

Optimization of Direct Regeneration Method in *Ziziphus jujuba* Mill

ARTICLE INFO

Article Type

Original Research

Authors

Hashemzadeh Z.¹ MSc,
Jafarkhani Kermani M.^{*2} PhD
Hamidoghli Y.¹ PhD

How to cite this article

Hashemzadeh Z, Jafarkhani Kermani M, Hamidoghli Y. Optimization of Direct Regeneration Method in *Ziziphus jujuba* Mill. Modares Journal of Biotechnology. 2018 ;9(4):495-500.

¹Horticulture Department, Agriculture Faculty, Guilan University, Guilan, Iran

²Tissue & Cell Culture Department, Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran (ABRII), Agricultural Research, Education & Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran

*Correspondence

Address: Tissue & Cell Culture Department, Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran (ABRII), Agricultural Research, Education & Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran
Phone: +98 (26) 32703536
Fax: +98 (21) 32704539
m.j.kermani@abrii.ac.ir

Article History

Received: July 23, 2016

Accepted: February 21, 2018

ePublished: December 21, 2018

ABSTRACT

Aims The mass propagation and breeding new varieties of *Ziziphus jujuba* Mill as a valuable fruit tree and herb, which is well adapted to dry and semi-arid climate, is very important. The aim of the present research was to optimize direct regeneration method in *Ziziphus jujuba* Mill. **Materials & Methods** In this experimental study, the explants consisted of leaf cut into 3 parts, leaf cut from 4 sides, and full leaf of *in vitro* and compared in Murashige and Skoog and woody plant media with different concentrations of Thidiazuron (TDZ; 0, 5, 10, 15, and 20 μ M) and Naphthalene acetic acid (NAA, 0 and 1 μ M). The effect of 2 and 4 weeks of darkness on regeneration rate was investigated. The experiments were conducted in factorial based on a completely randomized design. The mean of statistical data was compared using Duncan's multiple range test. SAS 9.3.1 software was used and the difference was considered significant at 1% probability level.

Findings The 2 weeks of darkness treatment with the mean of 1.38 was better than the 4 weeks of darkness treatment. The Maximum number of shoots (2.27) was obtained in leaf cut into 3 parts. The maximum percent of regeneration (75.0%) and highest number of regenerated shoots (4.83) were obtained in the MS medium containing 10 μ M TDZ and 1 μ M NAA.

Conclusion Regeneration rates in *Ziziphus jujuba* Mill is affected by the type of explant, culture media and plant growth regulators. Maximum rate of regeneration is observed in leaf cut into 3 parts and cultured on MS medium containing 1 μ M NAA and 10 μ M TDZ. Plantlets are rooted and successfully acclimatized at "*in vivo*" conditions.

Keywords Regeneration; Leaf ; Growth Regulator; *Ziziphus jujube*; Tissue Culture

CITATION LINKS

[1] Macropropagation and micropropagation of *Ziziphus spina-christi* [2] *Ziziphus jujube* the neglected fruit [3] *Ziziphus mauritiana* Lam, culture and use in Kapsiki (North Cameroon) [4] Rapid *in vitro* Multiplication and *ex vitro* Rooting of *Zizyphus mauritiana* [5] *In vitro* culture of leaves and plantlet regeneration of *Ziziphus jujube* [6] *In vitro* clonal propagation of a multipurpose tree, *Ziziphus spina-christi* (L.) desf [7] *In vitro* shoot multiplication of *Ziziphus spina-christi* by shoot tip culture [8] Clonal propagation of *Ziziphus spina-christi* by shoot tip culture: I. improved inorganic and organic media constituents for *in vitro* shoot multiplication [9] Factors influencing efficiency of shoot regeneration in *Ziziphus jujuba* Mill. 'Huizao' [10] Anatomical observations of adventitious bud regeneration from leaf explants of *Ziziphus jujube* Mill. 'Huizao' [11] Efficiency of direct and indirect shoot organogenesis in different genotypes of *Rosa hybrida* [12] Transformation of roses with genes for antifungal proteins to reduce their susceptibility to fungal diseases [13] Isolation and characterization of four somatic embryogenesis receptor-like kinase (RhSERK) genes from miniature potted rose (*Rosa hybrida* cv. Linda) [14] Enhancement of *in vitro* organogenic capacity of rose by preculture of donor shoots on the medium with thidiazuron [15] Adventitious shoot formation on excised leaves of *in vitro* grown shoots of apple cultivars [16] Adventitious shoot regeneration from leaf tissue of three pear (*Pyrus* sp.) cultivars *in vitro* [17] Thidiazuron stimulation of apple shoot proliferation *in vitro* [18] Micropropagation of white flowering eastern redbud (*Cercis canadensis* var. *alba* L.) [19] An efficient adventitious shoot regeneration system for Zhanhua winter jujube (*Zizyphus jujuba* Mill.) using leaf explants [20] High-frequency plant regeneration through adventitious shoot formation in castor (*Ricinus communis* L.) [21] Shoot regeneration from petunia leaf discs as a function of explants size, configuration and benzyladenine exposure

