

## بررسی تکثیر کاکتوس زینتی - دارویی (*Cereus peruvianus* Mill. (Cactaceae) با استفاده از تکنیک کشت بافت

نرگس کریمی<sup>۱</sup>، روح‌انگیز نادری<sup>۲\*</sup>، مرتضی ابراهیمی<sup>۳</sup>، محمدرضا مفید<sup>۴</sup>

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه آزاد اسلامی (واحد کرج)، کرج  
 ۲- استادیار، گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی دانشگاه پردیس تهران، کرج  
 ۳- دکتر، عضو هیأت علمی، پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی منطقه مرکزی کشور، اصفهان  
 ۴- استادیار، عضو هیأت علمی، گروه بیوشیمی، دانشکده داروسازی دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان  
 \*آدرس مکاتبه: اصفهان، جاده گلدهشت، بلوار پژوهش، پژوهشکده بیوتکنولوژی مرکزی کشور  
 کدپستی: ۸۱۷۴۶ - ۷۱۱۵۶، تلفن: ۲۲۳۵۸۵۸ (۰۳۳۱) - ۲۲۳۴۵۸۷ (۰۳۳۱)  
 پست الکترونیک: mnaderi2002@yahoo.com

تاریخ تصویب: ۸۸/۶/۲۲

تاریخ دریافت: ۸۷/۲/۸

### چکیده

**مقدمه:** عصاره و آلکالوئید تولید شده از کاکتوس سرئوس پرویانوس دارای ترکیبات موثره فراوانی است و در صنایع داروسازی و کشاورزی کاربرد زیادی دارد. تکثیر این گیاه با روش‌های سنتی (بذر، قلمه و پا جوش) به کندی صورت می‌گیرد و تولید آن در سطح انبوه فقط از طریق کشت بافت امکان‌پذیر است. هدف: این تحقیق به منظور بررسی امکان ریز ازدیادی، شناخت جنبه‌های مختلف افزایش این گیاه و تعیین بهترین محیط کشت و ترکیب هورمونی در شرایط درون شیشه‌ای انجام شد. روش بررسی: این آزمایش با طرح پایه کامل تصادفی در ۳ تکرار انجام شد و هر تکرار شامل ۵ ریزنمونه ۱ بود، ریزنمونه‌ها پس از ضدعفونی سطحی روی محیط کشت پایه MS همراه با ۳ درصد ساکارز، ۸ گرم در لیتر فیتوآگار و ۲۵ تیمار هورمونی با نوع و غلظت مختلف تنظیم‌کننده‌های رشد (NAA، Kinetin، BAP، 2,4-D، IBA، GA<sub>3</sub> و TDZ) با pH=۵/۸ کشت شدند. پس از گذشت ۴۵ روز، اثرات محیط کشت بر باززایی از آرئول، تولید پینه ترد و ریشه‌زایی در محیط‌های مختلف ثبت و ارزیابی شد. نتایج: در این تحقیق بهترین ترکیب هورمونی برای تولید پینه ترد ۰/۰۵ mg/l NAA + ۰/۰۷ mg/l TDZ، برای تولید گیاهچه Kinetin ۶ mg/l + 2,4-D ۴ mg/l و برای ریشه‌زایی Kinetin ۴ mg/l + 2,4-D ۴ mg/l بود. شروع باززایی در تیمارهای برتر ۲ تا ۳ ماه پس از کشت مشاهده شد و ۸ محیط کشت مناسب برای تولید گیاهچه (تولید گیاه از آرئول) انتخاب شد. بین دو واریته *Cereus peruvianus var monstrosus* و *Cereus peruvianus var tortuosus* از نظر باززایی گیاه از آرئول تفاوت معنی‌دار وجود داشت. نتیجه‌گیری: با توجه به اهمیت عصاره و آلکالوئید سرئوس پرویانوس و کندی تکثیر آن به روش‌های سنتی تکثیر آن از طریق باززایی از آرئول علاوه بر اقتصادی بودن، از نظر زمانی نیز بسیار کوتاه‌تر است. گل‌واژگان: سرئوس پرویانوس، واریته تورئوسوس و مونستروسوس، پینه، ریزازدیادی



## مقدمه

ایندول بوتیریک اسید<sup>۱</sup> (IBA) به همراه ۲ میلی‌گرم در لیتر بنزیل آمینو پورین<sup>۲</sup> (BAP) با محیط کشت پایه MS معرفی نمود [۵]. ساگستوم<sup>۳</sup> در کشت بافت هلیوسرئوس<sup>۴</sup> از ۲ میلی‌گرم در لیتر BAP و ۲ و ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر نفتالین استیک اسید<sup>۵</sup> (NAA) استفاده نمود [۶]. دریو و عظیمی<sup>۶</sup> (۲۰۰۰) در کشت بافت همین گیاه از محیط شاخه‌زایی ۲ میلی‌گرم در لیتر 2ip<sup>۷</sup> و محیط ریشه‌زایی ۲ میلی‌گرم در لیتر IBA استفاده کردند و هلیوسرئوس را باززایی نمودند [۷].

