# کالزایی و باززایی شاخه ارس *Juniperus excelsa* با استفاده از روش درون شیشه‌ای

پروین صالحی شانجانی[1]

## چکیده

جوانه‌زنی و زنده‌مانی کم رویانهای بذرهای ارس یکی از مهمترین مشکلات جنگلکاری این گونه درختی می‌باشد. صرف نظر از مشکلات موجود در روشهای تکثیر جنسی این گونه، از آنجایی که تاکنون موفقیتی نیز در ریشه دار کردن قلمه‌های ارس حاصل نشده، به ریز ازدیادی ارس در شرایط *in vitro* اقدام گردید.

به این منظور از سرشاخه‌های سبز درختان ۸-۱۰ ساله ارس (دارای برگهای سوزنی) نمونه‌هایی به طول ۱۰ – ۱۵ میلیمتر جمع‌آوری گردید و پس از سترون سازی در ۷ نوع محیط کشت (MS و ٦ محیط MS که محتوی نیتروژنی آن تغییر داده شده است) حاوی غلظتهای مختلفی از BAP, Kin, IBA, NAA, 2,4-D کشت گردید. سپس محیطهای کشت در یک اتاقک رشد با دمای ۲۵ درجه سانتیگراد (روزانه) و ۱۵ درجه سانتیگراد (شبانه)، ۱۲ ساعت نور ۲۰۰۰ – ۲۵۰۰ لوکس و رطوبت ۷۵ ٪ نگهداری شدند.

نتایج نشان می‌دهد که نه تنها تیمارهای هورمونی، بلکه تیمارهای ازتی نیز روی کالزایی تاثیرات مهمی می‌گذارند، به طوری که بهترین شرایط برای رشد کالوس، محیطهای کشت فاقد نیترات پتاسیم و دارای ۱۰۰ ml/l گلوتامین و نسبت هورمونی بیش از یک ۲،٤-D/BAP است. به علاوه فصل جمع‌آوری نمونه‌های گیاهی نیز عامل

۱- مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع، صندوق پستی ۱۱٦-۱۳۱۸۵، تهران، ایران. Psalehi @ rifr-ac.ir

مهمی در محدودیت کالزایی است، به طوری که کالزایی در نمونه‌های پاییزی بهتر از نمونه‌های بهاری می‌باشد.

در هیچ یک از تیمارهای هورمونی در محیط MS شاخه‌زایی صورت نگرفت، ولی تیمارهای غذایی، MS تغییر یافته، باعث تشکیل اندام گردید. به طوری که با حذف منبع نیترات آمونیوم از محیط MS نه تنها رشد جوانه جانبی اولیه بلکه تشکیل جوانه‌های نوپدید به صورت مستقیم از پهنک برگ و از کالوس مشاهده شد.

**واژه‌های کلیدی:** ارس، کشت بافت، تیمار هورمونی و تیمار نیتروژنی.

## مقدمه

ارسها درختان و درختچه‌های متعلق به خانواده *Cupressaceae* می‌باشند که حدود ٦۰ گونه و تعداد بسیاری زیر گونه دارند. گونه ارس *Juniperus excelsa* از مهمترین گونه‌های سوزنی برگ در ایران است که در نواحی گسترده‌ای از مناطق نیمه خشک مرتفع ایران رشد می‌کند.

با توجه به ازدیاد تقاضا در عرصه فراورده‌های جنگلی و پیش بینی کمبود جهانی تولیدات جنگلی در سالهای آینده، جنگلداران به روشهای مدیریت علمی جنگلداری و جنگلکاری در جهت افزایش محصولات از اراضی جنگلی روی آورده‌اند. به این منظور با استفاده از روشهای نوین اصلاح درختان می‌توان ژنوتیپ جدیدی با سرعت رشد و تولید چوب بالاتر، قابلیت رقابت بیشتر و ... ایجاد نمود. در این راستا تکثیر ژنوتیپهای جدید و تولید انبوه نهال برای توسعه اراضی جنگلی و جنگلکاری از اهمیت خاصی برخوردار است. با توجه به کارایی پایین روشهای تکثیر غیر جنسی در درختان سوزنی برگ، امکان استفاده از روش کشت بافت عملی به نظر می‌رسد (صدری و نراقی، ۱۳۷٤).

موفقترین تحقیق درباره تکثیر سوزنی برگان از طریق کشت بافت که با تحریک جوانه‌های اندامهای رویان زا انجام شده بود، در حدود ۳۸ سال قبل انتشار یافت (Konar و Oberoi، ۱۹٦۵). پس از آن گروهی از محققان این روش را توسعه بخشیده (Cheah و Cheng، ۱۹۷۸) و هم اکنون نیز این روش در سراسر جهان متداول است.

