باززایی مستقیم باران طلایی (*Koelreutaria paniculata*) با استفاده از تکنیک لایه نازک سلولی (TCL) در شرایط درون شیشه ای

محمد سجاد کمالی[۱] ، هانیه هادیزاده [۱]، هما میرشاهی [۱]، لیلا سمیعی [۱*]
[۱]پژوهشکده علوم گیاهی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران

*Samiei@um.ac.ir

چکیده

درخت باران طلایی از تیره Sapindaceae، یکی از گیاهان با ارزش فضای سبز می باشد که خاطر زیبایی گل و برگ و میوه آن به عنوان درخت زینتی گلدار در مناطق معتدل جهان کشت می شود. در ایران نیز این گیاه به دلیل جذابیت ظاهری و سازگاری مناسب با شرایط آب و هوایی کشور مورد توجه قرار گرفته و در مناطق مختلف کشت شده است. روش رایج تکثیر این گیاه با بذر می باشد اما میزان جوانه زنی بذر آن به دلیل دارا بودن خفتگی فیزیکی و فیزیولوژیکی پایین است. هدف این پژوهش افزایش کارایی ازدیاد این گیاه با استفاده از تکنیک لایه نازک سلولی (TCL) در شرایط درون شیشه ای بود. بدین منظور ریزنمونه های TCL از برگ و جوانه لپه ای گیاهچه های باران طلایی که در شرایط درون شیشه ای رشد یافته بودند، تهیه شد و در محیط کشت موراشیگ و اسکوگ (MS) حاوی غلظت های مختلف بنزیل آمینو پورین (BAP) و تیدیازورون (TDZ) کشت شد و پس از دو ماه شاخص های باززایی مستقیم گیاهچه ها ارزیابی شد. بیشترین میزان باززایی مستقیم برگ و جوانه لپه ای در محیط های حاوی BAP مشاهده شد و ریزنمونه ها در محیط های حاوی TDZ، کالوس تولید نمودند و باززایی مستقیم در آنها مشاهده نشد. بیشترین درصد باززایی مستقیم در ریزنمونه های جوانه (۷۲٪) و بیشترین تعداد شاخساره باززایی شده در ریزنمونه برگ لپه ای (٦/٦٦) در محیط حاوی ۱ میلی گرم بر لیتر BAP بدست آمد که از لحاظ آماری تفاوت معنی داری با محیط حاوی ۲ میلی گرم بر لیترBAP نداشت. بالاترین میانگین تعداد شاخساره به ازای هر نمونه نیز مربوط به تیماره BAP حاوی ۱ میلی گرم بر لیتر بود. نتایج این مطالعه نشان داد که استفاده از تکنیک TCL برای ازدیاد درون شیشه ای درخت باران طلایی موفقیت آمیز است و باعث افزایش راندمان تکثیر این گیاه می شود.

واژه‌های کلیدی: باران طلایی، باززایی مستقیم، پرآوری، ریزازدیادی.

مقدمه

باران طلایی (*Koelreuteria paniculata*) یکی از درختان گلدار مهم فضای سبز و متعلق به خانواده Sapindaceae می باشد. این درخت به دلیل ویژگی های ظاهری مانند گلها و میوه های زیبا بسیار مورد توجه است و تقریبا در تمام نقاط دنیا به خصوص مناطق

