مجله زراعت و اصلاح نباتات
جلد ۱۳، شماره ۱، بهار ۱۳۹٦
صفحات ۹۳-۸۳

اثر ترکیب‌های مختلف تنظیم‌کننده‌های رشد بر روی کالوس‌زایی "بِه" (*Cydonia oblonga* Mill.)

Effect of growth regulators on callus induction in Quince (*Cydonia oblonga* Mill.)

الهام فائضی[۱]، منصور امیدی[۲*]، پریسا عبداللهی[۳]

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۰۱/۲۵
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۰۳/۱۵

چکیده

گیاه "بِه" به‌عنوان یک گیاه دارویی شناخته شده است. ریزازدیادی درون شیشه‌ای و القای کالوس از ریزنمونه‌های مختلف این گیاه از مراحل مهم و حساس می‌باشد. در مطالعه حاضر قابلیت کالوس‌زایی و باززا شدن مستقیم در محیط کالوس‌زایی در ریزنمونه و ترکیب‌های مختلف تنظیم‌کننده‌های رشد مورد ارزیابی قرار گرفت. از قسمت‌های برگ، ساقه، مریستم، دم‌برگ و کالوس جوانه روی ساقه چوبی گیاه "بِه" ریزنمونه تهیه شد و جهت ایجاد کالوس‌زایی از محیط کشت MS شامل سه سطح ۱، ۲ و ٤ میلی‌گرم در لیتر هورمون 2,4-D و ۰/۱، ۰/۲ و ۱ میلی‌گرم در لیتر هورمون BAP استفاده گردید، که هر کدام از تنظیم‌کننده‌های رشد به صورت یک آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی در سه تکرار بر روی محیط کشت MS مورد مطالعه قرار گرفت. بر اساس نتایج تجزیه واریانس در تمامی واکشت‌ها اثرات اصلی و متقابل برای همه صفات مورد بررسی بجز اثر اصلی BAP در واکشت اول برای صفت وزن خشک معنی‌دار شد. نتایج مقایسه میانگین در واکشت اول2,4-D، برای صفت اندازه کالوس تیمار ٤ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D با ریزنمونه کالوس جوانه بر روی ساقه (۱۹/۵ میلی‌متر)، برای صفت وزن تر کالوس تیمار ۱ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D با ریزنمونه کالوس جوانه روی ساقه و برای صفت وزن خشک تیمار ۱ میلی‌گرم در لیتر با ریز نمونه کالوس جوانه روی ساقه را به‌عنوان مناسب‌ترین تیمارها معرفی نمود. در واکشت دوم برای صفات اندازه کالوس و وزن تر کالوس، بهترین تولید کالوس در تیمار ۱ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D با ریزنمونه کالوس جوانه روی ساقه مشاهده گردید. صفت وزن خشک در تیمار ۱ میلی گرم در لیتر 2,4-D با ریزنمونه ساقه پاسخ مطلوبی نشان داد. نتایج مقایسه میانگین برای تنظیم‌کننده رشد BAP نشان داد که تیمار ۱ میلی‌گرم در لیتر BAP با ریزنمونه کالوس جوانه روی ساقه برای هر سه صفت در واکشت اول مشابه می‌باشد. در واکشت دوم صفات اندازه و وزن تر کالوس در تیمار ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر BAP با ریزنمونه مریستم بهترین پاسخ را داشتند. تنها تفاوت وزن خشک با دو صفت ذکر شده در واکشت دوم در ریزنمونه (کالوس جوانه روی ساقه) بود.

کلمات کلیدی: بِه، ریزنمونه، تنظیم‌کننده رشد، مریستم، گیاهان دارویی.

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات تهران.
۲- استاد پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، کرج.
۳- استادیار، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات.
*- مکاتبه کننده E- mail: momidi@ut.ac.ir