بهینه‌سازی روش بازرایی مستقیم در عنب

زهرا هاشم‌زاده MSc

گروه باغبانی، دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه گیلان، گیلان، ایران

مریم جعفرخانی‌کرمانی PhD

بخش کشت بافت و سلول پژوهشگاه بیوتکنولوژی کشاورزی ایران، سازمان تحقیقات آموزش و ترویج وزارت جهاد کشاورزی، کرج، ایران

یوسف حمیدآقایی PhD

گروه باغبانی، دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه گیلان، گیلان، ایران

چکیده

اهداف: تولید انبوه و به‌نژادی عنب (*Ziziphus jujuba* Mill) به‌عنوان یک درخت میوه و گیاه دارویی با ارزش و سازگار با مناطق خشک و نیمه‌خشک اهمیت خاصی دارد. هدف پژوهش حاضر بهینه‌سازی روش بازرایی مستقیم در عنب بود.

مواد و روش‌ها: در پژوهش تجربی حاضر ریزنمونه‌ها شامل برگ برش‌خورده به سه قسمت، برگ برش‌خورده از چهارطرف و برگ کامل از گیاهان درون شیشه بودند و در محیط‌های کشت موراشیگ و اسکوگ (MS)، اختصاصی گیاهان چوبی (WPM) با غلظت‌های متفاوت تیدپازرون (TDZ: صفر، ۵، ۱۰، ۱۵ و ۲۰ میکرومولار) و نفتالین‌استیک‌اسید (NAA: صفر و یک میکرومولار) مقایسه شدند. تاثیر تیمارهای ۲ و ۴ هفته تاریکی بر میزان بازرایی بررسی شد. آزمایش‌ها به‌صورت فاکتوریل و در قالب طرح کاملاً تصادفی صورت گرفت. میانگین داده‌های آماری با استفاده از آزمون چنددامنه‌ای دانکن مقایسه شد. نرم‌افزار SAS 9.3.1 به کار رفت و تفاوت در سطح احتمال ۱٪ معنی‌دار در نظر گرفته شد.

یافته‌ها: تیمار دو هفته تاریکی با میانگین ۱/۳۸ مناسب‌تر از ۴ هفته بود. بیشترین میزان بازرایی (۲/۲۷) در ریزنمونه برگ برش‌خورده به سه قسمت حاصل شد. بیشترین درصد بازرایی (۷۵/۰٪) و بیشترین تعداد شوت‌های باززاده (۴/۸۳) در تیمار محیط کشت MS شامل تنظیم‌کننده‌های رشد یک میکرومولار NAA و ۱۰ میکرومولار TDZ حاصل شد.

نتیجه‌گیری: میزان بازرایی عنب تحت تاثیر نوع ریزنمونه، محیط کشت و تنظیم‌کننده‌های رشد گیاه است. حداکثر بازرایی در برگ برش‌خورده به سه قسمت و در محیط MS حاوی یک میکرومولار NAA و ۱۰ میکرومولار TDZ حاصل می‌شود. گیاهچه‌های حاصله ریشه‌دار و با موفقیت در محیط "برون‌شیشه" سازگار می‌شوند.

کلیدواژه‌ها: بازرایی، برگ، تنظیم‌کننده رشد، عنب، کشت بافت

تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۰۵/۰۲

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۱۲/۰۲

*نویسنده مسئول: m.j.kermani@abrii.ac.ir

مقدمه

شرایط خشک و سخت حاکم بر بیشتر زیست‌بوم‌های ایران و محدودبودن گونه‌های بومی و سازگار در این مناطق، اهمیت و ارزش گیاهان قانع، مقاوم و پرباروت را بیشتر نمایان می‌سازد. گونه‌های گیاهی خانواده عنب (رامناسه) و جنس گُنا (زیزیفوس) از زمره همین گیاهان هستند^[1].

عنب (*Ziziphus jujuba* Mill) در چین نقش مهمی به‌عنوان یک درخت میوه دارد و میوه‌های طعم‌دار و بسیار بزرگی تولید می‌کند که خرماي چینی نام دارند. در اواخر دهه ۱۹۵۰ عنب به‌عنوان یکی از کهن‌ترین محصولات درختی میوه طبقه‌بندی شد^[2]. عنب از درختان مقاومی است که قابلیت رشد و تولید در زمین‌های کم‌آب و شور را دارد، توجه بیشتر به آن ضمن بالابردن ظرفیت تولید محصولات کشاورزی، در حفاظت از خاک نیز موثر است. تطابق و سازگاری این محصول با محیط و علاقه زیاد مردم به این گیاه موجب شده اغلب باغ‌های احداثی در استان خراسان جنوبی در سال‌های اخیر به این محصول اختصاص داده شود و این عوامل موجب اهمیت اقتصادی- اجتماعی آن شده است، همچنین عنب

به‌دلیل تنوع فراوان یکی از ذخایر توارثی گیاهی ارزشمند ایران محسوب می‌شود و به‌دلیل سازگاری بالای آن به شرایط سخت محیطی به‌ویژه در مناطق کوهستانی به‌عنوان یکی از اجزای پوشش سبز طبیعی، نقش مهمی در تعدیل آب و هوای منطقه، جلوگیری از فرسایش خاک و ایجاد روان‌آب سطحی دارد. این عوامل موجب اهمیت زیست‌محیطی این گیاه نیز شده است^[3].

