در تمام آزمایش‌ها (شاخساره‌زایی، پرآوری و ریشه‌زایی) فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی بود. ابتدا داده‌های غیرنرمال با استفاده از روش تبدیل جذر لگاریتمی نرمال شدند. تجزیه واریانس و مقایسه میانگین‌ها به‌منظور ارزیابی صفات براساس آزمون چند دامنه‌ای دانکن با استفاده از نرم‌افزار SAS انجام گردید. آزمون چنددامنه‌ای دانکن (DMRT) برای تعیین معنی‌دار بودن تفاوت آماری میانگین تیمارها انجام شد.

نتایج و بحث

مرحله شاخساره‌زایی

در این مرحله هم شاخساره‌زایی و هم القای کالوس پس از یک‌ماه در ریزنمونه‌های دانهالی مشاهده شد (شکل ۳). اندام‌زایی در گونه عربیکوم بیشتر به صورت برگ و ریشه (عدم شاخساره‌های مشخص) بود و انگیزش شاخساره در آن نسبت به گونه آبسوم در مدت زمان طولانی‌تر رخ داد. انگیزش شاخساره در گونه آبسوم پس از تقریبا ۳۵ روز و در گونه عربیکوم پس از ۵۰ روز مشاهده شد. بیشترین تعداد شاخساره (۶/۶-۶) در محیط کشت MS دارای ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BA و به‌همراه و یا بدون زغال، در گونه آبسوم حاصل شد. تفاوت در تعداد شاخساره در گونه‌ها بسیار چشم‌گیر بود، به گونه‌ای‌که گونه عربیکوم کمترین میزان شاخساره‌زایی را در محیط‌های مختلف داشت. در گونه عربیکوم کاربرد همزمان ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BA و TDZ بیشترین شاخساره‌زایی (۳/۳) صورت گرفت. بیشترین تعداد برگ در گونه آبسوم (۲۵ عدد) در محیط کشت دارای زغال فعال به‌همراه ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BA ایجاد شد. محیط کشت مایع در شاخساره‌زایی آبسوم به‌طور نسبی عملکرد خوبی داشت ولی برای گونه عربیکوم هیچ‌گونه انگیزش شاخساره‌ای دربر نداشت. رنگ برگ در تیمارهای مختلف محیط کشت متفاوت بود. گونه آبسوم در محیط کشت محیط ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BA و به‌همراه و یا بدون زغال برگ‌هایی به‌رنگ سبز متمایل به قرمز ایجاد نمودند و در سایر تیمارها شدت سبزینگی کمتر بود و در عربیکوم محیط کشت دارای TDZ و BA برگ‌هایی با شدت سبزینگی بیشتر نسبت به سایر تیمارها ایجاد شد (جدول ۱). بطور مشابه در خرزهره و آدنیوم کاربرد ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BA موجب شاخساره‌زایی شده است (Karrunakaran, 2010; Kanchanapoom *et al*., 2010). نقش تحریک‌کنندگی TDZ به‌عنوان یک تنظیم‌کننده سیتوکینینی برای اندام‌زایی شاخساره باززایی در بسیاری از گیاهان زینتی مانند آگلونما، بابا آدم، آنتوریوم، دیفن باخیا، فیلودندرون، اسپاتی‌فیلوم، سینگونیوم و غیره شناخته شده است (Chen & Wei, 2018) که با نتایج این پژوهش هم‌سو می‌باشد. در برخی تیمارها، در محل ایجاد شاخساره‌ها انگیزش کالوس هم مشاهده شد که در تیمارهای مختلف میزان کالوس متفاوت بود. تقریباً میزان انگیزش کالوس مخالف میزان انگیزش شاخساره بود و در تیمارهایی که انگیزش بیشتری از شاخساره رخ داده بود، کالوس‌زایی به‌میزان کمتری مشاهده شد. بیشترین کالوس ایجادشده مربوط به گونه آبسوم در محیط TDZ ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر به‌همراه BA ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر بود. با توجه به این‌که انتقال اکسین و تجمع آن در بافت‌ها و یاخته‌های زخمی افزایش می‌یابد، تشکیل پینه در انتهای بریده‌شده ریزنمونه‌ها می‌تواند به‌دلیل تجمع اکسین در یاخته‌های زخمی باشد، به‌ویژه هنگامی‌که در ترکیب با سایتوکینین‌ها استفاده شود (Srivastava, 2002).