این درحالی بود که محمد یاسین<sup>۸</sup> (۲۰۰۱) برای باززایی این کاکتوس از تی دیازورون<sup>۹</sup> و NAA به میزان مساوی ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر استفاده نمود و محیط MS را جهت ریشه‌زایی به کار برد [۸]. دبی‌شاپ<sup>۱۰</sup> (۱۹۹۵) در باززایی تعدادی از کاکتوس‌ها از جمله آپونتیا محیط ۱ میلی‌گرم در لیتر BAP به همراه ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA را به عنوان بهترین محیط پینه‌زایی و محیط ۲ میلی‌گرم در لیتر BAP و ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D را به عنوان بهترین محیط شاخه‌زایی معرفی نمود [۹]. پرزمولفه<sup>۱۱</sup> و همکاران (۲۰۰۲) نیز در کشت بافت کاکتوس‌های ستونی با استفاده از محیط پایه MS به همراه ۱ و ۲ میلی‌گرم در لیتر بنزیل آدنین<sup>۱۲</sup> موفق به باززایی شدند [۱۰]. اما ماتا رزاس<sup>۱۳</sup> و همکاران (۲۰۰۱) در کشت حاوی BA با غلظت ۲ میلی‌گرم در لیتر اقدام به تولید پینه سبز و شفاف در کاکتوس توربینوکارپوس<sup>۱۴</sup> نمودند، سپس با محیط حاوی ۳ میلی‌گرم در لیتر BA و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA شاخه‌زایی نمودند [۱۱]. اغلب گزارش‌های موجود کاکتوس‌ها حاکی از بررسی پینه‌زایی گیاه حاصل از بذر در شرایط درون شیشه‌ای و اثر ترکیب‌های مختلفی از

سرئوس پرویانوس گیاهی دارویی و زینتی از خانواده کاکتوس<sup>۱</sup> است. این گیاه گوشتی و چند ساله با الگوی رشد ستونی بوده و به نواحی نیمه گرمسیری سازگار می‌باشد [۱]. در دهه‌های اخیر عصاره تولید شده از ساقه، میوه و پینه گیاه کاکتوس به دلیل ویژگی‌ها و فعالیت‌های فیزیولوژیکی متنوع همچون توانایی برطرف نمودن قارچ‌های پوستی، دردهای عضلانی، درمان بیماری‌های پروستات، قلبی و عصبی، داشتن انواع استراز درموم میوه، اسیدهای چرب غیر اشباع، آلکالوئید و... در صنایع داروسازی و کشاورزی استفاده می‌شود [۲،۳]. تکثیر سرئوس بیشتر به روش بذر، قلمه و پاجوش<sup>۲</sup> است، ولی به دلیل کندی این روش در تولید گیاهچه بیشتر در سطوح کوچک قابل استفاده می‌باشد، بنابراین استفاده از کشت بافت، هم برای تولید انبوه گیاهچه سرئوس و هم برای تولید پینه و استخراج آلکالوئید و مواد موثر آن در کوتاه‌مدت مناسب به نظر می‌رسد. در زمینه ریز ازدیادی این گیاه گزارش‌های اندکی موجود است. در ایران گزارش منتشر شده‌ای مبنی بر افزایش سرئوس به روش کشت بافت یا استخراج مواد آلکالوئیدی و موثر آن وجود ندارد. دی‌الیویرا<sup>۳</sup> و همکاران (۱۹۹۴) بهترین محیط پینه‌زایی را، محیط کشت MS<sup>۴</sup> (۱۹۶۲) حاوی ۴ میلی‌گرم ۲،۴-دی کلرو فنوکسی استیک اسید (2,4-D)<sup>۵</sup> به همراه ۴ و ۶ میلی‌گرم در لیتر کینتین<sup>۶</sup> و ۱۵ درصد شیره نارگیل و با استفاده از ریزنمونه رشد یافته از کاشت بذر معرفی نمودند. آنها دریافتند محیط فوق با مقدار ۶ میلی‌گرم در لیتر کینتین، با داشتن پینه‌های ترد<sup>۷</sup> بیشتر، تعداد شاخساره کمتری تولید می‌کند و همین محیط با مقدار ۴ میلی‌گرم در لیتر کینتین با وجود پینه‌های فشرده<sup>۸</sup> تعداد شاخه کمتری می‌دهد [۴]. سسیلیا (۲۰۰۲)<sup>۹</sup> در کشت بافت آپونتیا<sup>۱۰</sup> بهترین محیط کشت شاخه‌زایی (اندام‌زایی) را مقادیر ۱۰،۲،۵ میلی‌گرم در لیتر

<sup>1</sup> Indolebutyric acid

<sup>2</sup> Benzylamino purine

<sup>4</sup> Helicocereus

<sup>6</sup> Azimi and Drew

<sup>7</sup> 2-ip-riboside, N6-(2-isopentenyl)adenosine, n6-(y,y-methylallyl) adenosine