مقدمه

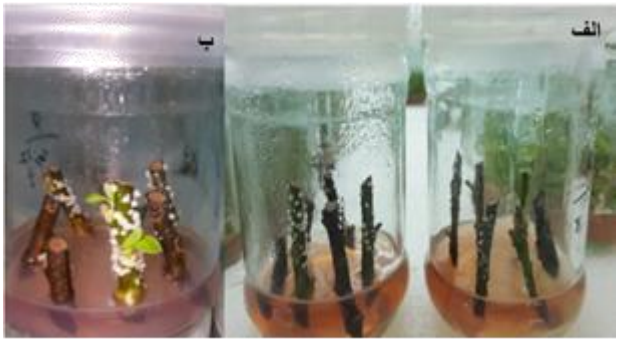
درخت "بِه"(*Cydonia oblonga*) تک گونه‌ای از خانواده Rosaceae، می‌باشد (Postman, 2009). این گیاه با آب و هوای گرم و مدیترانه‌ای سازگاری دارد (Lim, 2012). گیاه "بِه" سومین عضو مهم و اقتصادی درختان میوه دانه‌دار که نسبت به دیگر درختان معتدله، درختی کم توقع است (Sabeti, 1996). این درخت در ایران به صورت وحشی درجنگل‌های شمال کشور ازآستارا تا کتول گرگان پراکنش داشته و به‌طور عمده در استان‌هایی نظیر اصفهان، خراسان، قزوین، تهران و اردبیل در ایجاد باغ استفاده می‌شود (Khoram Del *et al*., 2010). موسیلاژی که از سلول‌های اپیدرمی پوشش دانه این گیاه به بیرون ترشح می‌شود کاربردهای زیادی در صنایع مختلف از جمله صنایع غذایی و صنایع بهداشتی دارد و از دوران باستان برای بهبود گلو درد و بیماریهای تنفسی از آن استفاده می‌شود (Nikoofar *et al*., 2013; Azad bakht, 2007; Lim, 2012). جوشانده برگ درختِ "بِه"، ورم چشم را مداوا می‌کند. آب "بِه" و هیدروالکلی "بِه" برای درمان بیماری کولیت زخمی (پس روده آماس) مؤثر واقع بوده است (Minaiyan, 2012). همچنین عصاره استخراج شده از برگ و میوه و پوست "بِه" در درمان بیماری چربی خون و فشار خون بالا مؤثر بوده است (Ablat Abliz, 2014; Wen-ting Zhou, 2014; Elzira Abdusalam, 2014). کشت بافت و سلول‌های گیاهی در محیط کشت حاوی مواد مغذی، به‌عنوان منبع تأمین کننده مواد ارزشمند و باززایی از آن‌ها، از کاربردهای بیوتکنولوژی می‌باشد و به‌عنوان روشی برای کاهش هزینه‌های تولید این مواد با ارزش گزارش شده است. از جمله کارکردهای بیوتکنولوژی، مهندسی کشت بافت و تکنیک‌های وابسته به آن است که کاربردهای بسیاری در علوم مختلف از جمله کشاورزی دارد. در گیاه "بِه" عمدتاً به‌منظور کالوس‌زایی و باززایی از ریزنمونه‌های برگ استفاده شده است (Morini *et al*,. 2000. Bllocchi *et al*., 2001; Fisichella *et al*,.2000). در اکثر مطالعات برای القای کالوس‌زایی در گیاهان مختلف از هورمون 2,4-D و BAP در غلظت‌های مختلف استفاده شده است (Mohammadi nasab *et al*., 2011; Salehiyan, 2012; Khayat zade *et al*., 2011; Arulselvi *et al*., 2009. Morini *et al*., 2000). هدف از مطالعه حاضر بررسی تأثیر غلظت‌های مختلف هورمون‌های رشدی 2,4-D و BAP در کالوس‌زایی ریزنمونه‌های مختلف گیاه "بِه" بود.

مواد و روش‌ها

تحقیق حاضر در مجتمع آزمایشگاه رازی واقع در دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران صورت پذیرفت. به علت مشکل بیماری باکتریایی آتشک سر شاخه‌های رقم "بِه" ترش اصفهان روی پایه ذالزالک از بهستان فجر اصفهان واقع در رحمت آباد اصفهان تهیه شد. برگ‌ها از ساقه‌ها جدا گردیدند و برش ساقه‌ها با ۱ الی ۲ جوانه جانبی در هر ساقه صورت گرفت و ساقه‌ها با قارچ کش ریدومیل به مدت ۱۵ دقیقه تیمار و سپس با چند قطره مایع ظرف شویی شتشو گردیدند و به مدت ۱۵ دقیقه زیر آب جاری قرار گرفتند. ساقه‌ها به مدت ۲۵ دقیقه با ۰/۲ گرم در لیتر آنتی بیوتیک سفاتوکسین تیمار و توسط کلراید جیوه ۰/۳۵ گرم در لیتر و ۱۰۰ سی‌سی هیپوکلریت سدیم ۱۰ درصد به مدت ۳ دقیقه ضد عفونی انجام شد و در نهایت با آب مقطر استریل شده سه بار شتشو داده شدند. بعد از انجام ضد عفونی، ریزنمونه‌ها به محیط کشت استقرار VS (محیط کشت حاوی آهن قرمز) بدون هورمون انتقال یافتند (شکل ۱). با سپری شدن مدت زمان نزدیک به ۲ ماه مشاهده شد که اولین جوانه‌ها شروع به سبز شدن کردند و بعد از گذشت ۳ ماه امکان استفاده از این جوانه‌های سبز شده در محیط کالوس‌زایی میسر گردید (شکل ۱).

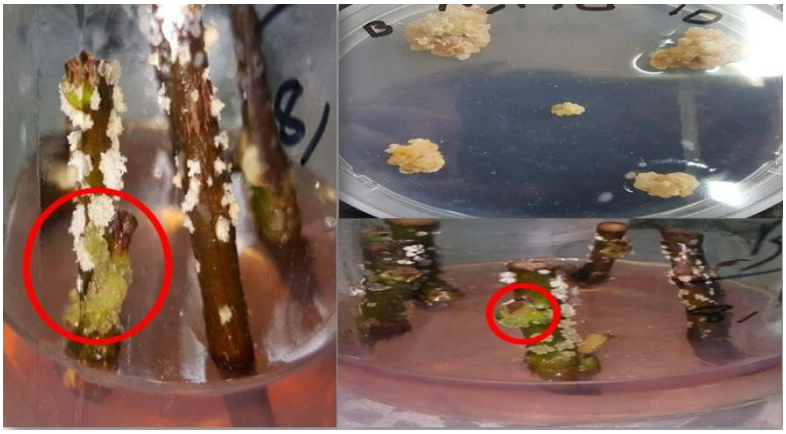
بعد از رشد کردن جوانه‌های روی ساقه از بخش‌های برگ، ساقه، دم برگ، مریستم و کالوس جوانه روی ساقه (شکل ۲) برای بررسی کالوس‌دهی ریزنمونه تهیه شد. این ریزنمونه‌ها در محیط کشت MS دارای ۳۰ گرم در لیتر ساکارز و ۷ گرم در لیتر آگار و غلظت‌های مختلف