جدول ۱. مقایسه میانگین اثر متقابل محیط کشت و گونه بر میزان باززایی آدنیوم

Table 1. Mean comparison interaction effect of culture medium and species on regeneration of *Adenium*

Media	Species	No. of shoots per explant	Leaf number	Leaf color	Callus (code)
Solid media ($BA_{0.5}$+$TDZ_{0.5}$)	*abesum*	2.6^{abc}	8^{ab}	Dark green	1^{a}
	arabicum	3.3^{abc}	8.3^{ab}	Dark green	0.6^{ab}
Solid media ($BA_{0.5}$)	*abesum*	6.6^{a}	17^{ab}	Green red	0.6^{ab}
	arabicum	$1b^{c}$	2^{b}	Pale green	0.5^{ab}
Liquid media ($BA_{0.5}$)	*abesum*	4.6^{ab}	11.3^{ab}	Dark green	1^{a}
	arabicum	0^{c}	0^{b}	-	0^{b}
Solid media ($BA_{0.5}$+$AC_{0.3\%}$)	*abesum*	6^{a}	25^{a}	Green red	0^{b}
	arabicum	1^{bc}	1^{b}	Pale green	0^{b}

* حروف متفاوت در هر ستون نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد است.

* Values with different letters in column are significantly different at 5% level of probability.

در مطالعه‌ای ترکیب BA و TDZ بهترین تیمار برای انگیزش شاخساره نابه‌جا در زبان‌گنجشک معرفی شده است (Lee & Pijut, 2017). با آن‌که TDZ به‌عنوان یک تنظیم‌کننده قوی برای انگیزش شاخساره در کشت درون‌شیشه‌ای گیاهان شناخته شده است، ولی اثرات متنوع دیگری هم از آن مانند انگیزش کالوس، جارویی شدن شاخساره و بازدارندگی طویل‌شدن شاخساره گزارش شده است (Beasley & Pijut, 2013; Huetteman & Preece, 1993). گزارش‌هایی مبنی بر انگیزش کالوس در حضور BA به‌تنهایی در محیط کشت وجود دارد (Bonyanpour & Khosh-Khui, 2013). در شرایط کشت بافت آدنیوم علاوه بر شاخساره‌زایی، همزمان انگیزش کالوس هم مشاهده شد که احتمالاً به سطوح بالای هورمون‌های درون‌زاد اکسینی در این گونه برمی‌گردد. هرچند در برخی منابع ذکر شده است که محیط کشت مایع برای پرآوری شاخساره مناسب است، ولی در گونه عربیکوم پاسخی دربر نداشت و در گونه آبسوم هم تفاوت چندان معنی‌داری با سایر تیمارها نداشت.