درخت عنب در ایجاد و توسعه فضای سبز و باغ‌ها در شرایط محیطی متفاوت با کاربرد چندمنظوره کاشته می‌شود. علاوه بر سرسبزی و شاخ و برگ زیبای درخت، چوب آن نیز به‌دلیل داشتن نقش زیبا و صیقل‌پذیربودن در صنایع چوب کاربرد دارد^[2]. عنب به‌عنوان یک گیاه دارویی ارزشمند در طب سنتی جایگاه ویژه‌ای دارد و از اندام‌های مختلف آن مانند میوه، بذر، برگ، پوست و ریشه در صنایع غذایی و دارویی به‌صورت تازه و خشک استفاده می‌شود. میوه آن به‌عنوان تصفیه‌کننده خون، آرام‌کننده اعصاب، مقوی معده، ملین، ضدسرفه و مدر به کار می‌رود^[2]. خانواده عنب متشکل از ۴۹ جنس و در حدود ۹۰۰ گونه است. تعداد کروموزوم‌های هاپلوئید در جنس گُنا ۱۲ عدد ($2n=2x=24$) است. در ایران ۵ جنس و ۱۱ گونه آن در مناطق خلیجی عمان، زاگرس و خزری می‌رویند. گونه عنب بومی آسیای جنوب شرقی، آسیای میانه و قفقاز است و در حقیقت درختی است که تقریباً در نواحی از دنیا که با کمبود آب و شرایط خاکی نامناسب همراه باشد، رشد می‌کند. پراکنش عنب در ایران به‌طور عمده در استان‌های خراسان (مشهد، کلات نادری، قائن، بیرجند، دره‌گز و دشت بیاض)، گلستان (گرگان کاشته شده، کلاله خودرو)، مازندران (ساری و بهشهر کاشته شده، دهنه لاریم خودرو)، گیلان (رشت کاشته شده)، فارس (شیراز کاشته شده، نودان خودرو)، اصفهان، مرکزی، یزد، لرستان، کرمان، همدان و تهران است^[2].

در سال‌های اخیر فنون کشت بافت گیاهی به یک ابزار قدرتمند برای تکثیر بسیاری از گونه‌های گیاهی تبدیل شده است. تولید انبوه گیاهان با ساختار ژنتیکی یکسان و عاری از بیماری از مزایای مهم کشت بافت در گیاهان محسوب می‌شود، اما مهم‌ترین مزیت آن کاربرد در برنامه‌های به‌نژادی است. در مورد کشت بافت، ریز ازدیادی عنب و گونه‌های نزدیک به آن تحقیقات نسبتاً محدودی در ایران و جهان انجام شده است^[4,5].

از تحقیقات مشابه می‌توان به گزارش‌هایی اشاره کرد که روی تکثیر درون‌شیشه‌ای درختان گُنا انجام شده است^[6-8]. فنگ و همکاران^[9] در بررسی فاکتورهای موثر بر بازرایی عنب رقم Huizao (یک رقم عنب چینی) نشان دادند که در بازرایی این گیاه ترکیب تیدپازرون (TDZ) و نفتالین‌استیک‌اسید (NAA) همراه با ۲/۹۴ میکرومولار نیتترات‌نقره لازم است. هدف پژوهش حاضر بررسی اثر نوع ریزنمونه، محیط کشت و مدت‌زمان تاریکی در القای بازرایی مستقیم از برگ گیاه عنب در شرایط "در شیشه" بود.

مواد و روش‌ها

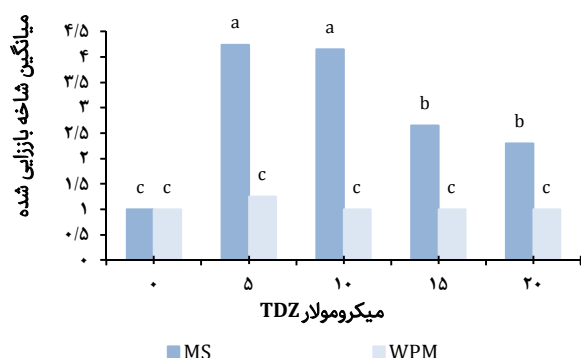
مطالعه تجربی حاضر در آزمایشگاه کشت بافت و سلول پژوهشگاه بیوتکنولوژی کشاورزی کرج طی ۱۸ ماه انجام شد. ریزنمونه‌های برگ از سرشاخه‌های جوان باغات بیرجند جمع‌آوری شدند و پس از گذران مراحل گندزدایی در تیمارهای زیر (همگی دارای ۳٪ ساکارز و ۵٪ آگار) کشت و به فیتوترون با ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی منتقل شدند.