معتدل کشت می شود. مرکز اولیه پراکنش آن، مناطق شرقی آسیا شامل کره و چین می باشد (Ertekin, 2011; Rehman & Park, 2000). این گیاه علاوه بر دارا بودن ویژگی های زینتی و دارویی با ارزش ، تحمل نسبتا خوبی به شرایط نامساعد محیطی دارد و قابلیت رشد و پرورش در طیف وسیعی از خاک ها را نیز دارد (Yang et al., 2018). روش اصلی تکثیر این گیاه از طریق بذر می باشد اما بذور این گیاه به دلیل داشتن خفتگی فیزیکی و فیزیولوژیکی،درصد جوانه زنی پایینی دارند (Park & Rehman, 1999). بنابراین استفاده از تکنیک کشت بافت می تواند در تکثیر انبوه این گیاه در مدت زمان کوتاه بسیار موثر باشد (Hassan & Zayed, 2018). یکی از روش های تکثیر درون شیشه ای، تکنیک لایه های سلولی نازک (TCL) می باشد. از این روش به میزان وسیعی بخصوص در کشت بافت گیاهان زینتی و همچنین مطالعات باززایی گیاهان استفاده می شود (Da Silva et al. 2013). از جمله مزیت های کشت لایه نازک سلولی می توان به تعیین دقیق غلظت موثر تنظیم کننده های رشد گیاهی برای بررسی فرآیندهای ریخت زایی (Tran, 1980)، تشکیل مستقیم شاخساره در ارکیده (Le et al., 1999)، تولید، تکثیر و بهبود گیاهان زینتی اشاره نمود (Teixeira and Fukai, 2002, Mirsahi, et al. 2020). تحقیقات گذشته نشان داده است که نرخ تکثیر گیاه باران طلایی در شرایط درون شیشه ای پایین است. کمالی و همکاران، ۱۳۹۸) محیط کشت MS حاوی ۱ تا ۲ میلی گرم بر لیتر BAP را به عنوان محیط مناسب تکثیر درون شیشه ای گیاه باران طلایی معرفی کردند. در مطالعه ای دیگر نیز که بر روی القا جنین سوماتیکی باران طلایی انجام شد، مشخص گردید که NAA در غلظت ۰/۱ میلی گرم در لیتر تاثیر بیشتری در مقایسه با 2,4-D در القاء جنین سوماتیکی در این گیاه دارد (Yang et al., 2018). هدف از انجام این تحقیق، افزایش باززایی گیاهچه های باران طلایی با استفاده از تکنیک لایه های سلولی نازک از ریزنمونه های برگ و جوانه لپه ای در محیط کشت MS حاوی تیمارهای مختلف هورمونی در محیط درون شیشه ای بود.