یکی از مهمترین عوامل در اجرای موفقیت آمیز روش کشت بافت، انتخاب اندام مناسب از گیاه مادر یا قطعات جداکشت می‌باشد. از رویان یا لپه‌ها به عنوان قطعات جداکشت در سوزنی برگان با موفقیت استفاده گردیده است. به طوری که Negussie (۱۹۹۷) از کشت رویان و قطعات لپه *Juniperus excelsa* در محیط پایه Eriksson (۱۹٦۵) و Murashige و Skoog (۱۹٦۲) حاوی تنظیم کننده‌های رشد، موفق به القاء تشکیل جوانه‌های نابه جا و ریشه‌زایی گردید. روش کشت شاخه‌ها (جوانه‌ها) شامل کشت سلولهای مریستم انتهایی یا جانبی (همراه چندین برگ سوزنی اولیه) سوزنی برگان می‌باشد. کشت مریستم واقعی در اصل فقط شامل سلولهای مریستمی گنبدی شکل می‌شود که در درختان جنگلی به ندرت از این روش استفاده شده است، در صورتی که سرشاخه‌های انتهایی یا جانبی (جوانه‌های) سوزنی برگان مدتها کشت گردیده و گزارش شده است ( Al-Talib و Torrey، ۱۹۵۹; Bonga، ۱۹۷۷). در مورد ارس نیز صدری و نراقی (۱۹۷٤)، Moreira-da-Silva و Debergh (۱۹۹٦)، Gomez و Segura(۱۹۹۵ و ۱۹۹٦) و Javeed و همکاران (۱۹۸۰) با کشت سرشاخه‌های انتهایی و ساقه یا برگ موفق به کشت بافت آن شده‌اند. در این روش، کشت سرشاخه گونه‌های مسن جنگلی، در آزمونهای نتاج، برتری خود را نشان داده‌اند. کشت سلول از جمله روشهایی است که مورد توجه محققان واقع شده است. جاذبه این روش با روشهای تکثیر به این دلیل است که به عنوان یک فرض قابل قبول، هر یک از سلولهای زنده قدرت و توانایی تولید سلولهای رویان زا را دارند. بنابراین در یک مرحله می‌توان تعداد بسیار زیادی رویانهای سوماتیک تولید کرد و در نتیجه تکثیر انبوه آن از لحاظ

اقتصادی مقرون به صرفه خواهد بود. موفقیت در تولید مثل از بافتهای نامتمایز (مانند کالوس و سلولهای معلق) موارد زیر را نیز امکان پذیر می‌سازد:

۱- هاپلوییدها و دیپلوییدهای هموزیگوت و استفاده از آنها در اصلاح نژاد درختان، ۲- تحریک برای ایجاد جهش و انتخاب موتانهای برتر، ۳- دستکاری در پروتوپلاست سلولهای گیاه، ٤- تغییرات در سلولهای گیاه با روش مهندسی ژنتیک. تکثیر توسط این روش به دلیل امکان بروز تغییرات ژنتیکی در مقایسه با تولید گیاه از بافتهای متمایز مانند رویان، جوانه‌ها و سرشاخه‌های درخت از مقبولیت کمتری برخوردار است. Gomez و Segura (۱۹۹٦) نیز با کشت سلول ارس موفق به تولید گیاه کامل نشدند.

## مواد و روشها

شاخه‌های (به طول ۱۰ سانتیمتری) حاوی جوانه‌های انتهایی از درختچه‌های ٦-۸ ساله جمع‌آوری و بر اساس روش زیر سترون شدند: ۱- قرار دادن قطعات گیاهی به مدت نیم ساعت در معرض آب جاری، ۲- شستشو با محلول پاک کننده آب و صابون به مدت ۳۰ دقیقه، ۳- قرار دادن قطعات گیاهی به مدت نیم ساعت در معرض آب جاری، ٤- قرار دادن قطعات گیاهی به مدت یک ساعت در محلول ۲٪ قارچ کش بنومیل و بعد شستشو با آب مقطر استریل، ٥- تکه تکه نمودن قطعات گیاهی به ابعاد ۱-۱/٥ سانتیمتر، به طوری که تمام قطعات جداکشت دارای جوانه انتهایی یا جانبی باشند، ٦- قرار دادن قطعات گیاهی به مدت ۳۰ ثانیه در محلول الکل ۷۰٪ و بعد شستشو با آب مقطر استریل، ۷- قرار دادن قطعات گیاهی به مدت ۱۰دقیقه در محلول ۱٪ کلرید جیوه و بعد شستشو با آب مقطر استریل (٤ بار)، ۸- قرار دادن قطعات گیاهی به مدت ۱۰دقیقه در محلول ٦۰٪ هیپوکلریت سدیم و بعد شستشو با آب مقطر استریل (٤ بار). سپس جداکشتهای تهیه شده به محیط کشت منتقل شدند.