مرحله پرآوری

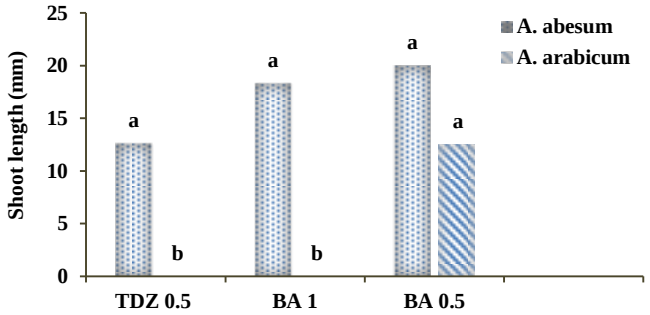
در مرحله پرآوری پس از واکشت شاخساره‌های انگیزش یافته‌ی دو گونه آدنیوم در محیط کشت‌های مختلف پاسخ‌های درون‌شیشه‌ای متفاوتی از نظر پرآوری شاخساره‌های انگیزش‌یافته مشاهده شد. نتایج اثرات متقابل نشان داد تیمارهای مختلف سیتوکینین در طول شاخساره‌های انگیزش یافته آبسوم تفاوت معنی‌داری با یکدیگر نداشتند، ولی در گونه عربیکوم در محیط کشت دارای ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BA شاخساره‌های انگیزش یافته رشد طولی بیشتری داشتند. به‌طورکلی، شاخساره‌های ایجاد شده در گونه آبسوم در طی کشت از رشد بیشتری برخوردار بودند و ارتفاع شاخساره‌های ایجادشده در این گونه نسبت به عربیکوم بیشتر بود (شکل ۱). بیشترین تعداد برگ در گونه آبسوم و عربیکوم در محیط کشت BA ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر حاصل شد (شکل ۲). در صفت تعداد شاخساره در هر ریزنمونه، اثر گونه معنی‌دار نبود. اثر ساده نوع سیتوکینین نشان داد که محیط کشت دارای ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BA برای پرآوری از جنبه تعداد شاخساره‌های انگیزش یافته مناسب‌تر است (شکل ۳). محیط کشت دارای ۰/۵ میلی-گرم در لیتر TDZ در مرحله پرآوری دو گونه، کمترین کارآیی را نسبت به سایر تیمارها داشت. یکی از مهمترین مراحل کشت بافت، مرحله پرآوری است که در آن به تکثیر گیاهچه اقدام می‌شود. در مرحله پرآوری، حضور سیتوکینین در شاخساره‌زایی اهمیت زیادی دارد. در این آزمایش افزایش غلظت BA سبب کاهش تعداد شاخساره شد (شکل ۳). Mehrbani *et al.* (2013) دریافتند که افزایش بیشتر غلظت BA سبب کاهش طول شاخساره می‌گردد که با نتایج ما مطابقت داشت. احتمالاً دلیل اثر منفی غلظت‌های زیاد BA و حضور TDZ بر طول شاخساره آن است که افزایش غلظت سیتوکینین خارجی به علت اثر متقابلی که دارد از سنتز RNA و پروتئین‌ها ممانعت می‌کند، بنابراین از سنتز ایزوآنزیم‌های ایندول استیک اکسیداز در سلول جلوگیری می‌کند و در نهایت منجر به کاهش سطح اکسین در سلول شده و کاهش رشد و تقسیم سلولی را به‌دنبال دارد (Lim *et al.*, 2009). گزارش شده است حضور TDZ به‌مدت محدود در محیط کشت نقش تحریکی در باززایی در مرحله

پرآوری دارد (Chen & Wei, 2018). عدم عملکرد مناسب TDZ در مرحله پرآوری این آزمایش احتمالاً به‌دلیل حضور مداوم این سیتوکینین می‌باشد. باززایی و پرآوری در طی کشت درون‌شیشه‌ای علاوه بر نوع و میزان تنظیم‌کننده‌های رشد، بستگی به ژنوتیپ و گونه هم دارد. سایر پژوهشگران این اثر را مشابه نتایج ما در کشت بافت گیاهان گزارش کرده‌اند (Taghizadeh & Solgi, 2015; Wei *et al*., 2008).

مرحله ریشه‌زایی

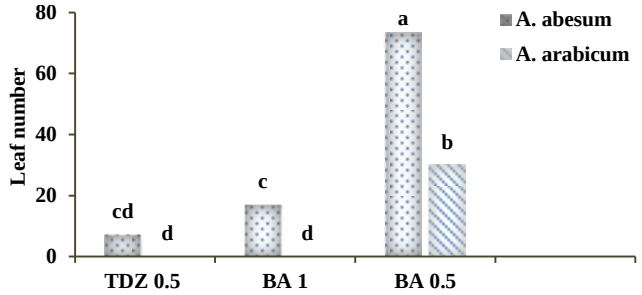
شاخساره‌ها پس از رشد در طی شش هفته در محیط کشت دارای ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BA گیاهچه‌های کاملی را توسعه دادند و به محیط ریشه‌زایی منتقل شدند. نتایج اثر متقابل گونه و نوع محیط در صفت تعداد ریشه نشان داد، بیشترین تعداد و طول ریشه در محیط کشت دارای زغال فعال ۰/۳ درصد بدون تنظیم‌کننده رشد در گونه عربیکوم حاصل شد (شکل‌های ۴ و ۵).