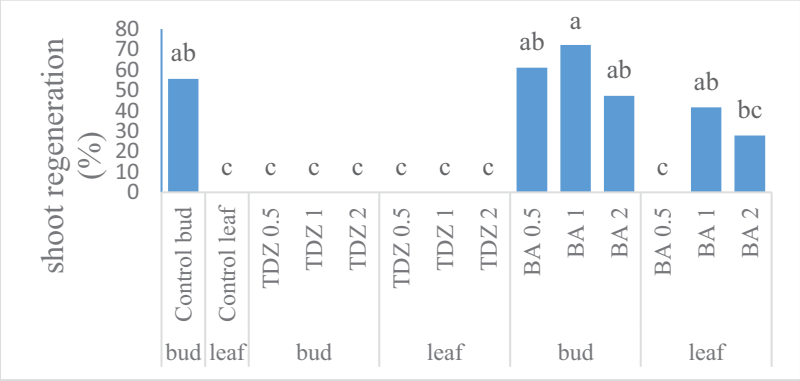
مواد و روش ها

ابتدا بذور باران طلایی که در پاییز جمع آوری شده بودند، جهت رفع خفتگی فیزیولوژیکی به مدت دو ماه در یخچال در دمای ٤ درجه سانتی گراد نگهداری شدند. سپس بذور با استفاده از اتانل ۷۰ درصد به مدت ۱ دقیقه و پس از آن با هیپوکلریت سدیم ۲ درصد به مدت ۱۰ دقیقه ضدعفونی شدند و در انتها به مدت ۱۵ دقیقه و سه مرتبه با آب مقطر دو بار تقطیر استریل آبشویی شدند. پس از آن بذور در محیط کشت موراشیگ و اسکوگ فاقد تنظیم کننده های رشد کشت شدند. پس از گذشت یک ماه و جوانه زنی بذور، ریزنمونه های لایه نازک سلولی از ریزنمونه های برگ لپه ای و جوانه لپه ای تهیه شد. سپس ریزنمونه ها در محیط کشت MS حاوی تیمارهای بنزیل آمینوپورین (BAP) و تیدیازورون (TDZ) به صورت جداگانه با غلظت های ۰، ۰/۵، ۱و ۲ میلی گرم در لیتر کشت شدند. پس از گذشت دو ماه از کشت ریزنمونه ها، شاخص های باززایی گیاهان شامل درصد باززایی شاخساره، تعداد شاخساره باززایی شده، میانگین تعداد شاخساره باززایی شده به ازای هر ریزنمونه در هر تیمار و تکرار مورد ارزیابی قرار گرفت. این پژوهش در قالب طرح به طور کامل تصادفی با ٦ تکرار و هر تکرار حاوی ٦ ریزنمونه انجام شد. آزمون آنالیز واریانس به منظور تجزیه و تحلیل داده ها با نرم افزار Minitab (نسخه ۱۷) انجام شد و مقایسه میانگین داده ها نیز با آزمون توکی (Tukey test) انجام شد.

نتایج و بحث

بر اساس نتایج این پژوهش، بیشترین درصد باززایی مستقیم در ریزنمونه های جوانه لپه ای در محیط کشت BAP ۱ میلی گرم بر لیترBAP به میزان ۷۱/۲۲ درصد مشاهده شد که تفاوت معنی داری با سایر غلظت های BAP و همچنین با میزان باززایی ریزنمونه های برگ لپه ای در محیط حاوی ۱ میلی گرم بر لیتر BAP (نمودار۱). نتایج نشان داد افزایش میزان BAp در محیط کشت موجب کاهش درصد باززایی مستقیم در هر دو نوع ریز نمونه می شود.

ریزنمونه های جوانه لپه ای در محیط شاهد نیز حدود ۵۵/۵۵ درصد باززایی مستقیم نشان دادند اما شرایط برای ریزنمونه های برگ لپه ای در محیط شاهد متفاوت بود و ریزنمونه ها پاسخی نشان ندادند. میانگین درصد باززایی مستقیم ریزنمونه های جوانه لپه ای بیشتر از ریزنمونه های برگ لپه ای در محیط های حاوی BAP بود. ریزنمونه های جوانه و برگ لپه ای که در محیط TDZ قرار داشتند، تنها کالوس تولید نمودند و باززایی مستقیم گیاهچه در این محیط ها انجام نشد (نمودار۱). بنابراین حضور TDZ در محیط کشت هر دو نوع ریز نمونه در باززایی مستقیم موثر نبود.



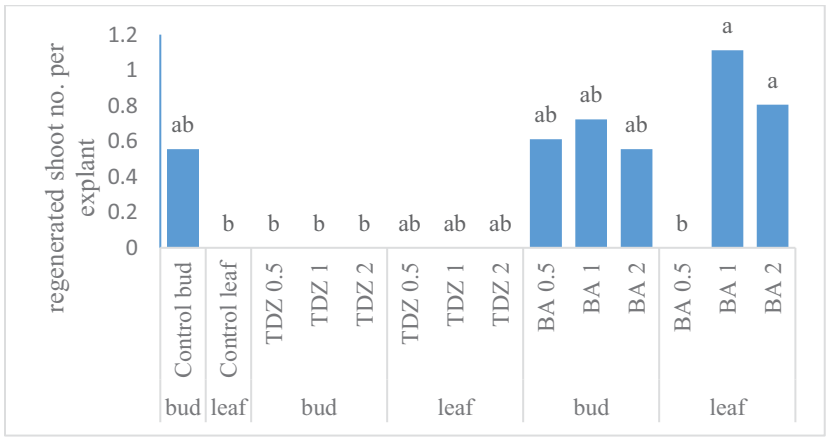
نمودار ۱- درصد باززایی مستقیم در ریزنمونه های جوانه و برگ لپه ای در محیط های BA و TDZ

بیشترین تعداد شاخساره باززایی شده نیز در ریزنمونه برگ لپه ای در محیط حاوی ۱ میلی گرم بر لیتر BAP مشاهده شد که تفاوت معنی داری با محیط کشت ۲ میلی گرم بر لیتر BAP نداشت (نمودار ۲).