تنظیم‌کننده رشد 2,4-D (۱، ۲ و ۴ میلی‌گرم در لیتر) و تنظیم‌کننده رشد BAP (۰/۱، ۰/۲و ۱ میلی‌گرم در لیتر) با ۵/۸pH کشت گردیدند. ریزنمونه‌ها پس از قرار گیری در محیط کشت ذکر شده برای القای کالوس‌زایی چهار هفته در تاریکی قرار داده شدند و سپس واکشت اول ریزنمونه‌ها صورت گرفت و بعد از گذشت چهار هفته واکشت دوم ریزنمونه‌ها انجام شد و در هر مرحله اندازه وزن تر و خشک کالوس‌ها اندازه گیری شدند و در کل مراحل کالوس‌ها در شرایط تاریکی و دمای ۲±۲۵ قرار گرفتند. این تحقیق به‌صورت یک آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کامل تصادفی با ۳ تکرار انجام شد و جهت تجزیه و تحلیل داده‌های حاصل از آزمایش از نرم افزار آماری Mstat-C و محیط Excel استفاده شد.



شکل ۱- قرار گرفتن ساقه‌ها در محیط کشت (الف)، جوانه زدن جوانه‌ها (ب)

Figure 1. We shoot in medium (A), germinating buds (B)



شکل۲- ایجاد کالوس در اطراف جوانه های روی ساقه

Figure 2. Create callus around the buds on the stems

نتایج و بحث

مطالعه حاضر به‌منظور گزینش بهترین ترکیب هورمونی جهت کالوس‌زایی انجام شد که در مجموع از ۶ ترکیب هورمونی مختلف استفاده شد. اولین واکنش ریزنمونه‌ها به تشکیل کالوس بعد از یک هفته مشاهده گردید.

اثر تنظیم‌کننده رشد 2,4-D بر کالوس‌دهی

نتایج تجزیه واریانس صفات مورد بررسی در واکشت اول و دوم به ترتیب در جدول ۱ و ۲ ارائه شده است. بر اساس نتایج بدست آمده، اختلاف معنی‌داری میان سطوح مختلف تنظیم‌کننده رشد نامبرده در سطح احتمال ۱ درصد برای تمامی صفات مورد بررسی در واکشت اول و دوم ملاحظه گردید. معنی‌دار شدن این عامل نشان از وجود پاسخ‌های متفاوت گیاه "بِه" به سطوح مختلف هورمون مذکور از لحاظ کالوس‌دهی می‌دهد. اثر ریزنمونه در سطح احتمال ۱

درصد معنی‌دار و نشان از وجود تفاوت در بین سطوح مختلف ریزنمونه‌ها برای همه صفات داد. اثرات متقابل تنظیم‌کننده رشد با ریزنمونه برای تمامی صفات معنی‌دار بود و این نشان می‌دهد که اثرات اصلی فارغ از سطوح مختلف عامل دیگر عمل نمی‌کند به‌عبارتی اثرات اصلی با تغییر سطوح عامل دیگر تحت تأثیر قرار می‌گیرد و پاسخ متفاوتی نشان می‌دهد.

با توجه به معنی‌دار شدن اثر متقابل تنظیم‌کننده رشد با ریزنمونه و اهمیت بالای آن نسبت به اثرات اصلی، از آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ۱ درصد جهت انجام مقایسه میانگین تیمارها استفاده شد و نتایج آن در جدول شماره ۳ (واکشت اول) و ۴ (واکشت دوم) ارائه گردید. طبق نتایج حاصله، در واکشت اول برای صفت اندازه کالوس تیمار ۴ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D با ریزنمونه کالوس جوانه بر روی ساقه نسبت به سایر ترکیبات تیمارها عکس‌العمل مطلوبی نشان داد و در گروه برتر آماری (a) قرار گرفت. تیمار یک میلی‌گرم در لیتر 2,4-D با کالوس جوانه روی ساقه برای این صفت با کم‌ترین کالوس‌دهی در ضعیف‌ترین گروه آماری قرار گرفت. تیمار ۱ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D با ریزنمونه کالوس جوانه روی ساقه برای صفت وزن تر بهترین کالوس‌دهی و تیمار ۴ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D با ریزنمونه دم‌برگ برای صفت مذکور نامناسب‌ترین پاسخ را نشان داد. در صفت وزن خشک تیمار ۱ میلی‌گرم در لیتر با ریز نمونه کالوس جوانه روی ساقه با بهترین عملکرد کالوس‌دهی داشت و تیمار ۲ میلی‌گرم بر لیتر 2,4-D با ریزنمونه برگ عکس‌العمل مطلوبی از خود نشان نداد. در واکشت دوم برای صفات اندازه کالوس و وزن تر کالوس، بهترین تولید کالوس در تیمار یک میلی‌گرم در لیتر 2,4-D با ریزنمونه کالوس جوانه روی ساقه و کم‌ترین کالوس‌زایی در تیمارهای چهار میلی‌گرم در لیتر 2,4-D با ریزنمونه برگ و ساقه مشاهده گردید. صفت وزن خشک در تیمار یک میلی‌گرم در لیتر 2,4-D با ریزنمونه ساقه پاسخ مطلوبی نشان داد.