<sup>8</sup> Yasseen M

<sup>9</sup> Thidiazuron (N-phenyl N' 1,2,3-thidiazol-5-yl urea): TDZ

<sup>10</sup> D. Bishope

<sup>12</sup> Benzyladenin

<sup>14</sup> Turbino carpus

<sup>3</sup> Sagastume Tecnoregion

<sup>5</sup> Naphthaleneacetic acid

<sup>11</sup> Perez molphe

<sup>13</sup> Mata rosas

<sup>1</sup> Cactaceae

<sup>3</sup> De Oliveira

<sup>5</sup> 2,4-dichlorophenoxyacetic acid

<sup>6</sup> Kinetin

<sup>8</sup> Compact callus

<sup>10</sup> Opuntia ellisiana Griff

<sup>2</sup> Offset

<sup>4</sup> Murashige & skoog

<sup>7</sup> Friable callus

<sup>9</sup> Cecili



کامل در اتاقت رشد قرار داده شد. پس از گذشت یک ماه به مدت سه ماه به شرایط شدت نوری ۳۰ لوکس با فتوپریود ۱۶ ساعت، منتقل شد. هر ۳ هفته یکبار ریزنمونه‌ها جهت استفاده از مواد غذایی بیشتر و تازه‌تر در محیط کشت جدید واکنش شدند. ۴۵ روز پس از کشت ریزنمونه‌ها، ویژگی‌های تولید پینه‌ترد و فشرده و از حدود ماه سوم به بعد تولید درصد ریشه‌زایی و باززایی از آرئول اندازه‌گیری شد. این آزمایش به صورت طرح کامل تصادفی با ۳ تکرار به اجرا درآمد. داده‌های حاصل با استفاده از نرم‌افزار SAS تجزیه و مقایسه میانگین با کمک آزمون دانکن و در سطح احتمال ۱ و ۵ درصد صورت گرفت.

## نتایج

### اثر محیط‌های کشت مختلف روی تولید پینه‌ترد و شکننده

با توجه به نتایج به دست آمده از تجزیه واریانس داده‌ها (جدول شماره ۱)، بین محیط‌های کشت در تولید گیاهچه و پینه‌ترد و شکننده تفاوت معنی‌دار در سطح ۱ و ۵ درصد وجود داشت، از طرفی بین صفت تولید پینه‌ترد در دو واریته این تفاوت معنی‌دار بود، به طوری‌که واریته هفت پر فقط در محیط کشت ۱ میلی‌گرم در لیتر BAP به همراه ۵ میلی‌گرم در لیتر NAA توانست پینه‌ترد تولید نماید. از ۲۵ محیط کشت، ۱۶ محیط مربوط به واریته شاخه نباتی تولید پینه‌ترد و شکننده نمودند که بهترین محیط از نظر میزان تولید این نوع پینه محیط شماره ۱۶ با میزان هورمون ۰/۰۷ میلی‌گرم در لیتر TDZ و ۰/۰۵ میلی‌گرم در لیتر NAA و پایین‌ترین آن مربوط به محیط‌های شماره ۳، ۵، ۶، ۷، ۱۰، ۱۱، ۱۳ که در آنها غلظت‌های متفاوتی از BAP و NAA به کار رفته بود، تفاوت معنی‌دار نداشتند (جدول شماره ۲).

تنظیم‌کننده‌های رشد، روی میزان پرآوری در آن است. با این وجود، بر اساس منابع در دسترس ویکا<sup>۱</sup> و همکاران (۲۰۰۶) در تکثیر مامیلاریا با استفاده از ریزنمونه گلچه در محیط ۵ میلی‌گرم در لیتر BA و ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر NAA تولید پینه و سپس با واکنش<sup>۲</sup> آنها در همین محیط از آنها شاخه گرفتند [۱۲]. در حالی که دی‌الیویرا<sup>۳</sup> (۱۹۹۵) اعتقاد داشت بدون وجود ریزنمونه حاصل از کشت بذر نمی‌توان باززایی نمود [۴]. به دلیل وجود گزارش‌های گوناگون و حتی گاهی متناقض آن هم روی کاکتوس‌های مختلف، این آزمایش در پژوهشکده بیوتکنولوژی اصفهان با هدف بررسی تعدادی از محیط‌های کشت روی واکنش پینه‌زایی، رشد و باززایی ریزنمونه‌های مختلف و در پایان انتخاب محیط‌های برتر انجام شد.