بررسی اثر محیط کشت پایه و غلظت‌های مختلف تنظیم‌کننده‌های

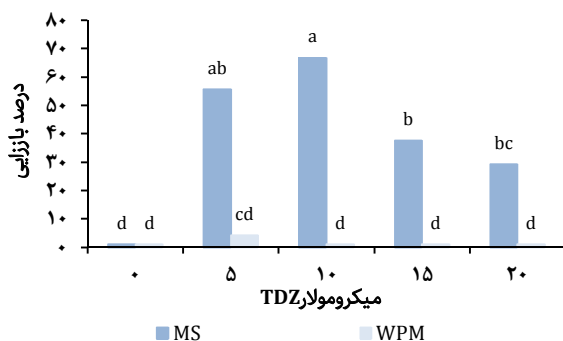
بهترین تولید شاخساره در محیط MS با ترکیب ۵ و ۱۰ میکرومولار TDZ با میانگین‌های ۴/۲ و ۴/۱۵ حاصل شدند. در حالی که بیشترین درصد بازاریابی ۶۶/۶۷٪ در محیط MS دارای ۱۰ میکرومولار TDZ به دست آمد. محیط MS ترکیب شده با ۵ میکرومولار TDZ با ۵۵/۵۶٪ بازاریابی در رتبه بعدی قرار گرفت (نمودارهای ۱ و ۲).

محیط‌های کشت حاوی غلظت‌های ۱۰ و ۵ میکرومولار تنظیم‌کننده رشد TDZ بهترین نتیجه را حاصل کردند (نمودارهای ۱ و ۲).

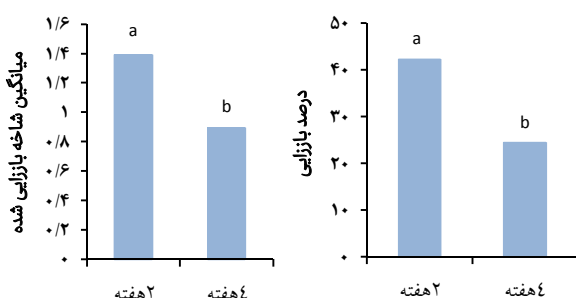
دو هفته تاریکی با میانگین ۱/۳۸ بازاریابی بهتری نسبت به تیمار چهار هفته تاریکی با میانگین ۰/۸۹ داشت. درصد بازاریابی دو هفته تاریکی (۴۲/۲۵٪) بیشتر از چهار هفته (۲۴/۴۱٪) بود (نمودار ۳). ریزنمونه‌های برگ برش‌خورده به سه قسمت (ریزنمونه ۱) بیشترین درصد بازاریابی (۵۳٪) و بیشترین میانگین تعداد شوت نابجا تاریکی (۲/۲۷) را ایجاد کردند (نمودار ۴).



نمودار ۱) مقایسه میانگین اثر متقابل محیط و تنظیم‌کننده رشد TDZ بر تعداد شاخه بازاریابی شده عنب (حروف متفاوت برای هر تیمار نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۱٪ براساس آزمون دانکن است)



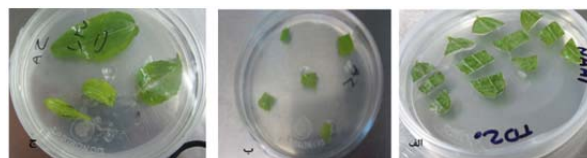
نمودار ۲) مقایسه میانگین اثر متقابل محیط و تنظیم‌کننده رشد TDZ بر درصد بازاریابی عنب (حروف متفاوت برای هر تیمار نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۱٪ براساس آزمون دانکن است)



نمودار ۳) مقایسه میانگین اثر تاریکی بر تعداد شاخه بازاریابی و درصد بازاریابی مستقیم عنب (حروف متفاوت برای هر تیمار نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۱٪ براساس آزمون دانکن است)

رشد بر بازاریابی مستقیم گیاه عنب: به‌منظور تعیین بهترین محیط کشت و تیمار هورمونی برای بازاریابی مستقیم، ریزنمونه‌های برگ در محیط کشت پایه اختصاصی گیاهان چوبی (WPM) و محیط کشت پایه موراشیگ و اسکوگ (MS) همراه با ترکیبی از غلظت‌های NAA (صفر، یک میکرومولار)، TDZ (صفر، ۵، ۱۰، ۱۵، ۲۰ میکرومولار)، ۳۰ گرم در لیتر ساکارز و ۶/۵ گرم در لیتر آگار قرار گرفتند. پس از اعمال تیمار تاریکی، ریزنمونه‌ها به شرایط نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی فیتوترون منتقل و نود روز پس از کشت (هفته دوازدهم) تعداد شاخه‌های باززاشده در هر دو محیط کشت WPM و MS بررسی شدند.