به عبارت دیگر در واکشت اول برای تشکیل کالوس، محیط کشت پایه MS با غلظت ۴ میلی‌گرم در لیتر مطلوب بود؛ اما در واکشت بعدی در غلظت ۱ میلی‌گرم در لیتر کالوس‌ها پاسخ مناسبی نشان دادند. نکته قابل توجه این می‌باشد که در هر دو واکشت، ریزنمونه کالوس جوانه روی ساقه ثابت بوده است و تغییری در سطوح این عامل وجود نداشته است. روی و همکاران (Roy *et al.*, 2008) گزارش کردند که محیط کشت حاوی 2,4-D به‌تنهایی جهت تولید کالوس مؤثر نیست، نتایج آزمایش حاضر یافته‌های محققین یاد شده را تأیید نمی‌کند. مورینی و همکاران (Morini *et al.*, 2000) نیز برای کالوس‌زایی گیاه "بِه" از ریزنمونه برگ با غلظت‌های مختلف 2,4-D و طول دوره القای نورهای مختلف مورد آزمایش قرار دادند و اذعان نمودند با افزایش مقدار غلظت 2,4-D و افزایش دوره القا نوردهی کالوس‌دهی افزایش می‌یابد. این نتایج تا حدودی با نتایج حاصل از آزمایش حاضر مطابقت داشت.

جدول ۱- جدول تجزیه واریانس صفات مورد مطالعه برای واکشت اول 2,4-D

Table 1.Studied analysis of variance table for first subculture 2,4-D.

منابع تغییر S.O.V	درجه آزادی Df	اندازه کالوس Callus size	وزن تر Wet weight	وزن خشک Dry weight
2,4-D	2	0.057**	0.093**	0.005**
Explant	4	1.26**	2.67**	0.024**
2,4-D×Explant	8	0.047**	0.054**	0.006**
Error	30	0.003	0.001	0.0000085
Cv (%)		4.68	9.04	7.17

*، ** و ns: معنی‌دار در سطح احتمال ۵ و ۱ درصد و غیر معنی‌دار

.*, ** and ns: Significant at 5 percent, 1 percent and non- significant

جدول ۲- جدول تجزیه واریانس صفات مورد مطالعه برای واکشت دوم 2,4-D

Table 2. Studied analysis of variance table for second subculture 2,4-D

منابع تغییر S.O.V	درجه آزادی Df	اندازه کالوس Callus size	وزن تر Wet weight	وزن خشک Dry weight
2,4-D	2	3.08**	2.03**	0.194**
Explant	4	0.132**	0.26**	0.049**
2,4-D×Explant	8	0.162**	0.16**	0.061**
Error	30	0.014	0.001	0.0001
Cv(%)		8.39	8.90	14.80

*، ** و ns: معنی‌دار در سطح احتمال ۵ و ۱ درصد و غیرمعنی‌دار

.*, ** and ns: Significant at 5 percent, 1 percent and non- significant

جدول ۳- نتایج مقایسه میانگین ترکیبات تیمارها در واکشت اول 2,4-D

Table 3. Results of the average concentrations of 2,4-D in the first subculture 2,4-D

ردیف Row	ترکیبات تیمارها Treatment combinations	اندازه کالوس Callus size	وزن تر کالوس Wet weight	وزن خشک کالوس Dry weight
1	1 mg.l^{-1} 2,4-D + Shoot	0.950de	0.146d	0.070c
2	1 mg.l^{-1} 2,4-D + Leaf	0.950de	0.101defg	0.011gh
3	1 mg.l^{-1} 2,4-D + Leaf tail	0.750f	0.058efd	0.001i
4	1 mg.1^{-1} 2,4-D + Meristem	0.933de	0.156d	0.016fgh
5	1 mg.l^{-1} 2,4-D + Callus buds on stem	1.467c	1.633a	0.123b
6	2 mg.l^{-1} 2,4-D + Shoot	0.966d	0.045fg	0.019f
7	2 mg.l^{-1} 2,4-D + Leaf	0.950de	0.066efg	0.010h
8	2 mg.l^{-1} 2,4-D + Leaf tail	0.966d	0.129de	0.017fg
9	2 mg.l^{-1} 2,4-D + Meristem	0.816ef	0.054efg	0.010gh
10	2 mg.l^{-1} 2,4-D + Callus buds on stem	1.817b	1.026c	0.044d
11	4 mg.l^{-1} 2,4-D + Shoot	0.950de	0.105defg	0.015fgh
12	4 mg.l^{-1} 2,4-D + Leaf	1.000d	0.124def	0.011gh
13	4 mg.l^{-1} 2,4-D + Leaf tail	0.783f	0.040g	0.025e
14	4 mg.l^{-1} 2,4-D + Meristem	0.950de	0.059efg	0.011gh
15	4 mg.l^{-1} 2,4-D + Callus buds on stem	1.950a	1.265b	0.226a

اعداد دارای حروف مشترک، تفاوت معنی‌داری بر اساس آزمون چند دامنه‌ای دانکن ندارند.