## مواد و روش‌ها

ریزنمونه‌های موردنیاز از دو واریته شاخه نباتی با نام علمی *Cereus peruvianus var monstrosus* و هفت‌پر با نام علمی *Cereus peruvianus var tortuosus* از گیاهان ۲ ساله سرئوس پرویانوس تهیه شد، ساقه‌های گیاه ابتدا یک دقیقه با الکل ۹۶ درصد شستشو داده و بعد از شستشو با آب مقطر استریل، به مدت ۲۰ دقیقه با محلول ۱ درصد هیپوکلریت سدیم به همراه یک قطره توپین ۲۰ ضد عفونی سطحی شدند و سپس بعد از چند مرتبه شستشو با آب مقطر استریل در زیرهود<sup>۴</sup> از آنها ریزنمونه تهیه شد. ریزنمونه‌ها به طور تصادفی، از قسمت‌های مختلف گیاه انتخاب شد. ریزنمونه‌های تهیه شده روی محیط کشت پایه MS همراه با ۳ درصد ساکارز، ۸ گرم در لیتر فیتوآگار و غلظت‌های مختلفی از تنظیم‌کننده‌های رشد با  $pH = 5/8$  کشت شدند. در این آزمون با هدف تولید گیاهچه (از طریق باززایی مستقیم و یا با استفاده از پینه)، تعداد ۲۵ تیمار هورمونی با نوع و غلظت مختلف تنظیم‌کننده‌های رشد (جدول شماره ۲) در ۳ تکرار که هر تکرار شامل ۵ ریزنمونه بود (و هر کدام یک آرئول داشت) مورد استفاده قرار گرفت. کشت‌ها در دمای  $25 \pm 2$  درجه سانتی‌گراد و تاریکی

<sup>1</sup> Wyka

<sup>3</sup> De Oliveira

<sup>2</sup> Subculture

<sup>4</sup> Laminar



جدول شماره ۱- تجزیه واریانس متغیر اثر محیط کشت بر تولید گیاهچه و پینه ترد و شکننده در واریته شاخه نباتی (*c. peruvianus var monstrosus*)

میانگین مربعات		درجه آزادی	منابع متغیر
تولید پینه ترد و شکننده	تولید گیاهچه		
۰/۰۷۷۱*	۰/۱۸۱۳۷۴۳۲**	۲۴	محیط کشت
۰/۲۷۴**	۰/۰۳۲۶۳۷۶۵ <sup>ns</sup>	۲	تکرار
۰/۰۲۰۱۲	۰/۰۱۴۳۸	۴۸	خطا
۱۰/۷۸	۱۰/۵۱	CV	

نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۱ درصد، نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد، ns نشان‌دهنده عدم اختلاف معنی‌دار

جدول شماره ۲- مقایسه میانگین اثر ترکیبات هورمونی بر درصد تولید گیاهچه (اندام‌زایی) و پینه ترد و شکننده در واریته‌های سرئوس پرویانوس (در هر ستون اعدادی که دارای حروف مشابه هستند در سطح احتمال ۵ درصد آزمون دانکن تفاوت معنی‌داری ندارند).

درصد تولید گیاهچه (اندام‌زایی) و پینه ترد و شکننده				هورمون‌ها و تنظیم‌کننده‌های رشد	ردیف
<i>(c. peruvianus var monstrosus)</i> واریته شاخه نباتی	<i>(c. peruvianus var tortuosus)</i> واریته هفت پر	پینه ترد و شکننده	گیاهچه		
۳۳/۳ <sup>ab</sup>	۴۰ <sup>a b</sup>	.	.	MS + ۱ mg/l 2,4-D + ۱ mg/l Kinetin + ۱۵ درصد شیره نارگیل	۱
۲۶/۶ <sup>bc</sup>	۵۳/۳ <sup>a</sup>	.	۱۳/۳	MS+ ۱۵ درصد شیره نارگیل + ۶ mg/l Kinetin + ۱ mg/l 2,4-D	۲
.	.	.	.	MS+ 1mg/INAA + 1 mg/l IAA	۳
۲۶/۶ <sup>bc</sup>	.	.	.	MS+ ۰/۰۵ mg/l NAA+1mg/BAP 1	۴
.	.	.	.	MS+ ۰/۵ mg/IBA 1+۰/۷ mg/BAP 1	۵
.	۶/۶ <sup>dc</sup>	.	.	MS+ ۰/۰۵ mg/NAA 1+۰/۰۳ mg/TDZ 1	۶
۲۶/۶ <sup>bc</sup>	.	.	.	MS+ ۰/۱ mg/NAA 1 + ۱ mg/BAP 1	۷
.	.	.	.	MS+۰/۲ mg/NAA 1 + ۰/۰۵ mg/l Kinetin	۸
.	۶/۶ <sup>dc</sup>	.	.	MS+ ۰/۵ mg/NAA 1 + ۰/۰۵ mg/TDZ 1	۹
۲۶/۶ <sup>bc</sup>	.	.	.	MS + ۰/۰۵ mg/l NAA + ۲ mg/BAP 1	۱۰
۲۶/۶ <sup>bc</sup>	.	.	.	MS+ ۰/۲ mg/l NAA + ۱ mg/BAP 1	۱۱
.	۲۶/۶ <sup>b</sup>	.	.	MS+ ۰/۱ mg/l NAA + ۰/۱ mg/BAP 1	۱۲
۲۶/۶ <sup>bc</sup>	.	.	.	MS+ ۰/۱ mg/l NAA + ۲ mg/BAP 1	۱۳
.	۱۳/۳ <sup>c</sup>	.	.	MS + ۱ mg/l GA3 + ۲ mg/BAP 1	۱۴
.	.	.	.	MS + ۰/۲ mg/l NAA + ۲ mg/BAP 1	۱۵
۶۰ <sup>a</sup>	.	.	.	MS + ۰/۰۵ mg/l NAA + ۰/۰۷ mg/TDZ 1	۱۶
۱۳/۳ <sup>de</sup>	.	.	.	MS+ ۰/۲ mg/NAA 1 + ۰/۰۷ mg/TDZ 1	۱۷
۲۰ <sup>dc</sup>	۲۶/۶ <sup>b</sup>	.	.	MS+ ۰/۱ mg/NAA 1 + ۱ mg/TDZ 1	۱۸
.	.	.	.	MS+۲ mg/BAP 1	۱۹
۶/۶ <sup>ef</sup>	.	.	.	MS+ ۰/۱ mg/NAA 1 + ۰/۰۳ mg/TDZ 1	۲۰
۱۳/۳ <sup>de</sup>	.	.	.	MS + ۰/۱ mg/NAA 1 + ۰/۰۵ mg/TDZ 1	۲۱
۵۳/۳ <sup>a</sup>	۱۳/۳ <sup>c</sup>	.	.	MS + ۰/۰۵ mg/NAA 1 + ۰/۰۵ mg/TDZ 1	۲۲
۱۳/۳ <sup>de</sup>	.	.	.	MS + ۰/۱ mg/NAA 1 + ۰/۰۳ mg/TDZ 1	۲۳
.	.	.	.	MS + ۰/۷ mg/IBA 1 + ۰/۰۵ mg/BAP 1	۲۴
۵۳/۳ <sup>a</sup>	.	.	.	MS + ۰/۰۳ mg/l IBA + ۰/۰۵ mg/NAA 1	۲۵

