مجله بیوتکنولوژی کشاورزی

علمی-پژوهشی و ISC

بررسی امکان ریزازدیادی گیاه زینتی دراسنا با استفاده از روش کشت درون شیشه‌ای

رضا شیرزادیان خرم آباد[1*]، صدیقه نصررمزی[2]، اشرف السادات میرعباسی[3]

[1] استادیار گروه بیوتکنولوژی گیاهی دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه گیلان

[2] دانشجوی دکتری بیوتکنولوژی گیاهی، دانشگاه گیلان

[3] کارشناس پژوهشی پژوهشکده محیط زیست، جهاد دانشگاهی گیلان

تاریخ دریافت: ۱۳۹۱/۰۹/۰۷، تاریخ پذیرش: ۱۳۹۲/۰۸/۰۵

چکیده

دراسنا (*Dracaena*) از جمله گیاهان ارزشمند و زینتی در ایران و جهان محسوب شده که تکثیر انبوه و ایجاد تنوع ژنتیکی در آن در تحقیقات ریز ازدیادی و به‌نژادی از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. در این تحقیق به‌منظور کالوس‌زایی و باززایی رقم Tricolor از گونه *Dracaena marginata*، از قطعات کوچک جوان ساقه با طول ۰/۵ cm استفاده شد. به‌منظور بررسی کنترل آلودگی‌های سطحی بافت‌های فوق از هیپوکلریت سدیم (غلظت‌های ۱٪، ۱/۲۵٪ ۱/۵٪) در زمان‌های ۱۵ و ۱۰ دقیقه استفاده گردید. غلظت‌های متفاوت از تنظیم کننده‌های رشد 2,4-D، NAA و Kinetin در محیط پایه MS جهت ارائه مناسب‌ترین محیط غذایی به‌منظور القاء کالوس، باززایی شاخساره از کالوس و ریشه‌زایی شاخساره مورد بررسی قرار گرفت. جهت انجام بخش‌های مختلف این پژوهش از طرح‌های آزمایشی مناسب استفاده گردید. نتایج بدست آمده نشان می‌دهد که مناسب‌ترین تیمار برای ضدعفونی قطعات فوق همراه با بالاترین درصد سلامت بافت‌ها مربوط به غلظت ۱/۲۵٪ هیپوکلریت‌سدیم به مدت ۱۵ دقیقه بود. مناسب‌ترین غلظت‌های تنظیم کننده‌های رشدی در محیط MS جهت القاء کالوس در قطعات کوچک ساقه دراسنا شامل ۰/۵ mgL^{-1} 2,4-D و یا ۱ mgL^{-1} NAA و میزان ۱ mgL^{-1} از Kinetin به‌منظور باززایی شاخساره از کالوس و غلظت ۱mgL^{-1} از NAA به‌منظور القاء ریشه‌زایی در شاخساره در محیط پایه MS تعیین شد. با توجه به تعیین محیط غذایی مناسب جهت القاء کالوس در بافت ساقه دراسنا و امکان باززائی شاخساره در این تحقیق، امکان به‌نژادی و انتقال ژن‌های مطلوب به این گیاه زینتی ارزشمند تسهیل شده است.

واژه‌های کلیدی: *Dracaena marginata، باززایی، تنظیم کنندگان رشد، کالوس، کشت بافت*

[*]نویسنده مسئول: رضا شیرزادیان خرم آباد تلفن: ۰۱۳۱۶۶۹۰۲۸۲ Email: R.shirzadian@gmail.com

مقدمه

گیاه دراسنا با نام علمی *Dracaena* spp. متعلق به خانواده *Asparagaceae* بوده و با نام انگلیسی Dracaena یا درخت اژدهای ماداگاسکار[1] شناخته می‌شود. جنس *Deracaena* دارای ٦٠ گونه بوده و در زیستگاه‌های طبیعی (مناطق گرمسیری آسیا و آفریقا) به شکل درخت یافت می‌شود (Subhashini *et al*., 2011). چندین گونه آن مانند *D. marginata*، *D. Fragrans* و *D.Sanderiana* از جمله گیاهان زینتی محسوب می‌شوند (Henny and Chen, 2003). دراسناها در روشنایی کم و محدود بخوبی رشد کرده و بهترین دامنه pH برای رشد آنها در حدود ٦/٥-٦ است (McConnell *et al.,* 1980). دراسناها همچنین از موادی استروئیدی چون Sapogenins و Saponins که دارای فعالیت سیتوتوکسینی بر علیه سلول‌های سرطانی هستند غنی می‌باشند (Yokoduk *et al*., 2000). تکثیر این گیاهان علاوه بر بذر با استفاده از روش قلمه زنی امکان پذیر است. از آنجائیکه تعداد جوانه جانبی و نیز جوانه انتهایی در دراسنا محدود است، لذا تکثیر انبوه این گیاه از نقطه نظر دارویی و تجارتی از اهمیت قابل توجهی برخوردار بوده و از جمله اهداف تحقیقات ریزازدیادی و به‌نژادی محسوب می‌شود. مطالعات زیادی در زمینه ریزازدیادی انواع گونه‌های دراسنا با استفاده از روش کشت بافت انجام شده‌است. اولین بار تکثیر درون شیشه‌ای دراسنا با استفاده از جوانه انتهایی در سال ١٩٧٦ انجام شد (Miller & Murashige, 1976). مطالعات بعدی با استفاده از تکثیر جوانه جانبی در *D. deremensis* (Badawy *et al.,* 2005; Blanco *et al*., 2004) و در *D. fragrans* و باززایی قطعات ساقه در *D. marginata* (Dragan *et al*., 1989; Chua *et al*., 1981, و *D. fragrans* (Vinterhalter, 1989) صورت گرفت. تأثیر ٤ ماده تنظیم کننده رشد از جمله BA، 2,4-D، NAA و IBA بر کال‌زایی، باززایی و ریشه‌زایی قطعات کوچک ساقه *D. fragrans* بررسی شد (Vinterhalter, 1989). در پژوهشی از هورمون IAA طبیعی عصاره نارگیل برای تولید و رشد ریشه در *D. purplecompacta* L. استفاده شد (Agampodi and Jayawardena, 2009). همچنین به ترتیب غلظت‌های ٢/٣ mgL^{-1} ، ١/١ و ٠/٢ از IAA جهت کالوس‌زایی، جوانه‌زنی و ریشه‌زایی *Dracaena surculosa* استفاده شده است (Liu *et al*., 2010). استفاده از غلظت ١ mgL^{-1} از NAA و Kinetin نیز برای کالزایی قطعات کوچک دراسنا مناسب دانسته شده است (Blanco *et al*., 2004). همچنین بیشترین تعداد جوانه ساقه با افزودن ١ mgL^{-1} از IAA و Kinetin و نیز بیشترین تعداد ریشه را با افزودن ٥ mgL^{-1} از IBA به محیط کشت MS در *Dracaena fragrans* بدست آمد (Badawy *et al*., 2005). 'Tricolor' از جمله زیباترین ارقام گلدانی دراسنا از گونه *Dracaena marginata* محسوب شده که دارای برگ‌های سبز تیره با