Numbers with same letter do not significant difference base Duncan multiple range test

جدول ۴- نتایج مقایسه میانگین ترکیبات تیمارها در واکشت دوم 2,4-D

Table 4. Results of the average concentrations of 2,4-D in the second subculture 2,4-D

ردیف Row	ترکیبات تیمارها Treatment combinations	اندازه کالوس Callus size	وزن تر کالوس Wet weight	وزن خشک کالوس Dry weight
1	1 mg.l^{-1} 2,4-D + Shoot	2.000ab	0.766b	0.563a
2	1 mg.l^{-1} 2,4-D + Leaf	1.800bc	0.606c	0.353b
3	1 mg.l^{-1} 2,4-D + Leaf tail	1.617c	0.369de	0.010e
4	1 mg.l^{-1} 2,4-D + Meristem	1.833bc	0.768b	0.060d
5	1 mg.l^{-1} 2,4-D + Callus buds on stem	2.133a	1.438a	0.105c
6	2 mg.l^{-1} 2,4-D + Shoot	1.100de	0.157fg	0.012e
7	2 mg.l^{-1} 2,4-D + Leaf	1.267de	0.166f	0.015e
8	2 mg.l^{-1} 2,4-D + Leaf tail	1.333d	0.306e	0.026e
9	2 mg.l^{-1} 2,4-D + Meristem	1.030e	0.090fgh	0.013e
10	2 mg.l^{-1} 2,4-D + Callus buds on stem	1.100de	0.113fg	0.005e
11	4 mg.l^{-1} 2,4-D + Shoot	0.700f	0.025h	0.005e
12	4 mg.l^{-1} 2,4-D + Leaf	1.168de	0.084gh	0.009e
13	4 mg.l^{-1} 2,4-D + Leaf tail	0.700f	0.024h	0.005e
14	4 mg.l^{-1} 2,4-D + Meristem	1.267de	0.110fg	0.010e
15	4 mg.l^{-1} 2,4-D + Callus buds on stem	1.333d	0.437d	0.116c

اعداد دارای حروف مشترک، تفاوت معنی‌داری بر اساس آزمون چند دامنه‌ای دانکن ندارند.

Numbers with same letter do not significant difference base Duncan multiple range test.

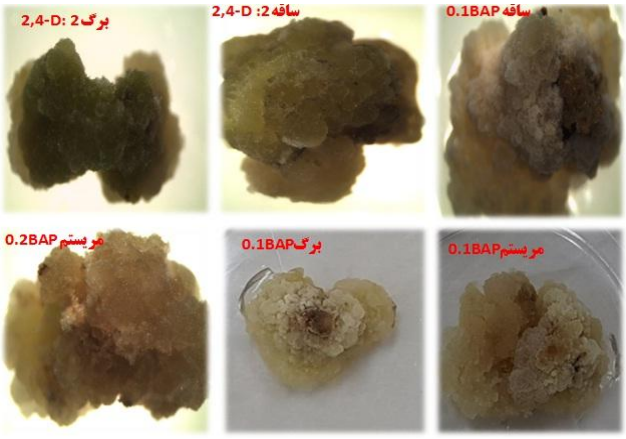
اثر تنظیم‌کننده رشد BAP بر کالوس‌دهی

نتایج حاصل از انجام تجزیه واریانس نشان داد که اختلاف معنی‌داری ($P<0.001$) در عامل BAP برای صفات اندازه و وزن تر کالوس در واکشت اول وجود دارد به بیان دیگر با تغییر سطوح اثر BAP صفات ذکر شده پاسخ‌های مختلفی بروز می‌دهند. صفت وزن خشک کالوس به تغییرات سطح BAP واکنشی نشان نداد و در تمامی سطوح پاسخ یکسانی داشت (جدول ۵). اثر این هورمون در واکشت دوم برای تمامی صفات اختلاف معنی‌داری را نشان داد. عامل ریزنمونه در هر دو واکشت برای همه صفات مورد مطالعه (اندازه کالوس، وزن تر کالوس، وزن خشک کالوس) معنی‌دار شد و نشان داد که سطوح مختلف ریزنمونه، تولید کالوس را تحت تأثیر قرار می‌دهد. اثر متقابل تنظیم‌کننده رشد و ریزنمونه برای تمامی صفات مورد بررسی در هر دو واکشت اختلاف معنی‌داری را در سطح احتمال ۱ درصد نشان داد (جدول ۵ و ۶).

نتایج مقایسه میانگین (جدول ۷ و ۸) حاکی از آن بود که تیمار یک میلی‌گرم در لیتر BAP با ریزنمونه کالوس جوانه روی ساقه برای واکشت اول در تمامی صفات مورد مطالعه در بیشترین حجم تولید کالوس خود بوده و به‌تنهایی در گروه آماری (a) قرار گرفت. با توجه به این‌که سه صفت اندازه کالوس، وزن تر کالوس و وزن خشک از لحاظ بهترین ترکیب پاسخ مشابهی داشتند، اما از لحاظ نامناسب ترین ترکیبات تیماری مشابه نبودند و هر یک از صفات در تیمارهای مختلفی پاسخ‌های نامناسبی نشان داد (جدول ۷). نتایج مقایسه میانگین واکشت دوم برای صفات اندازه کالوس و وزن تر کالوس تیمار ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر BAP با ریزنمونه مریستم را به‌عنوان بهترین ترکیب تیماری معرفی نمود، برای صفت وزن خشک تغییری در غلظت هورمون وجود نداشت و تنها عامل ریزنمونه باعث ایجاد تغییر در مقایسه با مناسب‌ترین ترکیب هورمونی دو صفت اندازه کالوس و وزن تر کالوس با بهترین ترکیب تیماری وزن خشک کالوس شد به عبارتی در ترکیب ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر BAP با ریزنمونه کالوس جوانه روی ساقه برای صفت مذکور مطلوب‌ترین نتیجه حاصل گردید (جدول ۸). نتایج مقایسه میانگین با آزمون چند دامنه‌ای دانکن حاکی از این موضوع است که کالوس‌زایی تنها تحت تأثیر تیمارهای هورمونی نمی‌باشد بلکه عامل ریزنمونه نیز در تشکیل کالوس دخالت دارد.