در گونه آبسوم، نوع محیط کشت چندان تفاوت معنی‌داری در طول و تعداد ریشه نداشت. اثر متقابل گونه در نوع محیط کشت بر صفات ارزیابی شده در این مرحله معنی‌دار نبود. اثر ساده نوع محیط کشت بر میزان مرگ گیاهچه‌ها نشان داد، محیط کشت دارای زغال فعال و بدون تنظیم‌کننده بهترین محیط کشت از نظر زنده‌مانی گیاهچه‌ها بود (شکل ۶).



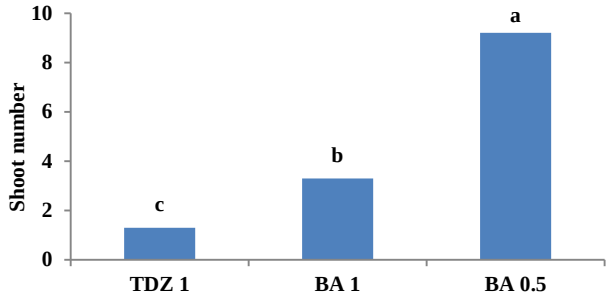
شکل ۱. مقایسه میانگین اثر متقابل سیتوکینین و گونه بر طول شاخساره در باززایی آدنیوم

Figure 1. Mean comparison interaction effect of cytokinin and species on shoot length in regeneration of *Adenium.*



شکل ۲. مقایسه میانگین اثر متقابل سیتوکینین و گونه بر تعداد برگ در باززایی آدنیوم

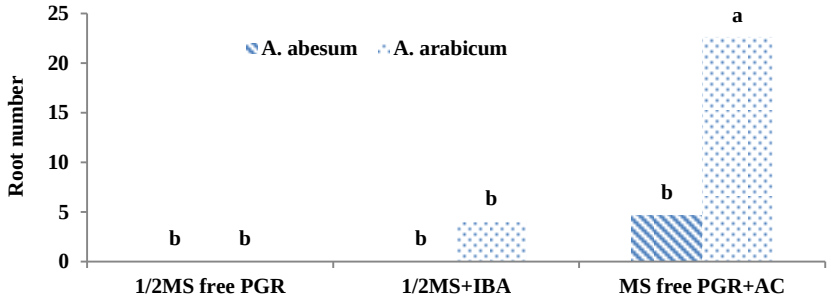
Figure 2. Mean comparison interaction effect of cytokinin and species on leaf number in regeneration of *Adenium*



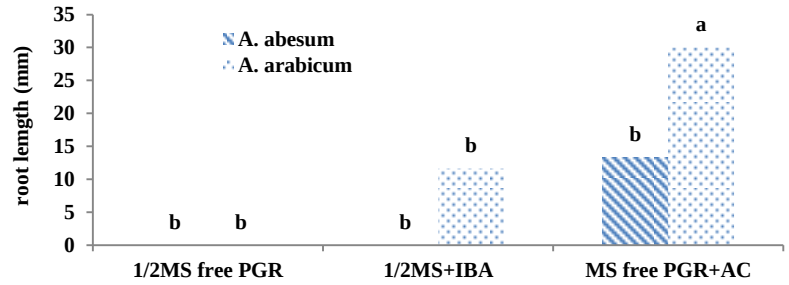
شکل ۳. مقایسه میانگین اثر سیتوکینین بر تعداد شاخساره در باززایی آدنیوم.

Figure 3. Mean comparison effect of cytokinin on shoot number in regeneration of *Adenium*