[1] Madagascar dragon tree

حاشیه قرمز و در قسمت پایین و مرکز برگ دارای نوار طلائی رنگ است. پژوهش حاضر شناسایی مناسب‌ترین تیمار ضدعفونی قطعات کوچک و جوان ساقه‌ها با بالاترین درصد سلامت در بافت‌های فوق، و نیز بررسی مناسب‌ترین محیط غذایی القاء کالوس در قطعات کوچک ساقه *D. marginata* (Tricolor)، باززایی کالوس ها و ریشه‌زایی گیاهچه‌ها را مورد توجه قرار داد.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی، محیط کشت، تنظیم کنندگان رشد و خاک مورد استفاده

در این تحقیق از گیاه زینتی رقم 'Tricolor' متعلق به گونه *Dracaena marginata* استفاده شد. تنظیم کنندگان رشدی مورد استفاده در این پژوهش شامل NAA، 2,4-D و Kinetin (غلظت‌های مختلف صفر تا ٣ mgL^{-1}) بودند. محیط کشت اصلی و پایه مورد استفاده محیط غذایی MS با pH= ٥/٧ (Murashige & Skoog, 1962) بود. نمونه‌های کشت شده به‌منظور کالزایی، جوانه‌زنی و ریشه زایی، در اتاقک رشد در دما و فتوپریود مناسب و مورد نیاز در هر بخش نگهداری شدند. در مراحل نهایی جهت رشد و ریشه‌زایی، گیاهچه‌ها به خاک مناسب (ترکیبی از پیت‌ماس و شن) انتقال یافتند.

بررسی آلودگی‌های سطحی قطعات کوچک ساقه دراسنا

ابتدا گیاهان مادری به مدت یک ماه در گلخانه نگهداری و مراقبت‌های لازم به‌منظور رشد مناسب و سالم گیاهان اعمال گردید. از سه غلظت متفاوت هیپوکلریت‌سدیم شامل غلظت‌های ١٪، ١/٢٥٪ ١/٥٪ در ترکیب با دو دوره زمانی ١٠ و ١٥ دقیقه به‌منظور کنترل آلودگی‌های سطحی قطعات کوچک ساقه استفاده شد و مناسب‌ترین تیمار در این خصوص جهت کنترل آلودگی سطحی قطعات کوچک ساقه با بالاترین درصد سلامت و زنده‌مانی بافت‌ها شناسایی گردید.

کالوس‌زایی در قطعات کوچک ساقه دراسنا

این آزمایش به‌منظور شناسایی مناسب‌ترین محیط غذایی القاء کالوس در قطعات کوچک ساقه انجام شد. لذا قطعات کوچک سالم و جوان ساقه با طول cm ٠/٥ از گیاهان مادری جدا و پس از اعمال مناسب‌ترین روش ضدعفونی، در سطح محیط کشت MS حاوی مقادیرمتفاوتی ($٠mgL^{-1}$ ، ٠/٥ ، ١ و ٢) از تنظیم‌کنندگان رشدی NAA و 2,4-D کشت شدند. شرایط محیطی مورد نیاز نگهداری بافت‌های کشت شده، فتوپریود (١٦ ساعت روشنایی و ٨ ساعت تاریکی) و دمای ٢٦ درجه سانتی‌گراد اعمال شد. بعد از گذشت حدود ٤ هفته کالوس‌ها به تدریج و شمارش تعداد کالوس‌ها انجام و داده‌های بدست آمده بر اساس طرح کاملاً تصادفی در ٣ تکرار آنالیز شدند.

باززایی شاخساره از کالوس

به‌منظور باززایی شاخساره، کالوس‌های ایجاد شده با سن مشابه به محیط کشت MS حاوی مقادیر mgL^{-1} ۰ ، ۱ ، ۲ و ۳ از Kinetin انتقال یافتند. نگهداری بافت‌ها در این مرحله تحت فتوپریود (۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی) و دمای ۲٦ درجه سانتی‌گراد اعمال شد. در نهایت تعداد شاخساره‌های باززایی شده از کالوس‌ها شمارش شد. سپس تعداد شاخساره باززایی شده از کالوس‌ها شمارش و داده‌های بدست آمده با استفاده از طرح کاملاً تصادفی در ۳ تکرار آنالیز شد.