محیط غذایی مورد استفاده از نوع MS (Murashige و Skoog، ۱۹٦۲) و MS تغییر یافته (صالحی شانجانی، ۱۳۷٦) (جدول شماره ۱) بود.

غلظتهای مختلفی از هورمونهای 2,4-D, NAA, HBA, Kin, BAP با دامنه غلظت ۰-۱۲ $mg.L^{-1}$ برای اکسینها و ۰-٤ $mg.L^{-1}$ برای سیتوکنینها استفاده گردید. ظرفهای کشت در اتاقکهای رشد با دمای ۲۵ درجه سانتیگراد (شبانه)، ۱۲ ساعت نور ۲۰۰۰-۲۵۰۰ لوکس و رطوبت ۷۵ ٪ نگهداری شدند.

## نتایج

### الف- کالزایی

**تأثیر تنظیم‌کننده‌های رشد در کالزایی:** در محیط پایه MS از غلظتهای متفاوت هورمونهای مختلف اکسین و سیتوکنین استفاده شد. غلظتهای هورمونی از شیبی برخوردار است که هم غلظتهای پایین و هم غلظتهای بالا را در بر می‌گیرد. نتایج حاصل از کشت قطعات جوانه انتهایی در ٤ نوع ترکیب هورمونی BAP x 2,4-D، Kin x 2,4-D، Kin x IBA و BAP x IBA به صورت کالزایی/ میزان رشد کالوس در جداول شماره ۲-۵ ارایه شده است.

نتایج نشان دادند که وجود هورمونهای اکسینی برای القا کالزایی ضروری نیست و بدون وجود آنها کالزایی انجام می‌شود (شکل شماره ۱). هیچ یک از اکسینهای بکار برده شده به تنهایی نتوانستند تکثیر مستمر کشتها را موجب شوند. در غلظتهای بالای اکسین (بیشتر از ۸ $mg.L^{-1}$) یا اصلاً کالوسی روی نمونه‌های جداکشت ایجاد نمی‌گردد و یا کالوس بسیار ضعیفی ایجاد می‌شود. شواهد حاکی از این است که افزودن Kin یا BAPبه تنهایی (در غلظتهای پایین) باعث مقداری بادکردگی (Swelling) جداکشتها شده، ولی اثر بیشتری مشاهده نمی‌شود.

ترکیب BAP x IBA باعث تشکیل کالوس در مقادیر پایین سیتوکنین (۰/۰۱–۰/۱ $mg.L^{-1}$) و بالای اکسین (٤ $mg.L^{-1}$) می‌شود (جدول شماره ۲). ترکیب Kin x IBA اثری منفی روی کالزایی دارد و در هیچ یک از تیمارها (با غلظتهای بالا و پایین) کالوس قابل توجهی مشاهده نمی شود (جدول شماره ۳). عدم ایجاد کالوس در تیمار فوق با خروج آب میان بافتی همراه است (شکل شماره ۲). ترکیبهای Kin x 2,4-D باعث تشکیل مقداری کالوس روی جداکشتها شده که مقدار آن به ویژه در مقادیر متوسط اکسین و پایین سیتوکنین بیشتر است (جدول شماره ٤). ترکیب BAP x 2,4-D باعث تشکیل کالوس بیشتری روی جداکشتها شده که میزان آن در مقادیر بالای اکسین و سیتوکنین قابل ملاحظه است (جدول شماره ٥). اغلب کالوسهای ایجاد شده در طول ٤ هفته اول، کرم رنگ و ترد هستند، ولی از هفته هشتم شروع به قهوه‌ای شدن می‌نمایند (شکل شماره ۳). بنابراین نتایج مذکور نشان دادند که در یک محیط ثابت نه تنها غلظت هورمونهای رشد بلکه نوع و ترکیب آنها از اهمیت ویژه‌ای برخوردارند. با توجه به مجموعه آزمونهای فوق، هورمون BAP بیش از Kin در کالزایی و رشد کال موثر است. محیطهای حاوی هورمون BAP در ترکیب با 2,4-D موثر تر از IBA عمل می‌کند.در هیچ یک از محیطهای MS حاوی تنظیم‌کننده‌های رشد اندامزایی مشاهده نشد. در کلیه آزمونها به استثنای سری جدول شماره ۲ که کالزایی در غلظتهای نسبتاً بالای سیتوکنین نیز مشاهده می‌شود معمولاً کالزایی در تیمارهایی که مقدار اکسین بیش از سیتوکنین است و اصولاً مقدار سیتوکنین کم می‌باشد اتفاق می‌افتد. بهترین کالوس تولید شده در محیط MS حاوی ٤ $mg.L^{-1}$ از IBA و ۰/۰۱ $mg.L^{-1}$ از BAP در شرایط تاریکی پس از ۸ هفته بدست آمد.