تعداد شاخساره باززایی شده در ریزنمونه جوانه لپه ای کمتر از ریزنمونه برگ لپه ای در محیط BAP بود و همچنین بین غلظت های مختلف BAP نیز در ریز نمونه های جوانه تفاوت معنی داری مشاهده نشد.

غلظت های مختلف BAP تفاوت معنی داری با یکدیگر از لحاظ تعداد شاخساره باززایی شده در ریزنمونه های برگ و جوانه نداشتند. (نمودار ۲).

نمودار۲- تعداد شاخساره باززایی شده در ریز نمونه های جوانه و برگ لپه ای در محیط های BA و TDZ



نمودار ۳- میانگین تعداد شاخساره باززایی شده به ازای هر ریزنمونه

بیشترین تعداد شاخساره باززایی شده به ازای هر ریزنمونه نیز در ریزنمونه برگ لپه ای در محیط حاوی ۱ میلی گرم بر لیتر BAP مشاهده شد که تفاوت معنی داری با محیط حاوی ۲ میلی گرم بر لیتر BAP نداشت (نمودار ۳). احمدی و همکاران (۲۰۲۰) گزارش کردند نمونه های TCL گیاه ژربرا در محیط حاوی ۲ میلی گرم بر لیتر BAP و ۰/۵ میلی گرم بر لیتر TDZ حدود ٤٦ درصد باززایی نشان داد. تحقیق حاضر نشان داد که حضور TDZ در محیط هر دو نوع ریز نمونه تاثیری بر روی باززایی مستقیم گیاه باران طلایی نداشت هر چند ممکن است غلظت ها کمتر این هورمون در ترکیب با انواع اکسین ها از جمله NAA و IAA موثر باشد (Hosokawa et al, 1996)

نوع ریز نمونه و اثر متقابل آن با ترکیبات هورمونی محیط کشت می تواند بر کالوس زایی و باززایی گیاه باران طلایی موثرباشد. در مجموع با توجه به نتایج این پژوهش، برای القاء باززایی مستقیم در گیاه باران طلایی استفاده از ریزنمونه TCL برگ لپه ای و یا جوانه لپه ای در محیط کشت MS حاوی ۱ میلی گرم بر لیتر از هورمون BAP توصیه می شود. از آنجایی که ظرفیت و موفقیت باززایی مستقیم با استفاده از تکنیک TCL بستگی به عوامل مختلف ژنتیکی و اپی ژنتیکی مانند مرحله فیزیولوژیکی و منبع مورد استفاده (بافت و اندام) TCL، اثرات متقابل هورمون ها از جمله نسبت اکسین به سایتوکنین، عوامل کنترل کننده محیط از جمله نور، دما، pH، و نوع محیط کشت انتخابی (Da Silve et al, 2003) دارد، بنابراین برای دستیابی به نتیجه مطلوب لازم است اثر عوامل مختلف دیگر نیز جهت باززایی مستقیم گیاه باران طلایی مورد بررسی قرار گیرد.

منابع

Ahmadi, N. (2020). Direct organogenesis from different vegetative explants of Gerbera jamesonii cv. Nilo. *Flower and Ornamental Plants*, *5*(1), 1-12.

Da Silva, J. A. T. (2003). Thin cell layer technology in ornamental plant micropropagation and biotechnology. *African Journal of Biotechnology*, *2*(12), 683-691.

Teixeira da Silva, J. A., & Dobránszki, J. (2013). Plant thin cell layers: a 40-year celebration. *Journal of plant growth regulation*, 32(4), 922-943.

Ertekın, M. (2011). Effects of microorganisms, hormone treatment and stratification on seed germination of goldenrain tree (*Koelreuteria paniculata*). *International Journal of Agriculture and Biology*, 13(1), 38-42.