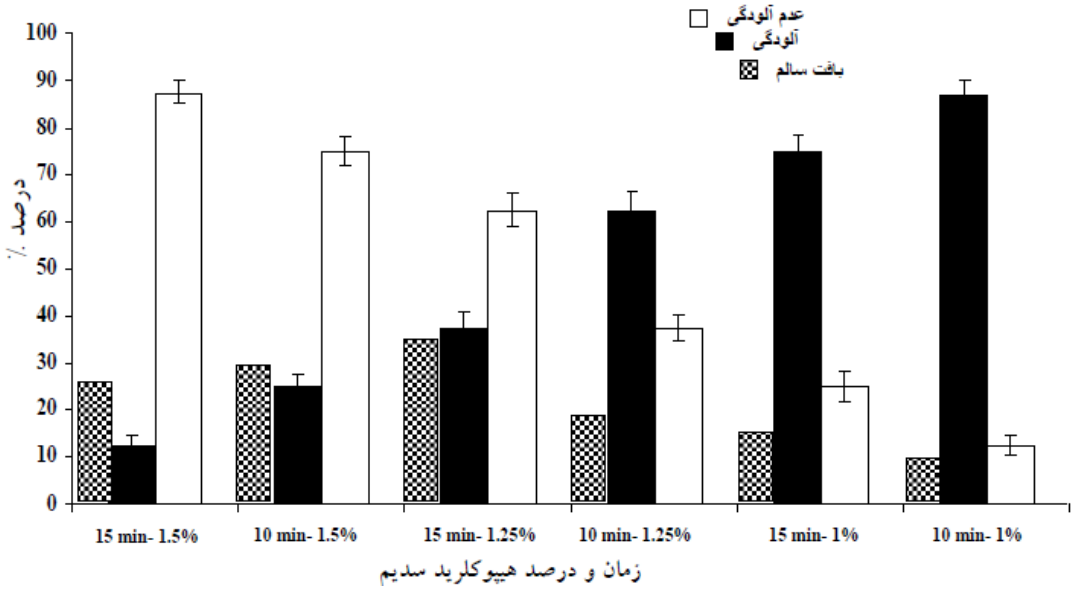
ریشه‌زایی در شاخساره‌ها و انتقال به خاک

شاخساره‌های باززایی شده از مرحله قبل به‌منظور القاء ریشه به محیط تغذیه‌ای MS حاوی مقادیر متفاوتی از NAA ($۰mgL^{-1}$ ، ۰/۵ و ۱) انتقال یافتند. محیط نگهداری شاخساره برای ریشه‌زایی شامل فتوپریود (۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی) و دمای ۲٦ درجه سانتی‌گراد اعمال شد. در این آزمایش تعداد شاخساره‌های ریشه‌دار شده شمارش و با شرایط خاک مقایسه شدند. شاخساره‌ها بعد از ریشه‌زایی و رشد کافی برای سازگاری با شرایط *in vivo* انتقال و به مدت ۲-۱ هفته در ماسه استریل و رطوبت محیطی حدود ۹۵٪ نگهداری و آنگاه به خاک مناسب رشد و نمو گیاه دراسنا منتقل شدند. لازم به ذکر است که آنالیز کلیهٔ داده‌های این پژوهش با نرم افزار MSTAT-C تحت برنامه windows انجام و تمام نمودارها با استفاده از برنامه Excel نسخه ۲۰۰۳ رسم شدند.

نتایج و بحث

کنترل آلودگی در قطعات کوچک ساقه دراسنا

حفظ سلامتی حداکثری بافت‌های کوچک ساقه مورد استفاده و کنترل مناسب آلودگی در ریزازدیادی گیاهان زینتی از اهمیت زیادی برخوردار است. نتایج این آزمایش نشان می‌دهد که افزایش غلظت و زمان تیمار بافت‌ها با محلول هیپوکلریت‌سدیم موجب افزایش امکان کنترل آلودگی‌های سطحی در قطعات کوچک ساقه و افزایش روند خسارت به سلامت و نکروزه شدن بافت‌های مورد استفاده می‌شود (شکل۱). افزایش درصد هیپوکلریت‌سدیم به میزان ۱/۵٪ در دو فاصله زمانی ۱۰ و ۱۵ دقیقه تأثیر مطلوبی بر کنترل آلودگی بافت دارد، اما از میزان سلامت نمونه‌ها کاسته شد. اما با کاهش میزان هیپوکلریت‌سدیم به ۱٪ نیز به دلیل افزایش شدت آلودگی، بافت‌های بیشتری از بین رفت. در این خصوص استفاده از میزان ۱/۲۵٪ محلول هیپوکلریت‌سدیم به مدت ۱۵ دقیقه میانگین مطلوبی را در زمینه کنترل آلودگی (٦۳٪) و سلامت بافت‌ها (۳٦٪) ارائه نمود (شکل ۱).



شکل۱- تأثیر مقادیر مختلف هیپوکلریت‌سدیم و دورهای زمانی متفاوت بر کنترل آلودگی و سلامت بافت‌ها.

Figure 1- The effect of various concentrations of sodium hypochlorite in combination with two different time periods on decontamination and tissue healthiness.

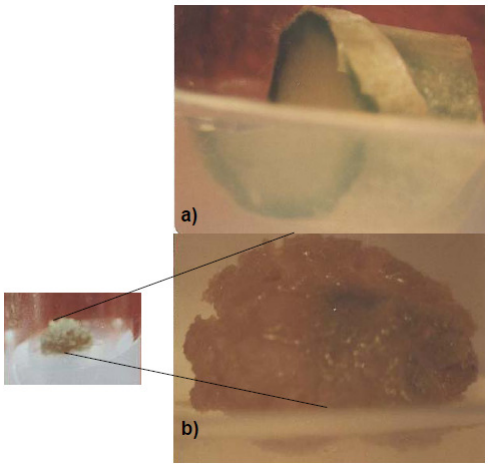
در پژوهشی استفاده از هیپوکلریت‌سدیم جهت استریل نمودن بافت‌ها مناسب شناخته شده و قرار دادن قطعات کوچک دراسنا در هیپوکلریت سدیم ۵٪ به مدت ۱۰ دقیقه جهت ضدعفونی پیشنهاد شده است (Chua *et al*., 1981). در یک بررسی متفاوت تأثیر سه ماده هیپوکلریت‌سدیم، سرکه و کیتوزان[1] بر سلامت بافت‌های *Dracaena sanderiana* بررسی و گزارش گردید. در این خصوص بیشترین درصد سلامت بافت‌ها مربوط به استفاده از کیتوزان بود، اما هیپوکلریت‌سدیم نیز در این مورد دارای کارایی قابل قبولی بود (Gunathilake and Abeywickrama, 2011). در پژوهشی دیگری استفاده توأم از هیپوکلریت‌سدیم و مرکوریک‌کلراید[2] به‌منظور استریل نمودن قطعات کوچک دراسنا موثر بود. قرار دادن قطعات کوچک در هیپوکلریت‌سدیم ٪۰/۰۷۵ به همراه ۰/۳ gL^{-1} مرکوریک‌کلراید برای مدت ۲۰ دقیقه مناسب بود، اما با افزایش میزان مصرف هیپوکلریت سدیم، تعداد بافت سالم کاهش می‌یابد (Badawy *et al*., 2005). لذا نتایج این تحقیق ضمن تأیید مطالعات انجام شده مبنی بر استفاده از هیپوکلریت‌سدیم به‌عنوان منبع ضدعفونی کننده مناسب، در کلیه مراحل آزمایش از میزان ۱/۲۵٪ محلول هیپوکلریت‌سدیم به مدت ۱۵ دقیقه جهت ضدعفونی قطعات کوچک ساقه استفاده نموده است.