بررسی اثر مدت زمان تاریکی و نوع ریزنمونه در بازاریابی مستقیم گیاه عنب: پس از تعیین بهترین تیمار هورمونی در آزمایش قبل، ریزنمونه‌های برگ شامل برگ سه‌قسمت شده با برش‌های عرضی (نوک، وسط و پایین)، قطعات برگ از چهار طرف برش‌خورده و برگ کامل با سه برش عرضی روی رگبرگ اصلی که همه از سطح پشتی به‌طور مورب زخمی شده بودند (شکل ۱). محیط کشت MS دارای یک میکرومولار NAA، ۱۰ میکرومولار TDZ، ۳۰ گرم در لیتر ساکارز و ۶/۵ گرم در لیتر آگار در تیمار دو و چهار هفته تاریکی قرار گرفتند. ۹۰ روز پس از کشت تعداد شاخه‌های باززاشده از هر ریزنمونه بررسی شد.



شکل ۱) نوع ریزنمونه‌های استفاده‌شده: (الف) برگ سه‌قسمت شده با برش‌های عرضی، (ب) قطعات برگ از چهار طرف برش‌خورده، (ج) برگ کامل با سه برش عرضی روی رگبرگ اصلی

محیط ریشه‌زایی و سازگاری: شاخساره‌های باززاشده به محیط ریشه‌زایی که قبلاً در پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی ایران بهینه شده بود، منتقل شدند. محیط ریشه‌زایی دارای محیط پایه MS با ۸ میکرومولار IBA و یک میکرومولار NAA بود. زمانی که ریشه‌ها در محیط کشت گسترش یافتند، ریشه گیاهچه‌ها در زیر آب روان شسته شد تا بقایای محیط کشت از اطراف ریشه‌ها پاک شود. سپس گیاهچه‌ها به آرامی، در مخلوط پیت: پرلیت: رس، به نسبت ۱:۱:۱ کاشته شدند و به مدت دو هفته در پوش پلاستیکی روشن روی آنها قرار گرفت تا گیاهچه‌ها به تدریج به شرایط برون شیشه سازگار شوند.

در هر تیمار ۲۰ ریزنمونه بررسی و تعداد شوت‌های باززاشده و درصد بازاریابی از هر ریزنمونه پس از ۱۲ هفته یادداشت شدند.

آزمایش‌ها به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح پایه کاملاً تصادفی انجام شد.

میانگین داده‌های آماری با استفاده از آزمون چنددامنه‌ای دانکن مقایسه شد. نرم‌افزار SAS 9.3.1 به کار رفت و تفاوت در سطح احتمال ۱٪ معنی‌دار در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

توده‌های کالوسی روی برگ‌ها و در ناحیه رگبرگ‌ها مشاهده و شاخه‌های نابجا در کنار توده‌های کالوسی ایجاد شدند (شکل ۲-الف). عموماً شاخه‌های نابجا به‌طور مستقیم از بافت برگ به‌ویژه در ناحیه رگبرگ‌ها مشاهده شد (شکل ۲-ب).

بحث

هدف پژوهش حاضر بررسی اثر نوع ریزنمونه، محیط کشت و مدت‌زمان تاریکی در القای باززایی مستقیم از برگ گیاه عناب در شرایط "درشیشه" بود.

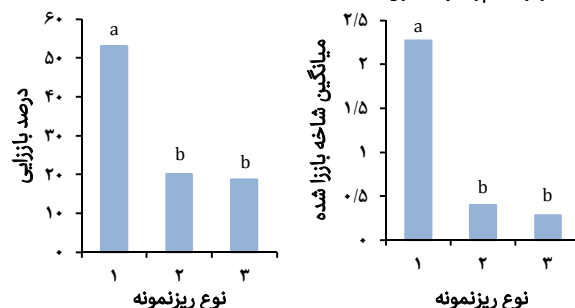
در پژوهش حاضر توده‌های کالوسی روی برگ‌ها و در ناحیه رگبرگ‌ها مشاهده و شاخه‌های نابجا در کنار توده‌های کالوسی ایجاد شدند. عموماً شاخه‌های نابجا به‌طور مستقیم از بافت برگ به‌ویژه در ناحیه رگبرگ‌ها مشاهده شدند. این مشاهدات با مشاهدات هیستولوژیکی ما و همکاران^[10] مطابقت داشت. براساس مقایسه میانگین آزمون دانکن بهترین تولید شاخساره در محیط MS با ترکیب ۵ و ۱۰ میکرومولار TDZ حاصل شد. در حالی که بیشترین درصد باززایی ۶۶/۶۷٪ در محیط MS با ۱۰ میکرومولار TDZ به دست آمد و محیط MS ترکیب‌شده با ۵ میکرومولار TDZ با ۵۵/۵۶٪ باززایی در رتبه بعدی قرار گرفت.