\* حروف کوچک به تفاوت معنی‌دار بین محیط‌های کشت اشاره دارد.



## اثر محیط کشت بر باززایی از آرئول

آزمایش‌های فوق محیط‌های کشت حاوی ترکیبات هورمونی کایتین، بنزیل آدنین و تی دیازورون به ترتیب باعث تولید پینه ترد و شکننده بیشتر و تولید گیاه از آرئول گردید. محیط کشت حاوی ۴ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D نسبت به سایر محیط‌ها و واریته شاخه نباتی نسبت به واریته هفت پر ریشه‌زایی بیشتری نشان دادند.

## بحث

در پینه‌زایی و تولید پینه ترد، مهم‌ترین عوامل تاثیرگذار، ترکیب هورمونی محیط کشت و مقادیر آنها است، در این زمینه ترکیبات اکسین و میزان آن نقش مهمی دارند. به طور کلی میزان توفوردی برای تشکیل پینه ۱ تا ۲ میلی‌گرم در لیتر می‌باشد ولی در کاکتوس‌ها این میزان بیشتر است و در انواع مختلف آن، این نسبت تغییر می‌کند [۴]. از طرفی سرئوس پرویانوس دارای تنوع ژنتیکی است و میزان هورمون و مواد غذایی آن با دیگر کاکتوس‌ها متفاوت است [۱۳]. برخی گیاهان به مقادیر بسیار بالایی از هورمون 2,4-D برای تشکیل پینه ترد نیاز دارند. مثلاً دنیس توماس و پوتور<sup>۱</sup> (۲۰۰۴) در باززایی گیاه دارویی کیگلیا پیناتا از خانواده Bignoniaceae در میزان ۶۶ میلی‌گرم در لیتر (۳ میلی‌مول) از 2,4-D و بدون ترکیب با هورمون‌های دیگر به پینه ترد، شکننده و زرد رنگ دست یافتند [۱۴]. در این رابطه دی البویرا و همکاران (۱۹۹۵) با کاربرد ۴ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D و ۶ میلی‌گرم در لیتر کایتین، پینه‌های ترد و شکننده بیشتری از سرئوس پرویانوس تولید کردند [۴]. در این پژوهش همین میزان برای واریته شاخه نباتی مناسب‌تر از بقیه سطوح 2,4-D بود اما در ترکیب هورمونی از نظر اهمیت بعد از TDZ و NAA بود. شاید تنوع ژنتیکی سرئوس پرویانوس و نیاز متفاوت آن به هورمون‌ها در این زمینه بی‌تاثیر نبوده باشد. همچنین چون پینه‌های ترد، احتمال شاخه‌زایی بیشتری دارند [۴] و TDZ در این زمینه قدرت بالایی دارد [۱۵] وجود آن در ترکیب هورمونی می‌تواند در تولید پینه ترد نقش داشته باشد. زمان نیز در تشکیل پینه ترد نقش داشت. در آزمایش ما ۴۵ روز پس از کشت، پینه ترد