[1] Chitosan

[2] Mercuric Chloride

القاء کالوس در قطعات کوچک ساقه دراسنا

به‌منظور شناسایی مناسب‌ترین محیط غذایی القاء کالوس در قطعات کوچک ساقه دراسنا، در ۲ آزمایش متفاوت سطوح مختلف دو تنظیم کننده رشد NAA و 2,4-D شامل ۰mgL^{-1} ، ۰/۵ ، ۱ و ۲ در محیط پایه MS مورد بررسی قرار گرفت. بعد از گذشت حدود ٤-۳ هفته از کشت نمونه‌های کوچک ساقه ، کالوس‌ها به تدریج ظاهر شدند. کالوس‌ها عمدتاً در نقاط برش خورده در بافت‌های کوچک جوان ساقه دراسنا القا گردید. بسیاری از کالوس‌های القاء شده در این مرحله فشرده و زرد رنگ بوده و در مراحل بعدی مورد استفاده قرار گرفتند (شکل ۲).



شکل ۲- a) کشت قطعه کوچک ساقه دراسنا (5cm) در سطح محیط کشت القا کالوس‌زایی، b) کالوس حاصله از قطعه کوچک ساقه دراسنا بعد از مدت ٤ هفته.

Figure 2- a) *Dracaena* small stem segments cultured on callus induction media, b) Callus derived from small stem segments after 4 weeks.

براساس جدول تجزیه واریانس (جدول ۱) بین سطوح مختلف 2,4-D و NAA در زمینه القاء کالوس در قطعات کوچک ساقه دراسنا اختلاف معنی‌داری در سطح ۱٪ ملاحظه می‌شود. مقایسه میانگین تأثیر سطوح مختلف تنظیم کنندگان رشد فوق بر میزان کالوس‌زایی بافت‌های ساقه با استفاده از آزمون LSD و ۵٪= α انجام شد (شکل ۳و٤). همانطور که مشاهده می‌شود در غلظت ۰/۵mgL^{-1} از 2,4-D بیشترین درصد و بعد از آن غلظت ۱ mgL^{-1} و در نهایت غلظت ۲ mgL^{-1} کمترین درصد القاء کالوس را القاء نمودند (شکل ۳). لذا با افزایش غلظت 2,4-D از ۰/۵ mgL^{-1} تا میزان ۲ mgL^{-1} از درصد کال‌زایی کاهش می‌یابد. در این خصوص می‌توان محیط غذایی حاوی ۰/۵mgL^{-1} از 2,4-D را به‌عنوان مناسب‌ترین غلظت تنظیم‌کننده رشد جهت القاء کالوس توصیه نمود. هیچگونه کالوسی در بافت‌های کوچک ساقه کشت شده بر روی محیط‌های غذایی فاقد

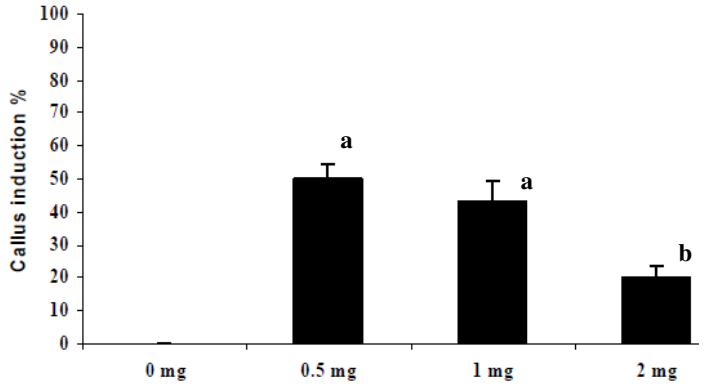
مواد تنظیم‌کننده رشد القاء نگردید. همچنین هیچگونه شاخساره‌ای از کالوس‌ها در محیط‌های حاوی2,4-D القا نگردید. لذا در قسمت بعدی باززایی شاخساره‌ها از کالوس‌ها با استفاده از تنظیم کننده رشد Kinetin مورد توجه قرار گرفت. در پژوهشی جهت کالوس زایی قطعات کوچک ساقه دراسنا دو سطح mgL^{-1} ٠/٥ و ٠/٨ از 2,4-D را بر کال‌زایی قطعات *Dracaena fragrans* cv. را بررسی و پیشنهاد شد علی رغم اینکه بیشترین درصد کال‌زایی مربوط به غلظت mgL^{-1} ٠/٨ مربوط می‌شود، اما کالوس شکل گرفته در این غلظت در مقایسه با کالوس‌های بدست آمده از غلظت mgL^{-1} ٠/٥ از توانایی باززایی کمتری برخوردارند (Wen-Liang, 2002; Wen-Liang, 2003). لذا وی غلظت mgL^{-1} ٠/٥ از 2,4-D را بهترین غلظت در زمینه کالوس زایی معرفی کرد. در پژوهشی دیگر نیز میزان 2,4-D $mg\ L^{-1}$ ٠/٢٥-٠/٥ برای کال‌زایی معرفی شد (Vinterhalter, 1989). نتایج فوق بر اهمیت تأثیر تنظیم کننده‌های فوق بر القاء کالوس از قطعات کوچک ساقه دراسنا و نیز نقش موثر آنها در زمینه جنین‌زایی کالوس‌ها صحه میگذارد. لازم به ذکر است که اکسین‌ها خصوصاً 2,4-D و NAA در زمینه القاء کالوس نقش مهمی دارند (Singh *et al.*, 2008).

جدول ١- تجزیه واریانس تأثیرات جداگانه هر یک از تنظیم کننده‌هایNAA و 2,4-D در ٢ آزمایش کال‌زایی قطعات کوچک ساقه دراسنا و آزمایش تأثیرKinetin بر باززایی کالوس‌ها.

Table 1- Variance Analysis of individual effects of various levels of 2,4-D and NAA on callus induction in small stem segments of *Dracaena* and effect of Kinetin on plantlet regeneration from callus.

	درجه آزادی df	مجموع مربعات SS	میانگین مربعات MS	ارزش F F_{value}
2,4-D	3	47	15.667	14.446**
NAA	3	50.917	16	67.889**
Kinetin	3	104.258	37.750	69.500**

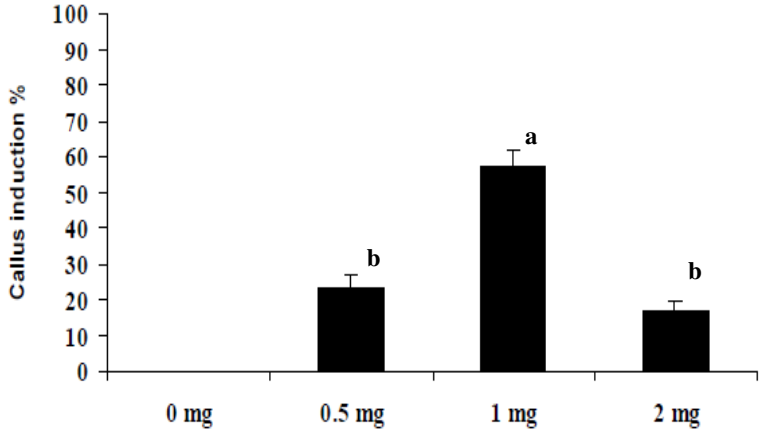
** در سطح احتمال ١٪ و ٥٪ معنی‌دار است.