**تأثیر نوع و میزان منبع ازتی روی کالزایی:** جدول شماره ٦ درصد نسبی کالزایی را در محیط MS و ٦ محیط تغییر یافته MS پس از ۸ هفته قرار گرفتن در نور مقایسه می‌کند. نتایج حاصل از داده‌های تجزیه و تحلیل شده در جدول شماره ٦ بیانگر این است که

درصد نسبی کالزایی در محیط U بیش از سایر محیطها است. یعنی هنگامی که مقدار منبع نیتراتی ماکروالمانها نصف شده، ولی میزان کاهش نیترات با گلوتامین (۱۰۰ $mg.L^{-1}$) جبران می‌شود بیشترین درصد کالزایی مشاهده می‌شود. حذف کامل نیترات پتاسیم از محیط، درصد کالزایی را پایین می‌آورد (محیطهای Z و W) در حالی که حذف کامل نیترات آمونیوم تاثیر فاحشی روی درصد کالزایی نمی‌گذارد (محیطهای X و Y). میزان رشد کالوس در تیمارهای حاوی نصف هر یک از منابع نیتراتی بیش از سایر تیمارها است (محیطهای V و U). رشد کالوسها به وسیله افزودن گلوتامین افزایش می‌یابد (محیط U). در نمونه‌های پاییزه، میزان رشد کالوس در تیمارهای فاقد نیترات آمونیم (محیطهای X و Y) با MS فرق چندانی ندارد، درحالی که حذف نیترات آمونیم از محیط نمونه‌های بهاره تاثیر مثبتی روی کالزایی و رشد کالوس می‌گذارد.

در این پژوهش اثر سه ترکیب BAP x 2,4-D، BAP x IBA و BAP x NAA در میزان کالزایی/ کیفیت رشد کالوس محیط MS و ٦ محیط تغییر یافته MS بررسی شد (جدول شماره ۹). در کلیه تیمارهای فوق مقادیر بالای هورمون، ایجاد کالوس را تحریک نمی‌نماید. نتایج حاکی از برتری اثر 2,4-D نسبت به NAA و IBA است.

با توجه به این که محیطهای MS حاوی Kin موفقیت کمتری نسبت به محیطهای مشابه حاوی BAP داشتند دست به آزمونی زده شد، به طوری که ترکیب هورمونی Kin x 2,4-D در دو محیط کشت MS و Y مورد مقایسه قرار گرفت (جداول شماره ۷ و ۸). نتایج نشان می‌دهند که در محیط Y که فاقد نیترات آمونیوم، ولی واجد گلوتامین (۱۰۰ $mg.L^{-1}$) است نه تنها درصد کالزایی، بلکه سرعت رشد کالوسها نیز بیشتر از محیط MS است.

**تأثیر سایر عوامل روی کالزایی:** کالوسهای حاصل از سرشاخه‌های سبز ارس نسبت به افزایش دمای محیط حساس می‌باشند و چنانچه دما از ۲۵ تا ۳۰ درجه سانتیگراد بالا رود از کیفیت کالوس حاصل کاسته شده و در مواردی حالت سوختگی پیدا می‌کند.

کالوسهای حاصل از سرشاخه‌های سبز نهالهای چند ساله ارس نسبت به شرایط نوری و تاریکی به صورت متفاوتی پاسخ می‌دهند. پاسخ به نور با نوع فصل اثر متقابل نشان می‌دهد، به طوری که نور باعث رشد بیشتر نمونه‌های پاییزه و رشد ضعیف تر و سوختگی در نمونه‌های بهاره می‌شود.

در کشت شاخه‌های سبز،قطعات به دو صورت افقی و عمودی کشت شدند. نتایج نشان دادند که در تاریکی، کالوس در قسمتهای رأسی، ولی در روشنایی در قسمتهای قاعده‌ای نمونه‌های عمودی تشکیل می‌شود. در حالی که در نمونه‌های جداکشت افقی، قسمت عمده نمونه جداکشت به استثناء ناحیه کاملاً انتهایی کالوس تشکیل می‌شود. در جوانه انتهایی یا اصلاً کالوس بوجود نمی‌آید یا آخرین بخشی است که کالوس ایجاد می‌شود. نتایج نشان دادند که کشت افقی نمونه‌های جداکشت موفقیت آمیزتر است. میزان کالزایی در نمونه‌های پاییزه مناسب تر از نمونه‌های بهاه بوده و رشد و کیفیت کالوس بهتر است.