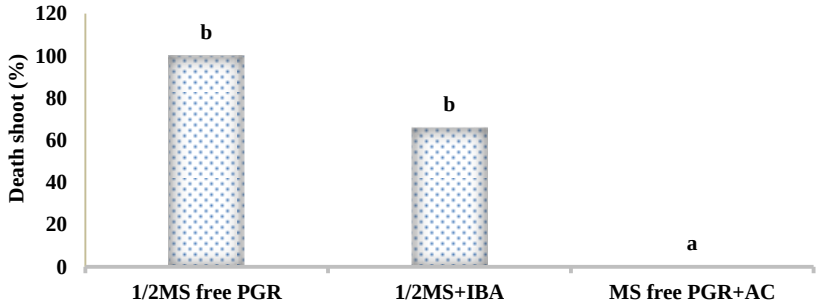
ریشه‌زایی تحت تأثیر عامل‌های ژنتیکی، فیزیولوژیکی و شرایط محیطی قرار می‌گیرد (Sorin *et al*., 2005). میزان هورمون‌های درونی مانند اکسین و سایتوکینین‌ها و اسید آبسیزیک در تشکیل ریشه و شاخساره اهمیت دارد (Peres *et al*., 2001). Talukdar (2012) بیشترین ریشه‌زایی آدنیوم مولتی‌فلوروم (*Adenium multiflorum*) را با استفاده از محیط MS دارای ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA به‌همراه ۲/۵ میلی‌گرم در لیتر Kin به‌دست آورد. همچنین Kanchanapoom *et al.* (2010) عنوان کردند بیشترین تعداد ریشه از محیط MS به‌همراه زغال فعال ۰/۳درصد بدون تنظیم‌کننده حاصل شد که با نتایج ما مطابقت داشت. ریشه‌زایی در محیط بدون تنظیم کننده رشد در گیاهان دیگر نیز گزارش شده است (Madani *et al*., 2013; Li *et al*., 2009; Voisey *et al*., 1994). محیط کشت MS بدون تنظیم‌کننده رشد این امکان را به گیاه می‌دهد که هورمون‌های رشدی مورد نیاز برای ریشه‌زایی خود را ایجاد کند. بنابراین، برای تحریک ریشه‌دهی، این محیط کشت مناسب و مقرون به‌صرفه‌تری است (Madani *et al*., 2013).



شکل ۴. مقایسه میانگین اثرمتقابل محیط کشت و گونه بر تعداد ریشه در گیاهچه‌های باززایی شده آدنیوم
Figure 4. Mean comparison interaction effect of culture medium and species on root number in regenerated plantlet of *Adenium*



شکل ۵. مقایسه میانگین اثر متقابل محیط کشت و گونه بر طول ریشه در گیاهچه‌های باززایی شده آدنیوم
Figure 5. Mean comparison interaction effect of culture medium and species on root length in regenerated plantlet of *Adenium*

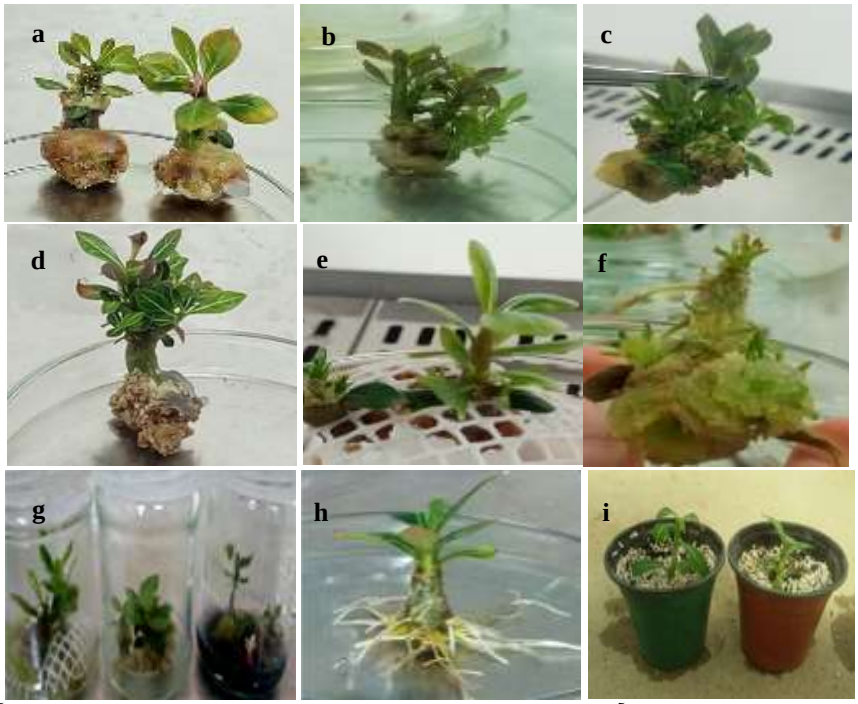


شکل ۶. مقایسه میانگین اثر محیط کشت بر میزان مرگ شاخساره در گیاهچه‌های باززایی شده آدنیوم
Figure 6. Mean comparison effect of culture medium on root length and root number and effect of media on death shoot in regenerated plantlet of *Adenium*