شکل ۳- مقایسه میانگین تأثیر غلظت‌های متفاوت 2,4-D بر القاء کالوس در قطعات کوچک ساقه دراسنا.

Figure 3- Mean comparison of different concentrations of 2, 4-D on *Dracaena* callus induction.

بر اساس نتایج بدست آمده در خصوص بررسی تأثیر سطوح مختلف NAA (شکل ٤)، هیچگونه کالوسی در بافت‌های کشت شده روی محیط‌های غذایی فاقد NAA تشکیل نشد. همچنین غلظت $۱mgL^{-1}$ دارای بیشترین درصد القاء کالوس و به ترتیب در غلظت‌های mgL^{-1} ۰/۵ و mgL^{-1} ۲ درصد القاء کالوس در قطعات کوچک ساقه دراسنا کاهش یافت (شکل ۳). لذا در این خصوص می‌توان محیط غذایی حاوی $۱mgL^{-1}$ از NAA را به‌عنوان مناسب‌ترین غلظت جهت القاء کالوس توصیه نمود.



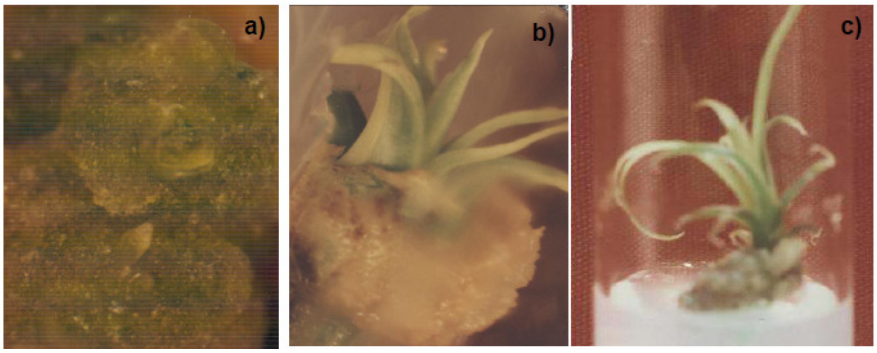
شکل ٤ - مقایسه میانگین تأثیر غلظت‌های متفاوت NAA بر القاء کالوس در قطعات کوچک ساقه دراسنا.

Figure 4- Mean comparison of different concentrations of NAA on callus induction in stem segments of *Dracaena*.

بررسی سطوح مختلف 2,4-D و NAA در زمینه القاء کالوس در قطعات کوچک ساقه دراسنا نشاندهنده اهمیت این دو ماده تنظیم کننده بر القا کالوس در قطعات کوچک ساقه دراسنا می‌باشد (Wen-Liang, 2002). بنابراین نتایج دیگر محققان نیز دستاوردهای این تحقیق را تأیید می‌کند. لذا با بر اساس نتایج حاصله، اضافه نمودن میزان ٠/٥ mgL^{-1} از 2,4-D و یا ١mgL^{-1} از NAA به تفکیک در محیط غذایی MS توصیه شده و می‌تواند موجب القاء درصد قابل توجهی از کالوس‌ها در قطعات کوچک ساقه دراسنا شود (شکل ٣ و ٤).

بازازایی شاخساره از کالوس

در این قسمت به‌منظور بازازایی شاخساره دراسنا از کالوس‌های بدست آمده، از غلظت‌های متفاوت Kinetin (٠mgL^{-1} و ١ و ٢ و ٣) در محیط کشت MS استفاده شد. بعد از گذشت ٤ هفته، القاء تمایز در کالوس‌ها به صورت تولید کلروفیل و ظاهر شدن تدریجی تمایز برگچه‌ها مشاهده شد (شکل ٥).

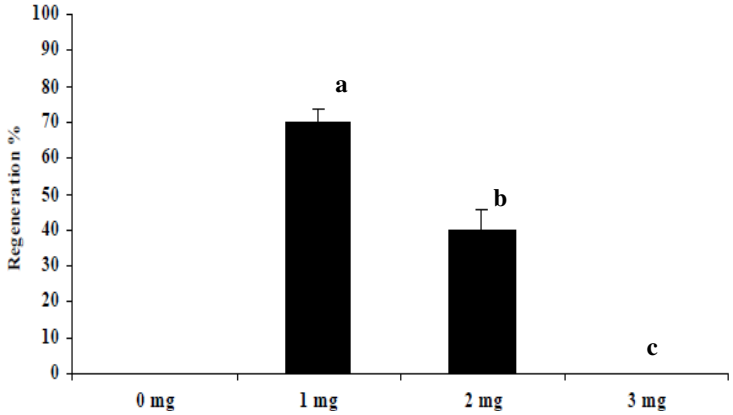


شکل ٥- تمایز کالوس‌های حاصله از قطعات کوچک ساقه دراسنا و بازازایی آنها (a-c).

Figure 5- a, b and c) callus Differentiation and regeneration from small stem segments *Dracaena*.

بر اساس نتایج تجزیه واریانس (جدول ١) در زمینه بازازایی شاخساره از کالوس‌های مورد استفاده، بین سطوح مختلف Kinetin در سطوح احتمال ١٪ و ٥٪ اختلاف معنی‌داری وجود دارد. مقایسه میانگین تأثیر سطوح مختلف Kinetin بر میزان تمایز شاخساره از کالوس‌ها با استفاده از آزمون LSD و ٥٪= α انجام شد (شکل ٦). نتایج مقایسه میانگین تأثیر سطوح مختلف Kinetin بر میزان تمایز نشان می‌دهد که بیشترین درصد بازازایی به ترتیب در غلظت‌های ١ mgL^{-1} و ٢mgL^{-1} از Kinetin به ترتیب به میزان ٦٩٪ و ٤٠٪ مشاهده شد. در غلظت ٣ mgL^{-1} از Kinetin هیچ‌گونه بازازایی در کالوس‌ها مشاهده نشد (Rout *et al.*, 1990) (شکل ٦). لذا در

صورت استفاده از Kinetin درمقادیربین ۱ mgL^{-1} و ۲ mgL^{-1} امکان القاء تمایز در کالوس‌ها افزایش می‌یابد (Chua *et al*., 1981). لازم به ذکر است که Kinetin در القاء تشکیل جوانه و باززایی شاخساره از کالوس، تقسیم سلولی و تمایز بافت-ها نقش داشته و نیز مانع از نکروزه و زرد شدن قطعات کوچک ساقه می‌شود (Singh *et al*., 2008).