نتیجه‌گیری کلی

این تحقیق به ما نشان داد که غلظت‌های مختلف هورمون‌های رشدی بر تولید کالوس در محیط کشت پایه MS تأثیر به‌سزایی دارد و پاسخ ریزنمونه‌های مختلف به ترکیبات هورمونی متفاوت است. به‌طور کلی در تنظیم‌کننده‌های رشد BAP و 2,4-D بهترین کالوس‌دهی در واکشت اول و دوم متعلق به ریزنمونه کالوس جوانه روی ساقه چوبی بود و بدترین کالوس‌دهی در واکشت اول و دوم مربوط به ریزنمونه دم‌برگ بود. نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که جهت کالوس‌زایی از ریزنمونه‌های مختلف گیاه "بِه"، وجود تنظیم کننده‌های رشد ضروری است. در این رابطه توسط سایر محققان در دیگر گونه‌های گیاهی نتایج مشابهی ثبت گردیده است (Ahmad *et al*., 2011; Jayasree *et al*., 2001; Yasmin *et al*., 2003; Abd Elaleem *et al*., 2009). تغییر مقدار ترکیبات تنظیم کننده‌های رشد BAP و 2,4-D، تفاوت چشم‌گیری در روند کالوس‌زایی اعمال می‌کند که مطالعات متعددی در این رابطه وجود دارد که تأیید کننده نتایج آزمایش حاضر است (Sujatha *et al*., 2007; Basalma *et al*., 2008). پس از بررسی‌های آماری نتایج نشان داد که تمام ترکیبات هورمونی در این تحقیق کالوس‌زایی را در ریزنمونه‌های مختلف به‌همراه داشته است (شکل ۳).



شکل ۳- استفاده از ریزنمونه ها و غلظت های مختلف هورمون 2,4-D و BAP

Figure 3. Used explants and different concentrations 2,4-D and BAP

جدول ۵- جدول تجزیه واریانس صفات مورد مطالعه برای واکشت اول BAP

Table 5. Studied analysis of variance table for first subculture BAP

منابع تغییر S.O.V	درجه آزادی Df	اندازه کالوس Callus size	وزن تر Wet weight	وزن خشک Dry weight
BAP	2	0.125**	0.17**	0.00003ns
Explant	4	3.68**	3.28**	0.01**
BAP×Explant	8	0.39**	0.29**	0.001**
Error	30	0.005	0.002	0.00003
Cv (%)		5.59	8.075	14.76

*، ** و ns: معنی‌دار در سطح احتمال ۵ و ۱ درصد و غیر معنی‌دار

*, ** and ns: Significant at 5 percent, 1 percent and non- significant.

جدول ۶- جدول تجزیه واریانس صفات مورد مطالعه برای واکشت دوم BAP

Table 6. Studied analysis of variance table for second subculture BAP

منابع تغییر S.O.V	درجه آزادی Df	اندازه کالوس Callus size	وزن تر Wet weight	وزن خشک Dry weight
BAP	2	4.45**	2.34**	0.23**
Explant	4	2.12**	4.93**	0.20**
BAP×Explant	8	0.74**	0.84**	0.10**
Error	30	0.018	0.003	0.0001
Cv (%)		8.87	6.40	11.82

*، ** و ns: معنی‌دار در سطح احتمال ۵ و ۱ درصد و غیر معنی‌دار

*, ** and ns: Significant at 5 percent, 1 percent and non- significant.

جدول ۷- نتایج مقایسه میانگین ترکیبات تیمارها در واکشت اول BAP

Table 7. Results of the average concentrations of BAP in the first subculture BAP

ردیف Row	ترکیبات تیمارها Treatment combinations	اندازه کالوس Callus size	وزن تر کالوس Wet weight	وزن خشک کالوس Dry weight
1	1 mg.l^{-1} BAP + Shoot	0.493g	0.092f	0.017g
2	1 mg.l^{-1} BAP + Leaf	1.017e	0.064f	0.002h
3	1 mg.l^{-1} BAP + Leaf tail	0.476g	0.883d	0.030ef
4	1 mg.l^{-1} 2BAP + Meristem	0.993e	0.080f	0.007gh
5	1 mg.l^{-1} BAP + Callus buds on stem	2.750a	2.040a	0.125a
6	0.1 mg.l^{-1} BAP + Shoot	1.417d	0.320e	0.045d
7	0.1 mg.l^{-1} BAP + Leaf	0.996e	0.334e	0.031e
8	0.1 mg.l^{-1} BAP + Leaf tail	0.963e	0.107f	0.018fg
9	0.1 mg.l^{-1} BAP + Meristem	1.400d	0.409e	0.040de
10	0.1 mg.l^{-1} BAP + Callus buds on stem	1.867c	1.217c	0.064c
11	0.2 mg.l^{-1} BAP + Shoot	0.783f	0.102f	0.014gh
12	0.2 mg.l^{-1} BAP + Leaf	1.033e	0.107f	0.016g
13	0.2 mg.l^{-1} BAP + Leaf tail	0.550g	0.083f	0.015g
14	0.2 mg.l^{-1} BAP + Meristem	1.517d	0.323e	0.038de
15	0.2 mg.l^{-1} BAP + Callus buds on stem	2.300b	1.489b	0.104b

اعداد دارای حروف مشترک، تفاوت معنی‌داری بر اساس آزمون چند دامنه‌ای دانکن ندارند.