از آنجایی که عناصر غذایی در گیاهان نقش‌های متعدد و مهمی بر عهده دارند نیاز به این عناصر در کشت بافت عناب و تاثیر آنها در توسعه و تقسیم سلولی امری بدیهی است، به‌طور مثال آنها به‌عنوان کوآنزیم عمل می‌کنند، در فعال‌کردن بسیاری از آنزیم‌های مهم نقش دارند، همچنین در ساختمان اسیدهای آمینه، کلروفیل، مواد آلی، اسیدهای نوکلئیک و بسیاری مواد مهم دیگر به کار می‌روند. نتایج حاصل از پژوهش حاضر با گزارش‌های فنک و همکاران^[9] که محیط WPM را برای باززایی عناب مناسب می‌دانستند، مغایرت داشت. این یافته می‌تواند ناشی از تفاوت در نیاز ارقام مختلف به عناصر موجود در محیط‌های کشت متفاوت باشد زیرا محیط کشت گیاهی در بسیاری از گیاهان بسیار به ژنوتیپ وابسته است. وابستگی ژنوتیپی توسط بسیاری از محققان از جمله پورحسینی و همکاران^[11] نشان داده شده است.

نتیجه دیگر از پژوهش حاضر این بود که محیط‌های کشت دارای غلظت‌های ۱۰ و ۵ میکرومولار تنظیم‌کننده رشد TDZ بهترین نتیجه را دادند. تیدیاژورون یک تنظیم‌کننده سنتزی از گروه سیتوکینین‌ها متعلق به دسته فنیل‌اوره‌ها است که امروزه به‌عنوان یک تنظیم‌کننده رشد در زمینه باززایی در عرصه جهان نمود کرده است و توانسته به‌گونه‌ای بسیار موفق در زمینه باززایی مستقیم حتی در بافت‌های بسیار تمایز یافته عمل کند^[11-13].

کاجارسکا و اولیکوسکا^[14] نشان دادند که مولکول‌های TDZ قادر به افزایش قابلیت فاکتورهای درون‌زاد و برون‌زاد در بافت‌های گیاهی هستند که در فرآیند تمایز یابی و تمایز زدایی سلول‌ها نقش دارند. این عمل چندوجهی می‌تواند نتایج و قابلیت اندام‌زایی ریزنمونه‌ها را تغییر دهد. همچنین تنظیم‌کننده رشد TDZ به‌عنوان محرک در باززایی سیب، گلابی و عناب معرفی شده است^[9, 15, 16]. مقدار مصرف این تنظیم‌کننده رشد برای مطالعات باززایی بسیار مهم است به‌طوری که غلظت پایین آن شاخه‌های جانبی را برای رشد تحریک می‌کند در حالی که غلظت بالای آن سبب تولید شاخه‌های نابجا می‌شود^[17, 18].

طبق نتایج حاصل از مقایسه میانگین در پژوهش حاضر دو هفته تاریکی، باززایی بهتری نسبت به تیمار چهار هفته تاریکی داشت، همچنین درصد باززایی دو هفته تاریکی بیشتر از چهار هفته بود. گو و ژنگ^[19] در پژوهش خود با مقایسه چهار دوره تاریکی گزارش کردند که بیشترین درصد ریزنمونه‌های باززاشده و همچنین حداکثر تعداد شوت‌های باززاشده در هر ریزنمونه در تیمارهای تاریکی ۲۰ روزه بود.



نمودار ۴) مقایسه میانگین اثر نوع ریزنمونه، ۱: برگ سه‌قسمت‌شده با برش‌های عرضی، ۲: قطعات برگ از چهار طرف برش‌خورده، ۳: برگ کامل با سه برش عرضی روی رگبرگ اصلی بر تعداد شاخه باززاشده و درصد باززایی مستقیم عناب (حروف برای هر نوع ریزنمونه نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۰/۰۵٪ براساس آزمون دانکن)

سطح برش‌خورده در دو نوع ریزنمونه و تعداد شاخه‌های نابجا نیز بیشتر بود (شکل ۲-ب).

شاخساره‌های باززاشده ابتدا پرآوری (شکل ۳-الف) و سپس به محیط بهینه ریشه‌زایی منتقل شدند. در محیط مذکور ۱۰۰٪ گیاهچه‌ها ریشه‌دار شدند (شکل ۳-ب). همچنین گیاهچه‌ها به‌طور موفقیت‌آمیزی در مرحله سازگاری با شرایط "برون‌شیشه" سازگار شدند (شکل ۳-ج).