شکل ٦- مقایسه میانگین تأثیر غلظت‌های متفاوت Kinetin به‌منظور باززایی و تمایز کالوس.

Figure 6- Mean comparison of different concentrations of Kinetin on callus Differentiation and regeneration.

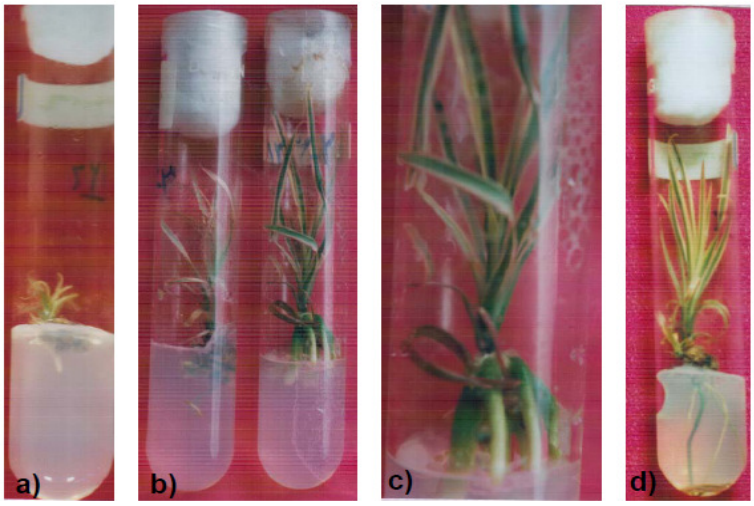
در پژوهشی میزان ۱ mgL^{-1} از Kinetin را به عنوان مناسب‌ترین غلظت جهت باززایی شاخساره‌های *Dracaena deremensis* توصیه شد (Blanco *et al*., 2004). در پژوهشی دیگر نیز غلظت ۱/۱ mgL^{-1} از IAA جهت باززایی شاخساره گیاه *Dracaena surculosa* از کالوس توصیه شده است (Liu *et al*., 2010).

غلظت‌های متفاوتی از Kinetin جهت باززایی شاخساره *Dracaena fragrans* در سه محیط کشت MS، ¾ MS و ½ MS بررسی و پیشنهاد شده است که استفاده از ۱ mgL^{-1} Kinetin همراه با ۰/۵ mgL^{-1} IAA برای باززایی شاخساره‌ها در محیط کشت ½ MS موثر بوده و با افزایش غلظت Kinetin از باززایی کاسته می‌شود (Badawy *et al*., 2005). همچنین این محیط بیشترین تعداد برگ را تولید کرد. طی پژوهشی با بهره گیری از محیط پایه MS حاوی Kinetin ۱mgL^{-1} و میزان ۰/۸ mgL^{-1} از IAA بیشترین درصد باززایی شاخساره را بدست آمد (Kobza *et al*., 1991). در باززایی گیاهچه‌های کتان از Kinetin استفاده و توصیه شده که بیشترین درصد باززایی در محیط کشت MS حاوی ۰/۲۵ mgL^{-1} Kinetin حاصل می‌شود و با افزایش از مقدار فوق درصد باززایی کاهش می‌یابد (Rauf *et al*., 2004). در پژوهشی دیگر نیز بیشترین درصد باززایی شاخساره *Dracaena marginata* cv. Tricolor از محیط MS حاوی ٤mgL^{-1} BA و ۰/۰۵mgL^{-1} NAA بدست آمد، در حالی که با استفاده از محیط کشت MS حاوی IBA و NAA (۲mgL^{-1} و۱ و ۰/۵) تعداد ریشه

افزایش چشمگیری داشت (Atta-Alla *et al.*, 1996). لذا براساس نتایج بدست آمده در این پژوهش استفاده از غلظت ١ mgL^{-1} از Kinetin در محیط پایه MS جهت باززایی شاخساره‌ها از کالوس‌های دراسنا توصیه می‌شود.

شاخساره‌های بدست آمده از مرحله قبل به‌منظور القاء ریشه‌زایی، به محیط کشت MS حاوی مقادیر متفاوت از NAA (٠mgL^{-1} و ٠/٥ و ١) انتقال یافتند (شکل٧ و٨). در این آزمایش محیط خاک استریل به عنوان شاهد در نظر گرفته شد.

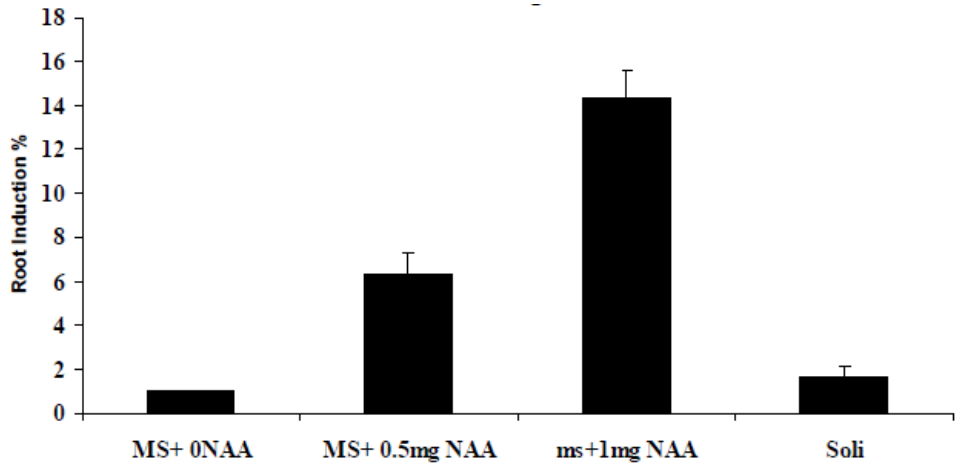
ریشه‌زایی در شاخساره



شکل ٧- ریشه‌زایی شاخساره های دراسنا در محیط کشت القاء ریشه (a-d).

Figure 7- Root induction in regenerated *Dracaena* plantlets in root induction medium (a-d).