زغال فعال دارای سیستم بسیار مناسبی از منافذی با سطح داخلی زیاد است که قابلیت جذب بسیاری از مواد مانند فنل‌ها، تنظیم‌کننده‌های رشد، ویتامین‌ها، عناصر معدنی، ترکیبات سمی و گازها را داراست. افزودن زغال فعال به محیط کشت موجب جذب رنگدانه‌های سمی که از ترکیبات فنلی هستند، شده و در نتیجه ادامه رشد گیاهچه را ممکن می‌سازد (Heinz & Mee, 1969). از طرف دیگر زغال فعال برخی از مواد مثل اتیلن تولیدشده توسط گیاهچه را که می‌تواند مانع رشد شود، جذب نموده و کمک می‌کند تا شرایط محیط کشت شبیه به محیط خارج از شیشه شود (Schenk & Hilderand, 1972; Thrope, 1981)، که با نتایج ما مبنی بر ریشه‌زایی بهتر آدنیوم در زغال فعال نسبت به محیط‌های دیگر همسو بود. با توجه به نتایج به‌دست‌آمده در این بخش، گیاهچه‌ها در محیط یک دوم غلظت MS بدون تنظیم‌کننده و همراه با IBA یک میلی‌گرم در لیتر از بین رفتند شدند، درحالی‌که در محیط MS کامل به‌همراه زغال فعال، ریزنمونه‌ها شاداب بودند و هیچ علامتی از نکروز شدن مشاهده نشد. احتمالاً این نتیجه می‌تواند به نیاز غذایی زیاد آدنیوم در شرایط کشت درون‌شیشه‌ای مربوط باشد.

مرحله سازگاری

حدود چهار هفته پس از ریشه‌زایی، گیاهچه‌ها به آرامی از ظروف کشت بیرون آورده و ریشه‌های آن‌ها شستشو داده شد. سپس با موفقیت در بستر کشت خاک باغچه، ورمی‌کمپوست و پرلایت به نسبت ۱:۱:۱ به‌تدریج سازگار شدند (شکل ۷).



شکل ۷. مراحل مختلف شاخساره‌زایی، پرآوری، ریشه‌زایی و سازگاری گیاهچه در کشت درون‌شیشه‌ای گونه‌های آدنیوم آبسوم و آدنیوم عربیکوم. (a) شاخساره‌زایی عربیکوم در محیط کشت جامد دارای BA ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر (b) شاخساره‌زایی عربیکوم در محیط کشت مایع دارای BA و TDZ ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر (c) شاخساره‌زایی آبسوم در محیط کشت جامد دارای BA ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر (d) پرآوری شاخساره آبسوم در محیط کشت دارای BA ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر و زغال فعال ۰/۳ درصد (e) شاخساره‌زایی آبسوم در محیط کشت مایع دارای BA ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر (f) اندام‌زایی برگ از توده کالوس عربیکوم در محیط کشت دارای BA ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر (g) کشت آدنیوم در محیط کشت دارای ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BA با و بدون زغال فعال و محیط کشت مایع (h) ریشه‌زایی گیاهچه (i) مرحله سازگاری در گلخانه

Figure 7. Shoot regeneration, shoot proliferation, rooting and plantlet acclimatization in *Adenium abesum* and *Adenium arabicum*. a) shooting of *A. arabicum* in solid medium containing BA 0.5 mg/ L; (b) Shooting of *A. arabicum* in liquid medium containing BA and TDZ 0.5 mg / L; (c) Shooting *A. abesum* in solid medium containing BA 0.5 mg/ L (d) Proliferation of *A. abesum* shoot in solid medium containing BA 0.5 mg/ L and active charcoal 0.3% (e) Shooting *A. abesum* in liquid medium containing BA 0.5 mg/ L (f) Leaf organogenesis *A. arabicum* from callus mass in medium containing BA 0.5 mg / L (g) *Adenium* sp. cultured in medium containing 0.5 mg BA mg/ L with and without active charcoal and liquid medium (h) Plantlet rooting (i) Acclimatization stage in greenhouse.