کالزایی در کلیه نمونه‌ها در قسمت قاعده‌ای شکمی برگها انجام می‌شود. روی سطح پشتی برگها به هیچ وجه کالوس ایجاد نمی‌شود. کالزایی از بافت مزوفیل برگ شروع شده، اپیدرم برگ را شکاف می‌دهد و رشد می‌کند (شکل شماره ۳). نمونه‌های جداکشت درشت تر (۱–۱/۵ سانتیمتر) موفقیت بیشتری نسبت به نمونه‌های کوچکتر نشان می‌دهند و وجود یا عدم وجود جوانه انتهایی تاثیری روی کالزایی یا رشد کالوس ندارند.

**ب) شاخه‌زایی**

بررسی اثر تیمارهای مختلف غذایی (تغییر مقدار نیترات محیط MS طبق جدول شماره ۱) بر رشد قطعات جداکشت نشان می‌دهد که کاهش مقادیر نیترات آمونیوم و پتاسیم

به نصف، کالزایی را به شدت تحریک می‌کند و افزودن گلوتامین می‌تواند اثر فوق را افزایش بخشد. در این حالت کالوسها کرم رنگ و سبز هستند، ولی قدرت شاخه زایی از خود نشان نمی‌دهند. حذف کامل نیترات پتاسیم تاثیر مثبتی روی کالزایی نمی‌گذارد، بلکه باعث تشکیل کالوسهای کوچک و اغلب فنل‌دار می‌شود. در چنین ترکیبی گلوتامین نیز نمی‌تواند کالزایی را بهبود بخشیده یا شاخه‌زایی را القا نماید. حذف کامل نیترات آمونیوم با وجودی که میزان کالزایی را افزایش نمی‌دهد و موجبات تشکیل کالوسهای کوچک و تیره را فراهم می‌سازد باعث پدیداری جوانه و بافت شاخه‌ای نوپدید از ٤ طریق زیر می‌شود:

۱. رشد جوانه‌های جانبی بافت جداکشت اولیه که منجر به تشکیل بافت شاخه‌ای نوپدید می‌شود (شکل شماره ٤)
۲. تشکیل جوانه جانبی در بافت شاخه‌ای نوپدید (شکل شماره ٥)
۳. تشکیل جوانه نوپدید به طور مستقیم از پهنک برگ (شکل شماره ٦)
٤. تشکیل جوانه نوپدید از کالوس (شکل شماره ۷)

همان گونه که در تصاویر مشاهده می‌شود اولاً چیرگی رأسی جوانه انتهایی چه در مورد جداکشت اولیه و چه در بافت شاخه‌ای نوپدید حذف می‌شود و جوانه‌های جانبی به سرعت رشد می‌کنند. ثانیاً بافت شاخه‌ای نوپدید شروع به کالزایی می‌نماید. این نتایج پس از سه ماه واکشت در محیط اولیه حاصل گردید و افزودن گلوتامین میزان جوانه‌زایی را تغییر نمی‌دهد. ترکیب BAP x IBA و BAP x NAA (در تقریباً تمامی غلظتهای بکار برده شده) مناسبترین ترکیب برای تشکیل جوانه بوده و ترکیب BAP x 2,4-D (در تقریباً تمامی غلظتهای بکار برده شده) جوانه‌زنی را تحریک نمی‌نماید. در هیچ یک از محیطهای مورد مطالعه تشکیل ریشه یا رویان مشاهده نشد.

## بحث

**الف) کالزایی**

مشکل جوانه‌زنی پایین، تباهی رویان و عدم ریشه‌زنی قلمه‌های ارس به وسیله روشهای ریزازدیادی اولین بار Javeed و همکاران (۱۹۸۰) را ترغیب به کشت بافت ارس نمود. تولید انبوه از طریق کشت بافت در مقایسه با روشهای تکثیر سنتی و بذر، علاوه بر محدودیتهای تکنیکی موجود در کل سیستم ریز ازدیادی سوزنی برگان پرهزینه می باشد. تولید سریع گیاهچه از گیاهان اصلاح یا دستکاری شده از مزیتهای دیگر استفاده از این روش است (صدری و نراقی ۱۳۷٤).

Javeed و همکاران (۱۹۸۰)؛ صدری و نراقی (۱۳۷٤)؛ Negussie (۱۹۹۷) ؛ Moreira-da-Silva و Debergh (۱۹۹٦) و Gomez و Segura (۱۹۹٦ و ۱۹۹۵) از جمله کسانی هستند که دست به کشت بافت ارس زده‌اند و به موفقیتهایی نیز دست یافته‌اند.