بر اساس نتایج بدست آمده در این آزمایش استفاده از NAA در غلظت ١ mgL^{-1} میتواند بیشترین درصد ریشه‌زایی(١٤٪) را در شاخساره‌ها القاء نماید. سپس به ترتیب غلظت ٠/٥ mgL^{-1} به میزان ٦/٢٪ و نمونه شاهد یعنی گیاهچه‌های انتقال یافته به خاک با میزان ١/٩٥٪ توانستند ریشه زایی را القا نمایند. همچنین عدم استفاده از NAA کمترین درصد ریشه‌زایی یعنی ١٪ را داشت که این مقدار میزان از درصد ریشه‌زایی گیاهچه‌ها در خاک کمتر بود (شکل ٨). لذا در صورت استفاده از NAA به میزان ١ mgL^{-1}، درصد ریشه‌زایی افزایش می‌یابد اما با افزایش این مقدار، درصد ریشه‌زایی کاهش یافت (شکل ٨).



شکل ۸- تأثیر غلظت‌های متفاوت NAA بر القاء ریشه در دراسنا در مقایسه با خاک.

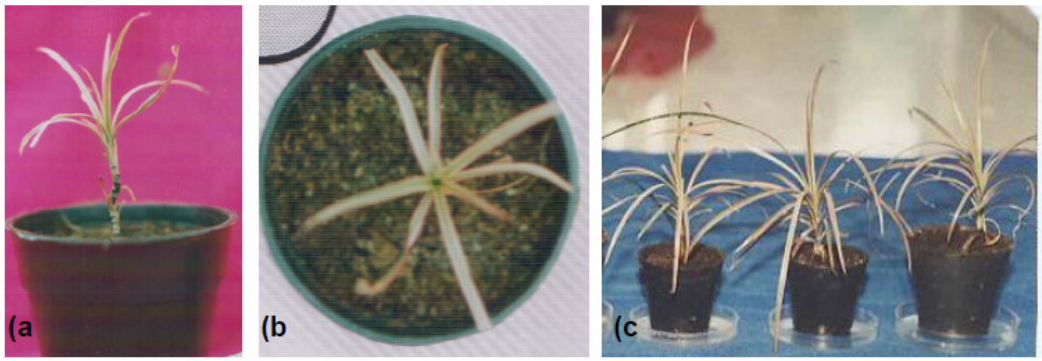
Figure 8- Effect of various concentrations of NAA on root induction in *Dracaena* in comparison with soil.

براساس مطالعات انجام شده تعیین گردید که ۱۰۰-۹۰٪ ریشه‌زایی در محیط حاوی NAA رخ داده و موجب کوتاه و ضخیم شدن ریشه‌ها می‌شود (Stankovic, 1991). همچنین استفاده توأم از IBA و NAA را بر ریشه‌زایی بررسی و بیان شد که غلظت ۱ mgL^{-1} از NAA بیشترین تعداد ریشه را تولید نمود و موجب کاهش طول ریشه می‌شود (Badawy *et al*., 2005). همچنین با افزایش غلظت NAA تا ۵ mgL^{-1} رشد ریشه متوقف شد. سطوح مختلف NAA (۰ ppm، ۱۰۰، ۲۰۰، ۳۰۰ و ٤۰۰) در زمان‌های ۷۲، ٤۸ و ۲٤ ساعت روی گیاه *Dracaena sanderiana* (lucky bamboo) بررسی و مشخص شد که استفاده از میزان ۱۰۰ ppm NAA، ۲۰۰ و ۳۰۰ در زمان‌های ٤۸ و ۷۲ ساعت بیشترین درصد ریشه‌زایی را القا می‌کند (Shakouri *et al*., 2012). در این تحقیق همچنین توصیه شد که با افزایش غلظت NAA قطر ریشه افزایش ولی از طول آن کاسته می‌شود. براساس نتایج بدست آمده در تحقیق حاضر می‌توان غلظت ۱mgL^{-1} از NAA را برای القاء ریشه در شاخساره‌های باززایی شده از کالوس‌های حاصله از قطعات کوچک ساقه دراسنا توصیه نمود.

انتقال به خاک و سازگاری با شرایط *in vivo*

یکی از مهمترین مراحل تکنیک کشت بافت انتقال موفقیت‌آمیز گیاهان بعد از تکثیر از محیط *in vitro* به *in vivo* است که به دلیل تغییر شرایط محیطی ضروری است با دقت و توجه ویژه انجام گیرد. شرایط *in vitro* عموماً شامل نور کم، رطوبت زیاد و ریشه‌زایی ضعیف است، در حالی که شرایط *in vivo* از نظر نور و حرارت بسیار متفاوت است (Wardle *et al*., 1983). براین اساس ابتدا روی گلدان‌ها یک مانع

پلاستیکی همراه با چند منفذ به‌منظور هوادهی مناسب قرار می‌گیرد. بعد از مدت یک هفته و اطمینان از رشد مناسب گیاهچه‌ها، سرپوش فوق برداشته می‌شود. قابل ذکر است که یکی از نهاده‌های اصلی تولید برای پرورش گیاهان زینتی به ویژه گیاهان گلدانی، بسترهای کشت مناسب است. لذا تأمین و آماده‌سازی خاک مناسب برای دراسنا دارای اهمیت ویژه‌ای است. بدین منظور گیاهچه‌ها به مدت ٢-١ هفته در ماسه استریل و رطوبت محیطی حدود ٩٥٪ نگهداری و آنگاه به خاک مناسب (ترکیبی از پیت ماس و شن با نسبت ١:١) شده و به گلخانه انتقال یافتند (شکل ٩).



شکل ٩- انتقال گیاهچه‌های دراسنا به خاک (a-c).

Figure 9- Transfer of *Dracaena* plantlets to the proper soil (a-c).

در مجموع می‌توان گفت مناسب‌ترین غلظت تنظیم کننده رشد جهت القاء کالوس در قطعات کوچک ساقه دراسنا ٠/٥mgL^{-1} 2,4-D و ١mgL^{-1} NAA و میزان ١mgL^{-1} Kinetin به‌منظور باززایی شاخساره از کالوس و غلظت ١mgL^{-1} NAA به‌منظور القاء ریشه‌زایی در شاخساره در محیط غذایی MS است. همچنین می‌توان گفت که با توجه به ارائه مناسب محیط غذایی جهت القاء کالوس در بافت ساقه دراسنا و امکان باززائی شاخساره‌ها، امکان به‌نژادی این گیاه زینتی و استفاده از این روش جهت انتقال ژن‌های مطلوب فراهم شده است.

منابع

Atta-Alla H, Zaghloul M, Waly AK, Khattab SH (1996). Micropropagation of some Ornamental plants. *In vitro* culture and establishment of *Dracaena marginata* var. Tricolor. Annals of Agricultural Science 34: 1153-1162.