الف
ب
شکل ۲) شاخه‌های باززاشده روی سطوح برش‌خورده؛ (الف) سطح برش کمتر در ریزنمونه، (ب) سطح برش بیشتر در ریزنمونه



شکل ۳) گیاهچه‌های عناب؛ (الف) مرحله پرآوری، (ب) مرحله ریشه‌زایی، (ج) مرحله سازگاری

کمکی/تحلیلگر آماری/نگارنده بحث (۵۰٪): یوسف حمیدآقایی (نویسنده سوم)، پژوهشگر کمکی (۱۰٪)
منابع مالی: پژوهش حاضر تحت حمایت مالی پژوهشگاه بیوتکنولوژی کشاورزی در قالب طرح مصوب ۹۱۵۷-۰۵-۰۴ انجام شد.

منابع

- 1-Assareh MH, Sardabi H. Macropropagation and micropropagation of *Ziziphus spina-christi*. Pesquisa Agropecuária Brasileira. 2005;40(5):459-65.
- 2- Ghouth K. *Ziziphus jujube* the neglected fruit. Mashhad: Saeedi Manesh; 2009. [Persian]
- 3- Depommier D. *Ziziphus mauritiana* Lam, culture and use in Kapsiki (North Cameroon). Bois & Forêts des Tropiques existe depuis. 1988;218(4):57-62. [French]
- 4- Abass NH. Rapid in vitro Multiplication and ex vitro Rooting of *Zizyphus mauritiana*. J Appl Sci Res. 2010;6(1):63-9.
- 5- Chen ZL, Yan ZL, Xue H, Feng XD, Chen GL, Cao JY. In vitro culture of leaves and plantlet regeneration of *Ziziphus jujube*, Zhanhua Dongzao. Plant Physiol Commun. 2002;38(6):584.
- 6- Sudharsan C, Hussain J. In vitro clonal propagation of a multipurpose tree, *Ziziphus spina-christi* (L.) desf. Turk J Bot. 2003;27:167-71.
- 7- Al-Sulaiman MA, Barakat MN. In vitro shoot multiplication of *Ziziphus spina-christi* by shoot tip culture. Afr J Biotechnol. 2010;9(6):850-7.
- 8- Al-Sulaiman MA. Clonal propagation of *Ziziphus spina-christi* by shoot tip culture: I. improved inorganic and organic media constituents for in vitro shoot multiplication. J King Abdulaziz Univ Meteorol Environ Arid Land Agric Sci. 2010;21(2):3-17.
- 9- Feng JC, Yu XM, Shang XL, Li JD, Wu YX. Factors influencing efficiency of shoot regeneration in *Ziziphus jujuba* Mill. 'Huizao'. Plant Cell Tissue Organ Cult. 2010;101(1):111-7.
- 10- Ma C, Ye X, Chen Y, Feng J, Shang X, Li J, et al. Anatomical observations of adventitious bud regeneration from leaf explants of *Ziziphus jujube* Mill. 'Huizao'. Horticult Environ Biotechnol. 2012;53(4):316-9.
- 11- Pourhosseini L, Jafarkhani Kermani M, Habashi AA, Khalighi A. Efficiency of direct and indirect shoot organogenesis in different genotypes of *Rosa hybrida*. Plant Cell Tissue Organ Cult. 2013;112(1):101-8.
- 12- Dohm A, Ludwig C, Schilling D, Debener T. Transformation of roses with genes for antifungal proteins to reduce their susceptibility to fungal diseases, Int Soc Hortic Sci Acta Hort. 2002;572:105-11.
- 13- Zakizadeh H, Stummam BM, Lütken H, Müller R. Isolation and characterization of four somatic embryogenesis receptor-like kinase (RhSERK) genes from miniature potted rose (*Rosa hybrida* cv. Linda). Plant Cell Tissue Organ Cult. 2010;101(3):331-8.
- 14- Kucharska D, Orlikowska T. Enhancement of in vitro organogenic capacity of rose by preculture of donor shoots on the medium with thidiazuron. Acta Physiol Plant. 2009;31(3):495-500.
- 15- Fasolo F, Zimmerman RH, Fordham I. Adventitious shoot formation on excised leaves of in vitro grown shoots of apple cultivars. Plant Cell Tissue Organ Cult. 1989;16(2):75-87.
- 16- Chevreau E, Skirvin R, Abu-Qaoud HA, Korban SS, Sullivan JG. Adventitious shoot regeneration from leaf

در پژوهش فنگ و همکاران [9] در عناب مشخص شد که در مقایسه تیمارهای تاریکی صفر، ۱۰، ۲۰ و ۳۰ روز، تاریکی ۱۰ روز با میانگین باززایی ۲/۳۵ و ۸۱٪ بهترین تیمار بود که با نتایج پژوهش حاضر مطابقت دارد.

در مطالعه‌ای گزارش شد که تیمارهای تاریکی ممکن است تخریب اندوژن یا آگروژن تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی را به تاخیر بیندازد که آن نیز به نوبه خود موجب القای باززایی گیاهان در شرایط "درشیشه" می‌شود [20].