در این پژوهش اثر غلظت‌های مختلفی از 2,4-D به همراه کایتین، TDZ، BA (جدول شماره ۱) روی باززایی ریزنمونه‌ها مورد بررسی قرار گرفت. بر اساس نتایج به دست آمده، میزان باززایی در این محیط‌ها (شماره ۱ و ۲) (جدول شماره ۲) با میزان هورمون ۴ و ۶ میلی‌گرم در لیتر کایتین به همراه ۴ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D در بالاترین سطح و کمترین باززایی در محیط‌های شماره ۱۶، ۲۳، ۲۴ و ... (جدول شماره ۳) که حاوی مقادیر مختلف TDZ و NAA بود مشاهده شد. ترکیب هورمونی BAP و NAA بعد از TDZ و هم ردیف با ۴ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D و ۶ میلی‌گرم در لیتر کایتین قرار گرفتند. واریته هفت پر فقط در محیط کشت شماره ۲ (جدول شماره ۲) با میزان هورمون ۶ میلی‌گرم در لیتر کایتین به همراه ۴ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D توانست تولید گیاهچه نماید. بین دو واریته و محیط‌های کشت از نظر تولید گیاه از آرئول تفاوت معنی‌داری وجود داشت. (جدول شماره ۱). در محیط‌های حاوی IBA هیچ گیاهچه‌ای تولید نشد.

## اثر محیط کشت بر قابلیت ریشه‌زایی

برخلاف سایر تحقیقات صورت گرفته بر روی کشت بافت انواع کاکتوس‌ها، که محیط MS به تنهایی برای ریشه‌زایی به عنوان مناسب‌ترین محیط انتخاب می‌شد [۷،۹،۱۰]، در آزمایش ما محیط‌های مختلف، سبب ریشه‌زایی (با طول ریشه بلند) گردید که بهترین آن از نظر ریشه‌زایی محیط شماره ۱ و ۲ (جدول شماره ۴) با میزان هورمون ۴ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D و ۴ و ۶ میلی‌گرم در لیتر کایتین و کمترین آن مربوط به محیط‌های کشت شماره (۵،۳ و ۸) (جدول شماره ۴) با ترکیبات اسید جیبرلیک<sup>۱</sup> (GA3)، NAA و BAP بود. با توجه به نتایج به دست آمده از جدول تجزیه واریانس بین دو واریته و محیط‌ها از نظر تولید ریشه اختلاف معنی‌دار در سطح ۱ درصد وجود داشت و واریته شاخه نباتی ریشه‌زایی بهتری را نشان داد (جدول شماره ۳، ۴، ۵).

<sup>1</sup> Dennis Thomas. and Puthur<sup>1</sup> Gibberellic acid

منابع متغیر	درجه آزادی	میانگین مربعات ریشه زایی
محیط کشت	۹	۰/۷۷۰**
واريته	۱	۰/۰۸۷**
واريته * محیط کشت	۹	۰/۰۸۳**
تکرار	۲	۰/۰۳۴ <sup>ns</sup>
خطا	۳۸	۰/۰۱۴۵۳
CV		۸/۳۹

\*\* نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۱ درصد، \* نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد، ns نشان‌دهنده عدم اختلاف معنی‌دار

ردیف	هورمون‌ها و تنظیم‌کننده‌های رشد	درصد ریشه‌زایی	درصد ریشه‌زایی (دو واريتها)
		واريته هفت‌پر <i>var tortuosus</i>	واريته شاخه نباتی <i>var monstrosus</i>
۱	MS + $\epsilon$ mg/l 2,4-D	۹۳/۳ <sup>a</sup>	۵۳/۳ <sup>a</sup>
۲	MS + $\epsilon$ mg/l 2,4-D+ 2 mg/l kinetin	۶۰ <sup>ab</sup>	۶۶/۶ <sup>a</sup>
۳	MS + ۱ mg/l GA <sub>3</sub> + ۲mg/l BAP	۰ <sup>e</sup>	۰ <sup>d</sup>
۴	MS + $\epsilon$ mg/l NAA+ 2 mg/l kinetin	۴۰ <sup>dc</sup>	۲۶/۶ <sup>b</sup>
۵	MS + ۰/۰۵ mg/l NAA+ ۰/۰۵ mg/l TDZ	۰ <sup>e</sup>	۰ <sup>d</sup>
۶	MS + $\epsilon$ mg/l 2,4-D+ 6 mg/l kinetin	۱۳/۳ <sup>d</sup>	۱۳/۳ <sup>c</sup>
۷	MS + ۰/۱ mg/l NAA+ ۰/۱ mg/l BAP	۰ <sup>e</sup>	۲۶/۶ <sup>c</sup>
۸	MS + ۰/۱ mg/l NAA+ ۲ mg/l BAP	۰ <sup>e</sup>	۰ <sup>d</sup>
۹	MS + $\epsilon$ mg/l NAA	۵۳/۳ <sup>ab</sup>	۲۶/۶ <sup>c</sup>
۱۰	MS + $\epsilon$ mg/l 2,4-D+ $\epsilon$ mg/l kinetin	۳۳/۳ <sup>bc</sup>	۲۶/۶ <sup>c</sup>

\* حروف کوچک به تفاوت معنی‌دار بین محیط‌های کشت اشاره دارد.