Agampodi VA, Jayawardena B (2009). Effect of coconut (*Cocos nucifera* L.) water extracts on adventitious root development in vegetative propagation of *Dracaena purplecompacta* L. Acta Physiologiae Plantarum 31: 279–284.

Badawy EM, Afaf MA, El-Bana A, Gehan M (2005). Propagation of *Dracaena fragrans* plants by tissue culture technique. Arabian Journal of Biotechnology 8: 329-342.

Blanco M, Valverde R, Gomez L (2004). Micropropagation of *Dracaena deremensis*. Agronomia Costarricense 28: 7-15.

Chua BU, Kunisaki JT, Sagawa Y (1981). *In vitro* propagation of *Draceana marginata* Tricolor. Horticulture Science 16: 494.

Dragan VV (1989). *In vitro* propagation of green foliage *Dracaena fragrans* Ker. Plant Cell Tissue and Organ Culture 17: 13-19.

Gunathilake C, Abeywickrama KP (2011). Growth promotion and preservation of bare rooted plants of *Dracaena sanderiana* for commercialization. Tropical Agricultural Research & Extension 14: 1-4.

Kobza F, Vachunova J (1991). Propagation of *Dracaena in vitro.* Propagation of *Dracaena Concina.* Acta University of Agriculture Faculty of Horticulture 6: 51-55.

Henny RJ and J Chen (2003). Cultivar development of ornamental foliage plants, p. 245–290. In: Janick, J. (ed.). Plant breeding reviews. Volume 23. John Wiley and Sons, Inc., Hoboken, NJ.

Liu J, Deng M, Henry RJ, Chen J (2010). Regeneration of *Dracaena surculosa* Through Indirect Shoot Organogenesis. Horticulture science 45:1250-1254.

McConnell DB, Henley RW, Biamonte RL (1980). Commercial foliage plants. pp. 544-593. In: Joiner, J. N. (ed.) Foliage Plant Production. Prentice-Hall, Inc. Englewood Cliffs, UK.

Miller LR, Murashige T (1976). Tissue culture propagation of tropical foliage plants. *In vitro* 12:797-813.

Murashige T, Skoog F (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Plant Physiology 15: 473-497.

Rauf S, Rahman H, Manzoor Khan T (2004). Effect of kinetin on multiple shoot induction in cotton (*Gossypium hirsutum* L.) cv. NIAB-999. Iranian Journal of Biotechnology 2: 279-282.

Rout GR, Debata BK, Das P (1990). *In vitro* clonal multiplication of roses. Proceedings of the National Academy of Sciences 60: 311- 318.

Shakouri MJ, mohammadi J, Shahmohammadi S, Kapourchal SA (2012). Assessing the effect of different levels of NAA and time on *Dracaena sanderiana* (lucky bamboo). Indian Journal of Science and Technology 5: 0974- 6846.

Singh A, Kumar J, Kumar P (2008). Effect of plant growth regulators and sucrose on postharvest physiology, membrane stability and vase life of cut spikes of gladiolus. Plant growth Regulation 55: 221-229.

Stankovic S (1991). *In vitro* propagation of *Dracaena fragrans* ker, cordyline terminalis cv (Kiwi) and *Sansevieria trifasciata* Var. Laurentii. Original Scientific Paper 23: 35-41.

Subhashini RMB, Amarathunga NLK, Krishnarajah SA, Eeswara JP (2011). Effect of Benzylaminopurine, Gibberellic Acid, Silver Nitrate and Silver Thiosulphate, on postharvest longevity of cut leaves of *Dracaena.* Ceylon Journal of Science 40: 157-162.

Vinterhalter DV (1989). *In vitro* propagation of green-foliaged *Dracaena fragrans* Ker. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 17: 13-19.

Yokoduk A, Y Mimaki and Y Sashida (2000). Steroidal saponins from Dracaena surculosa. J. Nat. Prod. 63:1239–1243.

Wardle K, Dobbs KB, Short KC (1983). *In vitro* acclimatization of asceptically cultured plantlets to humidity. Journal of American Society of Horticultural Science 108: 386-389.

Wen-Liang LU (2002). Direct regeneration of inflorescence from callus in *Dracaena fragrans* cv. Massangeana hort. Journal of Integrative Plant Biology 44: 113-116

Wen-Liang LU (2003). Control of *in vitro* regeneration of individual reproductive and vegetative organs in *Dracaena fragrans* cv. Massangeana hort. Journal of Integrative Plant Biology 45: 1453-1464.

Assessment of micropropagation of ornamental plant "*Dracaena marginata*" using *in vitro* culture

Shirzadian-Khorramabad R. [*1], Nasr Ramzi S.[2], MirAbasi A.[3]

[1] Assistant professor, Department of plant Biotechnology, University of Guilan, Rasht, Iran.
[2] PhD student in plant biotechnology, University of Guilan, Rasht, Iran.
[3] Expert of Environmental Research Institute of Guilan Jahad-e-Daneshgahi, Rasht, Iran.

Abstract

Dracaena (*Dracaena marginata*) is one of the important economic ornamental plants in Iran as well as around the world. Micropropagation and enhancement in genetic variation of various ecotypes of this ornamental plant have been considered in several research studies for several years. The main objective of this study was maintenance of the best media culture for callus induction and shoots regeneration in *Dracaena* "Tricolor". Therefore, small stem segments of 0.5 cm in length were cut from the maternal plants. In order to set up a proper decontamination control system for *Dracaena* small stem segment, various levels of sodium hypochlorite including 1%, 1.25% and 1.5% were applied in combination with different time periods of 15 and 10 minutes. Moreover, the most suitable medium cultures for callus induction, shoots regeneration and root induction were identified. A proper statistic approach has been used for data analysis in various stages of callus induction and shoots regeneration. The obtained results showed that the most appropriate decontamination treatment to obtain the highest percentage of tissue healthiness could be applied by using 1.25% sodium hypochlorite for 15 minutes. The most suitable MS medium for callus induction was contained either 0.5 mg/l 2,4-D or 1 mg/l NAA. Moreover, applying the following growth regulators including 1 mg/l Kinetin in MS based medium, and 1 mg/l NAA provided the best results for shoots regeneration and root induction.

Keywords: *Dracaena marginata "Tricolor", regeneration, Growth regulators, Callus, Tissue culture.*

[*] Corresponding Author: Shirzadian R.K. Tel: 01316690282 Email: R.shirzadian@gmail.com