در پژوهش حاضر نتایج حاصل از مقایسه میانگین نشان داد ریزنمونه‌های برگ برش‌خورده به سه قسمت (ریزنمونه ۱) بیشترین درصد باززایی و میانگین تعداد شوت نابجا را ایجاد کرد. این نتیجه می‌تواند به علت افزایش سطوح برش و در نتیجه افزایش سطح تماس با محیط در ریزنمونه یک نسبت به ریزنمونه برگ کامل (ریزنمونه ۳) و همچنین بیشتر بودن حجم ماده کشتی در آن نسبت به برگ برش‌خورده از چهار طرف (ریزنمونه ۲) باشد. به نظر می‌رسد تولید شاخه‌های نابجا با میزان سطح لبه‌های برش مرتبط است و با افزایش سطوح برش‌خورده تعداد شاخه‌های باززاشده افزایش می‌یابد.

بک و کمپر [21] در آزمایشی با بررسی تاثیر اندازه برگ در باززایی گیاه اطلسی نشان دادند که بین سطح و لبه‌های برش همبستگی مثبت وجود دارد، پس با افزایش سطح و افزایش لبه‌های برش مقدار باززایی بیشتر می‌شود. آنها همچنین بیان کردند که حجم توده ریزنمونه نیز می‌تواند به عنوان یک عامل مهم در تعداد شوت نابجا باشد. نتایج حاصل از این پژوهش با نتایج به دست آمده در آزمایش بک و کمپر مطابقت دارد.

در انجام پژوهش حاضر محدودیتی وجود نداشت. با توجه به بهینه‌سازی و تعیین پروتوکل باززایی عناب در این پژوهش، ادامه تحقیقات در زمینه به کارگیری این پروتوکل به منظور استفاده در برنامه‌های به نژادی آتی برای افزایش عملکرد و افزایش میزان متابولیت‌های ثانویه پیشنهاد می‌شود.

نتیجه‌گیری

بیشترین درصد باززایی و بیشترین تعداد شوت نابجا در تیمار یک میکرومولار NAA با ۱۰ میکرومولار TDZ در محیط کشت MS است. بیشترین میزان باززایی در ریزنمونه برگ برش‌خورده به سه قسمت است. علت این امر را می‌توان به برهم‌کنش سطح تنظیم‌کننده‌های درونی و بیرونی و همچنین بیشترین سطح لبه برش‌خورده در این نوع ریزنمونه دانست. مدت زمان تیمار تاریکی برای القای باززایی عناب مهم است، بیشترین میزان باززایی در تیمارهای دو هفته تاریکی است. در محیط مذکور ۱۰۰٪ گیاهچه‌ها ریشه‌دار و به طور موفقیت آمیزی در مرحله سازگاری با شرایط "برون‌شیشه" سازگار می‌شوند.

تشکر و قدردانی: نویسندگان مقاله از پژوهشگاه بیوتکنولوژی کشاورزی برای در اختیار قرار دادن امکانات آزمایشگاهی و منابع مالی تشکر و قدردانی می‌نمایند.

تاییدیه اخلاقی: موردی از سوی نویسندگان یافت نشد.

تعارض منافع: نویسندگان اعلام می‌دارند هیچ گونه تعارض منافعی وجود ندارد.

سهم نویسندگان: زهرا هاشم‌زاده (نویسنده اول)، نگارنده مقدمه/پژوهشگر اصلی/تحلیلگر آماری (۴۰٪)؛ مریم جعفرخانی کرمانی (نویسنده دوم)، نگارنده مقدمه/روش‌شناس/پژوهشگر

- (*Zizyphus jujuba* Mill.) using leaf explants. *Plant Cell Rep.* 2005;23(12):775-9.
- 20- Ahn YJ, Vang L, McKeon TA, Chen GQ. High-frequency plant regeneration through adventitious shoot formation in castor (*Ricinus communis* L.). *Vitro Cell Dev Biol Plant.* 2007;43(1):9-15.
- 21- Beck MJ, Camper ND. Shoot regeneration from petunia leaf discs as a function of explants size, configuration and benzyladenine exposure. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 1991;26(2):101-6.
- tissue of three pear (*Pyrus* sp.) cultivars in vitro. *Plant Cell Rep.* 1989;7(8):688-91.
- 17- Van Nieuwkerk JP. Thidiazuron stimulation of apple shoot proliferation in vitro. *Hortic Sci.* 1986;21(3):516-18.
- 18- Yusnita S, Geneve RL, Kester ST. Micropropagation of white flowering eastern redbud (*Cercis canadensis* var. *alba* L.). *J Environ Hortic.* 1990;8(4):177-9.
- 19- Gu XF, Zhang JR. An efficient adventitious shoot regeneration system for Zhanhua winter jujube