در پژوهش حاضر ابتدا اثر ترکیبهای مختلف هورمونی در یک محیط ثابت MS بر روی سرشاخه‌های انتهایی ارس بررسی گردید. همان گونه که در جداول شماره ۲-۵ مشاهده می‌شود شروع کالزایی نیاز به هورمون ندارد، ولی برای استمرار کالزایی وجود اکسین ضروری است. اکسین و سیتوکنین نه تنها درصد کالزایی را بیشتر می‌نمایند، بلکه سرعت تشکیل کالوس را نیز افزایش می‌دهند. نتایج نشان داده‌اند که هنگامی که نسبت اکسین بر سیتوکنین بیش از یک است میزان رشد کالوس سریعتر می‌شود. هر چه نسبت بزرگتر می‌شود کالزایی مناسبتر می‌گردد و هنگامی که این نسبت کمتر از یک باشد رشد کالوس آهسته‌تر بوده و در نسبتهای بسیار کوچکتر از یک، کالزایی متوقف می‌شود. نوع ترکیب هورمونی از عوامل مهم کالزایی و رشد بعدی کالوس است چنانچه استفاده از ترکیب BAP و اکسین 2,4-D مناسبتر از سایر هورمونها تشخیص داده شد. کالزایی هم در غلظتهای پایین و هم در غلظتهای بالای اکسین مشاهده می‌شود. ولی

افزودن سیتوکنین در غلظتهای بیش از یک میلی‌گرم در لیتر تاثیری منفی در کالزایی داشته و حتی رشد بعدی کالوسها را نیز کند می‌کند.

شیب کالزایی موجود که از رأس به طرف قاعده در سرشاخه جوان ارس بیشتر می‌شود با شیب میزان اکسین در کیاه مطابقت دارد. در جوانه انتهایی یا اصلاً کالوس تشکیل نمی‌شود یا آخرین بخشی است که کالوس ایجاد می‌گردد. در میان کالوسهای حاصل، بعضی از کالوسها رنگی متمایل به قهوه‌ای تیره نشان می‌دهند. بروز چنین پدیده‌ای احتمالاً ناشی از انباشته شدن کوئینونهای تولید شده به وسیله سیستم پلی فنل اکسیداز است (Welinder، ۱۹۹٤).

بررسی نوع و میزان منبع نیتراتی با تغییر مقادیر نیترات آمونیوم و نیترات پتاسیم از ماکروالمانها و وجود یا عدم گلوتامین نشان دادند که تأثیر میزان و نوع منبع ازتی همانند نوع ومیزان ترکیب هورمونی کالزایی و رشد کالوسها را محدود می‌کند. بیشترین میزان کالزایی در محیط حاوی نیمی از نیترات آمونیوم و نیترات پتاسیم (نسبت به محیط MS) وجبران آن با گلوتامین حاصل گردید. بهاری یا پاییزی بودن قطعات جداکشت نیز در کالزایی بسیار اهمیت دارد. به طوری که کالزایی در نمونه‌های پاییزی بهتر از نمونه‌های بهاری می‌باشد. نوع قطعات، اثر نور را نیز تحت الشعاع خود قرار می‌دهد جنانچه نور روی کالزایی نمونه‌های بهاری اثری منفی و روی نمونه‌های پاییزی اثری مثبت دارد.

**ب) شاخه‌زایی**

در هیچ یک از تیمارهای هورمونی روی محیط MS شاخه‌زایی صورت نگرفت، ولی تیمارهای غذایی، MS تغییر یافته، باعث تشکیل اندام گردید. به طوری که با حذف

منبع نیترات آمونیوم از محیط MS نه تنها رشد جوانه جانبی اولیه، بلکه تشکیل جوانه‌های نوپدید به صورت مستقیم از پهنک برگ و از کالوس مشاهده شد. نتایج حاکی از حذف تسلط رأسی جوانه انتهایی از روی جوانه‌های جانبی بود و در این حالت نه تنها روی بافت اولیه، بلکه روی جوانه‌های جدید نیز مشاهده گردید.

## منابع


۱- صالحی شانجانی، پ.، ۱۳۷۵.

۲- صدری، ح. ع.، نراقی، ط.، ۱۳۷٤. مروری بر ریزازدیادی سوزنی برگان با تأکید بر تحقیقات تکثیر گونه ارس به ویژه کشت جوانه انتهایی. مجله پژوهش و سازندگی، ۲۹: ۵۰-۵۵.

3- Al-Talib, K. H. and Torrey, J. G., 1959. The aseptic culture of isolated buds of *Pesudutsuga taxifolla.* Plant Physiol., 34: 630-637.

4- Bonga, J. M. 1977. Organogenesis in *in vitro* cultures of embryonic shoots.

5- Erikson (14bj) of *Abies blasama*. *In vitro*, 13: 41-48.

6- Cheah, K. J. and Cheng, T. Y., 1978. Histological analusis of adventitious bud formation in cultured doglas fir cotyledons. Am. J. Bot., 65:72-108.

7- Gomez. M. P. and Segura, J., 1995. Axillary shoot proliferation in cultures of explantas from mature *Juniperus oxycedruws* trees. Tree physiology. 16(8): 681-686.