نتیجه‌گیری کلی

براساس نتایج به‌دست‌آمده بهترین محیط شاخساره‌زایی برای گونه آبسوم محیط MS جامد دارای ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BA و برای گونه عربیکوم ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BA به‌همراه ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر TDZ معرفی می‌گردد. بررسی‌های حاضر نشان داد که می‌توان از حداقل غلظت BA (۰/۵ میلی‌گرم در لیتر) به‌تنهایی در محیط کشت به‌عنوان یک تنظیم‌کننده رشد گیاهی مناسب برای پرآوری شاخساره‌های انگیزش یافته در هر دو آدنیوم استفاده کرد. بهترین محیط ریشه‌زایی برای هر دو گونه، محیط MS کامل به‌همراه زغال فعال ۰/۳ درصد بدون تنظیم کننده بود که در گونه عربیکوم ۱۰۰ درصد ریشه‌زایی حاصل شد. برتری دستاورد این پژوهش کارآیی بهتر پروتکل معرفی شده در ریزازدیادی آدنیوم گونه آبسوم از جنبه استفاده از ترکیبات ارزان‌تر و نرخ بیشتر پرآوری می‌باشد و همچنین در این پژوهش ارائه مسیر ریزازدیادی کامل گونه عربیکوم برای اولین بار در دنیا انجام شد. نتایج حاصل از بهینه نمودن شرایط کشت درون‌شیشه‌ای آدنیوم می‌تواند در جنبه‌های پژوهشی و حتی تولید تجاری انبوه گیاهان یکنواخت با قیمت مناسب برای تقاضای گیاهان زینتی، تکثیر گیاهان عاری از پاتوژن، القای جهش‌های درون‌شیشه‌ای و معرفی لاین‌های درون‌شیشه‌ای مقاوم و همچنین بستری برای دست‌ورزی‌های ژنتیکی در شرایط کنترل‌شده و غیره کاربرد داشته باشد.

REFERENCES

1. Beasley, R. R. & Pijut, P. M. (2013). Regeneration of plants from *Fraxinus nigra* Marsh. hypocotyls. *Horticultural Science*, 48, 887-890.
2. Bonyanpour, A. & Khosh-Khui, M. (2013). Callus induction and plant regeneration in *Punica granatum* L. 'Nana' from leaf explants. *Journal of Central European Agriculture*, 14(3), 75-83.
3. Chen, J. & Wei, X. (2018). Thidiazuron in micropropagation of aroid plants. *Thidiazuron: From Urea Derivative to Plant Growth Regulator*. (pp. 95-113). Springer, Singapore.
4. Davey, M. R., Anthony, P., Power, J. B. & Lowe, K. C. (2005). Plant protoplasts: status and biotechnological perspectives. *Biotechnology Advances*, 23, 131-171.
5. Deein, W., Thepsithar, C. & Thongpukdee, A. (2013). *In vitro* culture meddium sterilization by chemicals and essential oils without autoclaving and growth of *Chrysanthemum* Nodes. *International Journal of Bioengineering and Life Sciences*, 7(6), 407-410.
6. Dimmitt, M. A. & Hanson, C. (1991). The genus *Adenium* in cultivation. Diplorhynchus Welw Fic & Hiern (Apocynaceae), Mededelingen. *Cactus and Succulent Journal*, 63, 223-225.
7. Heinz, D. J. & Mee, G. W. P. (1969). Plant differentiation from callus tissue of *Saccharum* species. *Crop Science*, 9, 346-348.
8. Huetteman, C. & Preece, J. (1993). Thidiazuron: a potent cytokinin for woody plant tissue culture. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 33, 105-119.
9. Kanchanapoom, K., Sunheem, S. & Kanchanapoom, K. (2010). *In vitro* propagation of *Adenium obesum* (Forssk.) Roem and Schult. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, 38(3), 209-213.
10. Lee, J. H. & Pijut, P. M. (2017). Adventitious shoot regeneration from in vitro leaf explants of *Fraxinus nigra*. *Plant Cell Tissue Organ Culture*, 130, 335-343.
11. Li, J. J., Wu, Y. M., Wang, T. & Liu, J. X. (2009). *In vitro* direct organogenesis and regeneration of *Medicago sativa* L. *Biologia Plantarum*, 53, 325-328.
12. Lim, Z. X., Ling, A. P. K. & Husseni, S. (2009). Callus induction of *Ocimum sancatum* and estimation of its total flavonoids content. *Asian Journal of Agriculture Science*, 1, 55-61.
13. Madani, G., Ghobadi, S., Seyed-Tabatabaei, B. E., Talebi, M. & Yamchi, V. (2013). Effect of plant growth regulators and explant types on regeneration and micropropagation of a commercial strawberry cultivar (*Fragaria×ananassa* cv. Selva). *Journal of Science and Technology of Greenhouse Culture*, 15, 111-122. (in Farsi)
14. Mehrabani, B., Nazeri, S. & Piri, K. (2013). Effect of BA and NAA hormones on shoot regeneration and total Phenol and Flavonoied compounds of Chaei Koohi (*Stachy slavandulifolia* Vahi.) *in vitro* culture. *Agricultural Biotechnology*, 4(1), 1-9. (in Farsi)
15. Oyen, L. P. (2008). *Adenium obesum* (Forssk.) Roem. & Schult. *Plant Resources of Tropical Africa*, 11(1), 46-49.