Numbers with same letter do not significant difference base Duncan multiple range test

جدول ۸- نتایج مقایسه میانگین ترکیبات تیمارها در واکشت دوم BAP

Table 8. Results of the average concentrations of BAP in the second subculture BAP

ردیف Row	ترکیبات تیمارها Treatment combinations	اندازه کالوس Callus size	وزن تر کالوس Wet weight	وزن خشک کالوس Dry weight
1	1 mg.l^{-1} BAP + Shoot	0.75fg	0.023i	0.003h
2	1 mg.l^{-1} BAP + Leaf	0.950ef	0.080hi	0.037ef
3	1 mg.l^{-1} BAP + Leaf tail	0.566g	0.046i	0.005gh
4	1 mg.l^{-1} 2BAP + Meristem	0.516g	0.010i	0.002h
5	1 mg.l^{-1} BAP + Callus buds on stem	2.550b	2.158b	0.118c
6	0.1 mg.l^{-1} BAP + Shoot	1.600d	0.509g	0.069d
7	0.1 mg.l^{-1} BAP + Leaf	1.917c	0.649f	0.063d
8	0.1 mg.l^{-1} BAP + Leaf tail	1.750cd	0.515g	0.052de
9	0.1 mg.l^{-1} BAP + Meristem	3.000a	2.515a	0.199b
10	0.1 mg.l^{-1} BAP + Callus buds on stem	2.317b	1.930c	0.913a
11	0.2 mg.l^{-1} BAP + Shoot	1.217e	0.207h	0.029efg
12	0.2 mg.l^{-1} BAP + Leaf	1.170e	0.206h	0.023fgh
13	0.2 mg.l^{-1} BAP + Leaf tail	0.833fg	0.123hi	0.012gh
14	0.2 mg.l^{-1} BAP + Meristem	1.533d	1.305e	0.067d
15	0.2 mg.l^{-1} BAP + Callus buds on stem	1.933c	1.450d	0.113c

اعداد دارای حروف مشترک، تفاوت معنی‌داری بر اساس آزمون چند دامنه‌ای دانکن ندارند.

Numbers with same letter do not significant difference base Duncan multiple range test

References فهرست منابع

Abd Elaleem KG., RS. Modawi., and MM. Khalafalla. 2009. Effect of plant growth regulators on callus induction and plant regeneration in tuber segment culture of potato (*Solanum tuberosum* L.) cultivar Diamant. African J. Biotech. 8 (11): 2529-2534.

Ablat Abliz, Q. E. (2014). Effect of *Cydonia oblonga* Mill. leaf extract on serum lipid and liver function in a rat model of hyperlipidaemia. *Journal of Ethnopharmacology* , 970-974.

Ahmad N., H. Fazal., and R. Zamir. 2011. Callogenesis and shoot organogenesis from flowers of *Stevia rebaudiana* (Bert.). Sugar Tech. 13(2): 174-177

Arulselvi, I. P., and S. Krishnaveni. 2009. Effect of hormones, explants and genotypes in in vitro culturing of sorghum. Journal of Biochemical Technology. 1(4):96-103

Asghari, Gh. S. Emami., M. Hojati., A. Shakori., Z. Veliyan., and M. Asghari. 2013. Evaluation of the production of artemisinin in the plant, callus culture and cell suspension culture *Artemisia aucheri*. Journal of cell and culture. 4(3): 243-250

Basalma D., S. Uranbey., S. Mirici., and O. Kolsarici. 2008. TDZ×IBA induced shoot regeneration from cotyledonary leaves and *in vitro* multiplication in safflower (*Carthamus tinctorius* L.). African J. Biotech. 7(8): 960-966.

D' Onofrio, C., and S. Morini. 2006. Somatic embryo, adventitious root and shoot regeneration in in vitro grown quince leaves as influenced by treatments of different length with growth regulators. Scientia Horticulturae 107 (2006) 194–199

Elzira Abdusalam, W. Z. 2014. Effect of *Cydonia oblonga* Mill. fruit and leaf extracts on blood pressure and blood rheology in renal hypertensive rats. *Journal of Ethnopharmacology* , 464-469.

Fisichella, M., E. Silvi., and S. Morini. 2000. Regeneration of somatic embryos and roots from quince leaves cultured on media with different macro element composition. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 63:101-107.

Jayasree T., U. Pavan., M. Ramesh., and AV. Rao AV. 2001. Somatic embryogenesis from leaf culture of potato. Plant Cell Tiss Organ Cult. 64: 13-17.

Khoram Del, M., H. Abdollahii., A. ghasemi., and Sh. Haj Mansoor. 2010. Transfer of SSR markers apple to genotypes quince (*Cydonia oblonga* Mill.). Seed and Plant journal 26(4):451-467

Khosravi Nezhad, F., H. Abdollahi., B. Kashefi., M. Hassani., and Z. Salehi. 2016. Evaluation of vitro micropropagation of some of the variety quince (Cydonia oblonga Mill.). Journal of Horticultural Science. (1) 135-144.