8- Gomez. M. P. and Segura, J., 1996. Morphogenesis in leaf and single-cell cultures of mature *Juniperus oxycedruws*. Tree physiology. 15(9): 625-628.

9- Ilahi, I., 1986. Biotechnology in agriculture and forestry. Vol. 1. In: Tremblay, F. M., Perinet, P., Lalonde, M., Sakai, A., and Bajaj, Y. P. S. (Eds) Trees I. Springer Verlag Publisher, Berlin.: 321-498.

10- Javeed, Q. N.; Perveen, R.; Imtiazul, H.; Ilahi, I., 1980 Propagation of *Juniperus polycarpos* C. Koch through tissue culture. I. Induction of callus. Pakistan journal of forestry, 30(2): 72-77.

11- Konar, R. N. and Oberoi, Y. P. 1965. *In vitro* development of embryoids on the cotyledons of *Bota orientalls*. Phytomorphology, 15: 137-140.

12- Moreira-da-Silva, M. H. and Debegh, P., 1996. Clonal and topophysis effect in axillary shoot development on *Juniperus brevifolia* (Seub.) Antoine. Mededelingen Faculteit landbouwkundige en Toegepaste Biologische Wetenschappen, Universiteit Gent., 61(1): 145-149.
13- Mahmood, A., Khalida, A. and Khan, N. H., 1992. Bud multiplication in Juniper. Hamdard Medicus, 35(4): 51-56.
14- Martel, S., Houde, M., Laliberte, S. and Tremblay, M. F., 2001. Studied the effects of nitrogen source on morphogenetic pattern and glutamine synthetase expression in jack pine meristematic nodules and calli *in vitro*. Symposium on tree Biotechnology in the Next Millenium, USA.
15- Murashige, T. and Skoog, F., 1962. A resived medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Plant Physiol. 14: 10-16.
16- Negussie, A., 1997. *In vitro* induction of multiple buds in tissue culture of *juniperus excelsa.* Forest Ecology and Management, 82(2): 115-123.
17- Welinder, K. G., 1994. Plant peroxidase: Structure-function relationship. Plant peroxidase, 1980-1990.

**جدول شماره ۱- تفاوت ٦ محیط تغییر یافته MS با محیط MS بکار برده شده در این پژوهش.**

| نام تیمار<br>نام ماده | MS | X | Y | Z | W | V | U |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| $NH_4NO_3$ | ۱٦٥۰ | ۰ | ۰ | ۱٦٥۰ | ۱٦٥۰ | ۸۲٥ | ۸۲٥ |
| $KNO_3$ | ۱۹۰۰ | ۱۹۰۰ | ۱۹۰۰ | ۰ | ۰ | ۹٥۰ | ۹٥۰ |
| گلوتامین | ۰ | ۰ | ۱۰۰ | ۰ | ۱۰۰ | ۰ | ۱۰۰ |

مقادیر بر حسب $mg.L^{-1}$

**جدول شماره ۲- ماتریس میزان کالزایی/ کیفیت رشد کالوس در محیط MS و ترکیبهای هورمونی بکاربرده شده.**

| BAP<br>IBA | ۰ | ۰.۰۱ | ۰.۱ | ۱ | ۲ | ٤ |
|---|---|---|---|---|---|---|
| ۰ | I | - | - | - | - | - |
| ۰.۰۱ | I | I | - | - | - | - |
| ۰.٥ | I | I | I | I | I | - |
| ۱ | I | I | I | I | I | - |
| ۲ | I | II | II | I | I | - |
| ٤ | II | III | III | I | I | - |
| ۸ | I | I | I | - | - | - |
| ۱۲ | I | I | - | - | - | - |

-: عدم تشکیل کالوس، I: کالوس کم، II: کالوس متوسط، III: کالوس فراوان شکل شماره ۱- کالزایی در محیط فاقد هورمون.

**جدول شماره ۳- ماتریس میزان کالزایی/ کیفیت رشد کالوس در محیط MS و ترکیبهای هورمونی بکاربرده شده.**

| Kin<br>IBA | ۰ | ۰.۵ | ۱ | ۲ |
|---|---|---|---|---|
| ۰ | I | I | - | - |
| ۰.۵ | I | - | - | - |
| ۱ | I | - | - | - |
| ۲ | I | - | - | - |

-: عدم تشکیل کالوس، I: کالوس کم شکل شماره ۲- عدم ایجاد کالوس همراه خروج آب میان بافتی در محیط حاوی Kin x IBA.