Hassan, S. A. M., & Zayed, N. S. (2018). Factor controlling micropropagation of fruit trees: a review. *Science International*, *6*(1), 1-10.

Hosokawa K, Nakano M, Oikawa Y, Yamamura S (1996). Adventitious shoot regeneration from leaf, stem and root explants of commercial cultivars *Gentiana*. *Plant Cell Report* 15:578-581.

Le, B. V., Phuong, N. T. Hang, L.T. Anh, H. and Thanh, K. T. V. (1999) High frequency shoot regeneration from *Rhynchostylis gigantean* (orchidaceae) using thin cell layers. *Plant Growth Regulation* 28: 179-185

Mirshahi, H., Mahdinezhad, N., Soloki, M., & Samiei, L. (2020). Effect of plant growth adjuvants on direct regeneration of Mohammadi flower (Rosa damascena Mill.) using thin cell layering technique. *Acta Scientiarum Polonorum, Hortorum Cultus*, *19*.

Park, I. H., & Rehman, S. (1999). Studies on seed dormancy: seeds maturation in relation to dormancy in goldenraintree (Koelreuteria paniculata Laxm.). In *VI Symposium on Stand Establishment and ISHS Seed Symposium 504* (199-208).

Rehman, S., Park, I. H. (2000).Effect of Scarification, GA and Chilling on the Germination of Goldenrain-Tree (*Koelreuteria paniculata* Laxm.) Seeds. *Scientia Horticulturae*, 85(4), 319-324.

Tran T. V. K. (1980) Control of morphogenesis by inherent and exogenously applied factores in then cell layer. *International Review of Cytology* 32:291-31

Teixeira, D. S. J. A. and Fukai, S. (2002) Increasing transient and subsequent stable transgene expression in chrysanthemum (*Dendranthema x grandiflora* (Ramat.) Kitamura) following optimization of particle bombardment and Agroinfection parameters. *Plant Biotechnology* 19: 229-240.

Yang, L. P., Zhu, J., Wang, P., Zeng, J., Tan, R., Yang, Y. Z., & Liu, Z. M. (2018). Effect of Cd on growth, physiological response, Cd subcellular distribution and chemical forms of *Koelreuteria paniculata*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, *160*, 10-18.

Direct regeneration of *Koelreutaria paniculata* using thin cell layer technique *in vitro*

Mohammad Sajjad Kamali[1], Hanieh Hadizadeh[1], Homa Mirshahi[1], Leila Samiei[1]*
Research center for Plant Sciences, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran
*Samiei@um.ac.ir

Abstract

Golden rain tree, of Sapindaceae family, is known as one of the important landcape trees in temperate regions of the world due to its attractive flowers, leaves and fruits. It is also appreciated in Iran owing to its aesthetic features and appropriate adaptability to climatic conditions. This plant is commonly propagated by seed; however, the rate of seed germination is often low because of the seed physical and physiological dormancy. This study aimed at enhancing the propagation efficiency of golden rain tree using thin cell layer technique (TCL) *in vitro*. TCL explants were prepared from the cotyledonary leaves and buds of *in vitro* grown seedlings and cultured in Murashig and Skoog (MS) medium supplemented with varying concentrations of Benzylaminopurine (BAP) and Tidiazurone (TDZ), separately. The highest direct regeneration rate of leaves and bud explants, was observed in media containing BAP, however, explants in TDZ-supplemented media, only produced callus. The highest rate of direct regeneration observed in bud explants (72%) while the maximum number of regenerated shoots obtained in leaf explants (6.66) both in the medium containing 1 mg/l BAP. The highest mean number of regenerated shoots per explant was also corresponded to media containing 1 mg/l BAP. The results of this study, indicated that TCL technique is an appropriate method for enhancing propagation efficiency of golden rain tree.

Keywords: *Koelreutaria paniculata,* direct regeneration, proliferation, micropropagation.