Lim, T. K. 2012. *Cydonia oblonga*. Pp 371-379. In: Edible medicinal and nonmedicinal plants. Vol 4, Fruits. Springer Science.

M. Minaiyan, A. G. 2012. A study of the effects of *Cydonia oblonga* Miller (Quince) on TNBS-induced ulcerative colitis in rats .*Research in Pharmaceutical Sciences* .7(2).103-110.

Mohammadi-Nasab, A., A. Motallebi-Azar., A. Movafeghi., and M. Dadpour. 2011. Callus induction and embryogenesis of Alfalfa (*Medicago sativa* L.) using hypocotyl Thin Cell Layer culture. Russian Agricultural Sciences. 37(4): 303-306.

Morini, S., C. D'Onofrio., G. Bellocchi., and M. Fisichella. 2000. Effect of 2,4-D and light quality on callus production and differentiation from in vitro cultured quince leaves. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 63:47-55.

Nikoofar, E., M. Hojjatoleslami., and M.A Shariaty. 2013. Surveying the effect of quince seed mucilage as a fat replacer on texture and physicochemical propertiesof semi fat set yoghurt. International Journal of Farming and Allied Sciences. 2(20):861-865

Postman, J. 2009 *Cydonia oblonga:* The unappreciated quince. 28th International Horticulture Conference in Lisboa, Portugal. (Available at: http:// www.ars.usda.gov/pwa/corvallis/ncgr).

Roy A., S. Ghosh., M. Chaudhuri., and PK. Saha. 2008. Effect of different plant hormones on callus induction in *Gymnema sylvestris* R.BR. (Asclepiadaceae). African J. Biotech. 7(13) 2209-2211.

Sabeti, H. 1996 Iranian Forests, Trees and Shrubs. Publications of Agricultural and Natural Resources Organization, Tehran, Iran. 810 pp.

Safar Nezhad, A., L. Alamdari., H. Doroodi., and M. Delbar. 2016. The effect of growth regulators (IBA and BAP) on regeneration, proliferation and rooting of pear Natanz culture in vitro. Journal of Plant Biology. 8(29): 77-90.

Salehiyan Aghbal, H., N.A Babaiean Jelodar., Gh.A Ranjbar., and N.A Bagheri. 2012. The effect of growth regulators on callus and regenerated several varieties of plant breeding rice. Modified Crops Research 10 (4) 93-80.

Sujatha M., and V. Dinesh Kumar. 2007. *In vitro* bud regeneration of *Carthamus tinctorius* and wild *Carthamus* species from leaf explants and axillary bud. Biologia Plantarum. 51(4): 782-786.

Wen-ting Zhou, A. P. 2014. Effect of *Cydonia oblonga* Mill. leaf extracts or captopril on blood pressure and related biomarkers in renal hypertensive rats. *Journal ofEthnopharmacology* , 28;152(3):464-9

Yasmin S., KM. Nasiruddin., R. Begum., and SK. Talukder. 2003. Regeneration and establishment of potato plantlets through callus formation with BAP and NAA. Asian J. Plant Sci. 2(12): 936-940.

Effect of growth regulators on callus induction in Quince (*Cydonia oblonga* Mill.)

E. Faezi[1], M. Omidi[2*], P. Abdollahii[3]

Received date: 14 April 2017
Accepted date: 05 June 2017

Abstract

The quince plant is known as a medicinal plant. *In vitro* and induction of callus from different species of this plant are important and sensitive stages. In the present study, the ability of callusing and direct regeneration in callus medium in explants and various growth regulators were evaluated. From different parts of leaf, stems, meristem, leaf tail and callus were prepared Callus buds on the stem quince. For making callus formation used the MS medium containing three levels of 1, 2 and 4 mg.L^{-1} of 2,4-D hormone and 0.1, 0.2 and 1 mg.L^{-1} BAP hormone, each of growth regulators was studied as a factorial experiment in a completely randomized design with three replications on MS medium. Based on the results of analysis of variance in all subcultures, the main effects and interactions were significant for all studied traits, except for the main effect of BAP in the first subculture for dry weight trait. The mean comparison results for the first subculture of 2-4-D were calculated for the size of the callus size of 4 mg.L^{-1} 2,4-D treatment with the explant of callus buds on the stem (19.5 mm) for the fresh weight gain of the callus treatment 1 mg.L^{-1} 2 , 4-D with callus buds on stem and for the dry weight trait treatment of 1 mg.L^{-1} with callus buds on the stem was introduced as the most suitable treatments. In the second subculture, for callous size and fresh callus weights, the best callus production was observed in treatment of 1 mg.L^{-1} 2,4-D with the callus buds on the stem. The dry weight trait showed a favorable response to treatment with 1 mg.L^{-1} 2,4-D with stem explant. The mean comparison results for BAP growth regulator showed that the treatment of 1 mg.L^{-1} BAP with callus buds on stem was similar for all three traits. In the second subculture, the traits of the size and weight of the callus were best responded in the treatment with 0.1 mg.L^{-1} BAP with Meristem explant. The only difference was dry weight with the two traits mentioned in the explant (callus bud on the stem).

Keysword: Quince, Growth regulators, Meristem, Medicinal plant.

1- M. Sc. student, College of Agricultural, Tehran Science and Research branch, Islamic Azad University.
2- Professor, College of Agricultural and Natural Resource, University of Tehran, Karaj, Iran
3- Assistant Professor, Tehran Science and Research branch, Islamic Azad University
* Corresponding author: momidi@ut.ac.ir