**جدول شماره ٤- ماتریس میزان کالزایی/ کیفیت رشد کالوس در محیط MS و ترکیبهای هورمونی بکاربرده شده.**

| **Kin<br>2,4-D** | ۰ | ۰.۵ | ۱ | ۲ |
|---|---|---|---|---|
| ۰ | I | I | - | - |
| ۰.۵ | I | I | - | - |
| ۱ | II | II | II | - |
| ۲ | II | II | - | - |

-: عدم تشکیل کالوس، I: کالوس کم، II: کالوس متوسط

**جدول ۵- ماتریس میزان کالزایی/ کیفیت رشد کالوس در حیط MS و ترکیبهای هورمونی بکاربرده شده.**

| **BAP<br>2,4-D** | ۰ | ۱ | ۲ | ٤ |
|---|---|---|---|---|
| ۰ | I | I | I | I |
| ۰.۵ | I | I | I | I |
| ۱ | I | II | II | II |
| ۲ | I | II | II | II |

-: عدم تشکیل کالوس، I: کالوس کم، II: کالوس متوسط شکل شماره ۳- قهوه ای شدن کالوس از هفته ۸ به بعد.

**جدول شماره ٦- درصد کالزایی در محیطهای کشت مورد مطالعه.**

| | MS | X | Y | Z | W | V | U |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| تعدادقطعات کشت شده | ١٦٠ | ١٦٠ | ١٦٠ | ١٦٠ | ١٦٠ | ١٦٠ | ١٦٠ |
| تعداد قطعات کالزا | ٨٠ | ٨٦ | ٩٥ | ٧٥ | ٦٤ | ١٠٥ | ١٢٨ |
| درصد نسبی کالزایی | ٥٠ | ٥٤ | ٥٩ | ٤٨ | ٤٠ | ٦٥ | ٨٠ |

**جدول شماره ٧- ماتریس میزان کالزایی/ کیفیت رشد کالوس در محیط Y و ترکیبهای هورمونی بکاربرده شده.**

| Kin<br>2,4-D | ٠ | ٠.٠١ | ٠.١ | ١ | ٢ | ٤ |
|---|---|---|---|---|---|---|
| ٠ | I | I | - | - | - | - |
| ٠.٠١ | I | I | - | - | - | - |
| ٠.٥ | I | I | I | I | - | - |
| ١ | I | I | I | I | - | - |
| ٢ | I | I | I | I | - | - |
| ٤ | I | I | I | I | - | - |
| ٨ | I | I | I | - | - | - |
| ١٢ | - | - | I | - | - | - |

-: عدم تشکیل کالوس، I: کالوس کم، II: کالوس متوسط، III: کالوس فراوان، IV: کالوس خوب و V: کالوس عالی.

**جدول شماره ٨- ماتریس میزان کالزایی/ کیفیت رشد کالوس در محیط MS و ترکیبهای هورمونی بکاربرده شده.**

| Kin<br>2,4-D | ٠ | ٠.٠١ | ٠.١ | ١ | ٢ | ٤ |
|---|---|---|---|---|---|---|
| ٠ | I | I | I | I | I | I |
| ٠.٠١ | I | II | I | I | I | I |
| ٠.٥ | I | II | II | I | I | I |
| ١ | I | II | II | II | I | I |
| ٢ | I | II | III | III | II | I |
| ٤ | I | II | II | III | II | II |
| ٨ | I | I | I | - | - | - |
| ١٢ | - | - | - | - | - | - |

-: عدم تشکیل کالوس، I: کالوس کم، II: کالوس متوسط، III: کالوس فراوان، IV: کالوس خوب و V: کالوس عالی.

**جدول شماره ۹- ماتریس میزان کالزایی/ کیفیت رشد کالوس در محیط (MS، X، Y، Z، W، V و U) و ترکیبهای هورمونی بکاربرده شده.**

| تیمار هورمونی | غلظت ($mg.L^{-1}$) | MS | X | Y | Z | W | V | U |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| BAP x IBA | ۰.۱x۰.۵ | III | III | III | II | II | III | III |
| | ۰.۱x۲ | III | III | III | II | II | III | IV |
| | ۱x۵ | I | II | - | I | - | I | I |
| | ۱x۱۰ | - | I | - | I | I | I | II |
| BAP x 2,4-D | ۰.۱x۰.۵ | IV | I | IV | II | I | III | V |
| | ۰.۱x۲ | III | III | III | II | I | III | IV |
| | ۱x۵ | I | - | - | - | - | I | - |
| | ۱x۱۰ | - | - | - | - | - | - | - |
| BAP x NAA | ۰.۱x۰.۵ | III | III | III | II | II | III | IV |
| | ۰.۱x۲ | II | III | II | III | II | III | IV |
| | ۱x۵ | I | I | II | I | I | I | - |
| | ۱x۱۰ | - | I | - | - | - | - | - |

-: عدم تشکیل کالوس، I: کالوس کم، II: کالوس متوسط، III: کالوس فراوان، IV: کالوس خوب و V: کالوس عالی.