میانگین درصد ریشه‌زایی	واريته
۲۳/۹۶ <sup>a</sup>	شاخه نباتی ( <i>c. peruvianus var monstrosus</i> )
۹/۹۹ <sup>b</sup>	هفت‌پر ( <i>c. peruvianus var tortuosus</i> )

(به دلیل اینکه واريتها هفت‌پر فقط در محیط کشت ۱ میلی‌گرم در لیتر BAP به همراه ۵ میلی‌گرم در لیتر NAA توانست پینه ترد و در محیط کشت با ۶ میلی‌گرم در لیتر کابنتین به همراه ۴ میلی‌گرم در لیتر 2,4 D تولید گیاهچه نماید لذا از آوردن جدول‌های مربوط به آن خودداری کردیم)  
\* حروف کوچک به تفاوت معنی‌دار بین محیط‌های کشت اشاره دارد.



موثر بوده [۲۰] و در ترکیب با NAA نتیجه بهتری در شاخه‌زایی دارد [۱۴] در این آزمایش اهمیت کمتری داشت. شاید یکی از دلایل آن، این باشد که در تولید گیاهچه از طریق آرئول، خواب جوانه باید شکسته شود و برای آن ترکیبی از اکسین و جیبرلین و سیتوکینین مورد نیاز است که اکسین و جیبرلین باید غلظت بالاتری داشته باشند. دنیس توماس و پوتور (۲۰۰۴) در باززایی گیاه کیگلیا پیناتا برای شکسته شدن خواب جوانه غلظت پایینی از ترکیب NAA و BAP را معرفی کردند که این دو هورمون همین تأثیر را بر گیاه ما داشتند. نتایج کار در آزمایش اثر محیط کشت بر قابلیت ریشه‌زایی، با گزارش‌های موجود از نتایج دربو و محمد عظیمی در ریزازدیادی کاکتوس هلیوسرئوس [۷] همسویی نشان می‌دهد. آنها با کاربرد مواد دیگری از جمله IBA موفق به ریشه‌زایی شدند. احتمالاً دلایل ریشه‌زایی بهتر وارپته شاخه نباتی نسبت به هفت پر در درجه اول ژنتیک، دوم وارپته و نهایتاً نوع محیط کشت است.

## تشکر و قدردانی

از کلیه همکاران عزیز به خصوص مسئول محترم پژوهشکده بیوتکنولوژی اصفهان جناب آقای دکتر خیام که امکانات انجام این تحقیق را فراهم نمودند تقدیر و تشکر می‌شود.

مشاهده شد و این نتیجه با گزارش استین هارت (۱۹۶۲) در کشت درون شیشه‌ای کاکتوس تریکوسرئوس نزدیک بود [۱۶]. با توجه به نتایج به دست آمده در این بررسی ملاحظه شد ترکیب هورمونی که بیشترین اثر را در تولید این نوع پینه داشت با کمی افزایش غلظت، تأثیرش کاهش یافت. این گزارش با نتایج سایر پژوهشگران مانند سسیلیا (۲۰۰۲) و دبی شاپ (۱۹۹۵) در کشت بافت آپونتیا متفاوت بود [۵،۹]. نتایج به دست آمده از آزمایش اثر محیط کشت بر باززایی از آرئول و تولید گیاهچه با گزارش‌های موجود در مورد پینه‌زایی دی‌الیویرا و همکاران (۱۹۹۵) در کشت درون شیشه‌ای سرئوس پرویانوس مطابقت داشت. آنها مقادیر ۱۰ تا ۲۰ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D را مورد استفاده قرار دادند و بهترین محیط پینه‌زایی و شاخه‌زایی را به ترتیب ۴ و ۶ میلی‌گرم در لیتر کابنتین و ۴ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D به همراه ۱۵ درصد شیر نارگیل گزارش نمودند. شیر نارگیل معمولاً برای برخی از گونه‌ها استفاده می‌شود، اما بسته به میزان آب موجود در بافت ریزنمونه سبب ترشح مواد فنلی در محیط کشت و نیاز به واکنش بیشتر آنها می‌شود [۴،۱۷]. استین هارت (۱۹۶۲) بهترین مقدار شیر نارگیل را ۱۰ درصد گزارش کرد [۱۶]. در این آزمایش مشاهده شد که اکثر ریزنمونه‌هایی که از قسمت میانی و مریستمی گیاه سرئوس پرویانوس گرفته شده بودند تولید گیاهچه نمودند که این مسأله احتمالاً به جوان‌تر بودن سلول‌ها مربوط می‌شود. هر چند که چایری الساندر<sup>۱</sup> و همکاران (۲۰۰۲) در کشت درون شیشه‌ای برخی گیاهان زینتی کمترین میزان پینه و باززایی را از ریزنمونه‌های مریستم انتهایی مشاهده کردند [۱۸]. چایری الساندر بیان داشت که این مسأله می‌تواند ژنتیکی باشد به طوری که در برخی گیاهان مریستم‌های انتهایی بیشترین و در برخی کمترین پینه‌زایی را دارند. به نظر می‌رسد هر چه قدرت شاخه‌زایی هورمون کمتر باشد در باززایی از آرئول مهم‌تر است. مثلاً در این رابطه اثر BAP که قدرت شاخه‌زایی کمتری نسبت به TDZ دارد [۱۵] به مراتب قوی‌تر است، TDZ که علاوه بر تنظیم سطح اکسین درونی گیاه [۱۹] در تغییر سطح انرژی سلول و تحریک مواد مغذی