16. Peres, L. E. P., Majerowicz, N., Gilberto, E. & Kerbauy, B. (2001). Dry matter partitioning differences between shoots and roots in Two contrasting genotypes of Orchids and their relationship with endogenous levels of Auxins, Cytokinins and Abscisic acid. *Departamento de Botanica*, 5, 422-970.
17. Rasad, F. M., Hasbullah, N. A., Daud, N. F., Azis, N. A., Amin, M. A. M. & Lassim, M. M. (2015). Micropropagation of *Adenium obesum* (Desert Rose) *In Vitro*. *International Conference on Agricultural, Ecological and Medical Sciences*, 7 April., Phuket, Thailand. Pp. 10-12.
18. Schenk, R. U. & Hilderandt, A. C. (1972). Medium and techniques for induction and growth of monocotyledonous and dicotyledonous plant cell cultures. *Canada Journal of Botany*, 50, 199-204.
19. Sorin, C., Bussell, J., Camus, I., Ljung, K., Kowalczyk, M., Geiss, G., McKhann, H., Garcion, C., Vaucheret, H., Sandberg, G. & Bellini, C. (2005). Auxin and light control of adventitious rooting in Arabidopsis require Argonaut. *The Plant Cell*, 17(5), 1343-1359.
20. Srivastava, L. M. (2002). *Plant growth and development: hormones and environment*. Elsevier.
21. Taghizadeh, M. & Solgi, M. (2015). Introduction of commercial protocol for in vitro proliferation of *Brassica oleracea* var. acephala. *Iranian Journal of Horticultural Science*, 45(4), 475-484. (in Farsi)
22. Talukdar, T. (2012). Deveiopment of Nacl-tolerant line in an endanger ornamental Adenium multiflorum klotzsch *in vitro* selection. *International Journal of Recent Scientific Research*, 813-821.
23. Thrope, T. A. (1981). *Plant tissue culture: methods and applications in agriculture*. New York, Academic Press.
24. Voisey, C. R., White, D. W, Dudas, B., Appleby, R. D., Ealing, P. M. & Scott, A. G. (1994). Agrobacterium-mediated transformation of white clover using direct shoot organogenesis. *Plant Cell Reports*, 13, 309-314.
25. Wei, Z., Qiang, F., Xigang, D. & Manzhu, B. (2008). The culture of isolated microspores of ornamental kale (*Brassica oleracea* var. acephala) and the importance of genotype to embryo regeneration. *Scientia Horticulturae*, 117, 69-72.
26. Win, N. K. K., Back, C. G., Kim, Y. H. & Jung, H. Y. (2012). Desert rose witches' broom disease associated with '*Candidatus* Phytoplasma aurantifolia'. *Journal of General Plant Pathology*, 78(1), 73-76.