<sup>1</sup> Chiari Alsander



1. Ghasemi M, Kafi M. Science and Practical Floriculture. first edition, Golbon Publications. Esfahan, Iran. 1384, pp: 284 - 306.
2. Da Silva Assis Machado FAP, Capelasso M, De Oliveira A, Goncalves RAC, Motina Zamuner ML, Amaresida Mangolin C, De Fatima PS, Machado M. Fatty Acids Production from Plants and Callus Cultures of *Cereus peruvianus* Mill. (Cactaceae). *J. Plant Sci.* 2006; 1: 368 - 73.
3. De Oliveira AJ, Machado MF. Alkaloid production by callous tissue cultures of *Cereus peruvianus* (cactaceae). *J. Applied Biochem. and Biotechnol. (Appl. Biochem).* 2003; 104: 149 - 55.
4. De Oliveira S.A, Pires F, Da Silva Machado M, Jose Prioli A, Mangolin C. A. *In vitro* propagation of *Cereus peruvianus* Mill. (Cactaceae), *J. In vitro Cell Dev. Biol.* 1994: 94 - 8.
5. Cecilia Juarez M and Bernardo Passere C. *In vitro* propagation of *opuntia ellisiana* Griff. and a acclimatization *ellisiana* Griff. and acclimatization to field conditions. *J. Biocell (Mendoza).* 2002; 26: 1 - 18.
6. Sagastume Tecnoregion H. Propagation in vitro cactus cabeza (*pilocereus maxonii*). *J. Biotecnologia (ICTA).* 2006, pp: 23 - 4.
7. Drew RA, Azimi M. Micropropagation of Red Pitaya (*Hylocereus undatus*). *J. Acta Horticulture* 2000, 575.
8. Yasseen M.Y. Micropropagation of pitaya (*Hylocereus undatus* britton et Rose). *J. In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant.* 2002; 38: 427 - 9.
9. D. Bishop V. Optimization of Tissue culture in *Opuntia*. University of Texas at Austin. 1995, pp: 1 - 51. Tesis.
10. Perez molphe E, Perezreyes martha E, Davilafelgueroa CA, Villalobus Amador E. *In vitro* propagation of three species of columnar cacti from the Sonoran desert. *J. Hortscience.* 2002; 37: 693 - 6.
11. Mata rosas M, Monroy De.L.M.A, Moebius goldammer K, Chavezavila VM. Micropropagation of *Turbinicarpus laui* glasset foster, an endemic and endangered species. *J. In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant.* 2001; 37: 400 - 4.
12. Wyka T, Hamerska M, Wróblewska M. Organogenesis of vegetative shoots from *in vitro* cultured flower buds of *Mammillaria albicoma* (Cactaceae). *J. Plant cell, Tissue and Organ Culture.* 2006; 87: 27 - 32.
13. Larkin P, Scowcroft WR. Somaclonal variation a novel source of variability from cell culture for plant improvement. *J. Apple, Genet.* 1981; 60: 197 - 214.
14. Dennis Thomas T, Puthur JT. Thidiazuron induced high frequency shoot organogenesis in callus from *Kigelia pinnata* L. *J. Bot. Bull. Acad. Sin.* 2004; 45: 307 - 13.
15. Barna KS, Wakhlu AK. Effect of thidiazuron on micropropagation of rose. *J. In vitro Cell. Dev. Biol. Plant.* 1995; 31: 44 - 5.
16. Steinhart CE. Tissue culture of a cactus. *J. Science.* 1962; 137: 545 - 6.
17. Dixon RA. Isolation and maintenance of callus and cell suspension culture. *J. Plant cell culture.* 1985, pp: 1 - 20.
18. Chiari A and Bridgen MP. Meristem culture and virus eradication in *Alstroemeria*. *J. Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 2002; 68: 49 - 55.
19. Murthy BNS, Murch SJ, Saxena PK. Thidiazuron: A potent regulator of *in vitro* plant morphogenesis. *J. Biomedical and Life.* 1998; 34: 267 - 75.
20. Hutchinson MJ, Saxena PK. Acetylsalicylic acid enhances and synchronizes thidiazuron induced somatic embryogenesis in geranium (*Pelargonium × hortorum* Bailey) tissue culture. *J. Plant Cell Rep.* 1996; 15: 512 - 5.

