بسم الله الرحمن الرحيم

دانشکده کشاورزی

گروه باغبانی

پایان‌نامه کارشناسی ارشد

بررسی اثر هورمون‌های اکسینی و اگروباکتریوم رایزوژنز بر ریشه‌زایی قلمه‌های سرخدار(*Taxus baccata*)

الهام فراحی قصر ابونصر

اساتید راهنما:

دکتر مهدی رضایی

دکتر حسن خوش قلب

استاد مشاور:

دکتر مجتبی ممرآبادی

مهندس حسن قربانی قوژدی

شهریور۱۳۹۳

پیوست ۲

تقدیم نامه

ماحصل آموخته هایم را تقدیم می کنم به آنان که مهر آسمانی شان آرام بخش آلام زمینی ام است

به استوارترین تکیه گاهم ، دستان پرمهر پدرم

به سبزترین نگاه زندگیم ، چشمان سبز مادرم

که هرچه آموختم در مکتب عشق شما آموختم و هرچه بکوشم قطره ای از دریای بی کران مهربانیتان را سپاس نتوانم بگویم.

امروز هستی ام به امید شماست و فردا کلید باغ بهشتم رضای شما را آوردی گران سنگ تر از این ارزان نداشتم تا به خاک پایتان نثار کنم ، باشد که حاصل تلاشم نسیم گونه غبار خستگیتان را بزداید.

بوسه بر دستان پرمهرتان

قدردانی

خدایا، به من توفیق تلاش، در شکست؛ صبر، در نومیدی؛ رفتن، بی همراه؛ جهاد، بی سلاح؛ کار، بی پاداش؛ فداکاری، در سکوت؛ دین، بی دنیا؛ مذهب، بی عوام؛ عظمت، بی نام؛ خدمت، بی نان؛ ایمان، بی ریا؛ خوبی، بی نمود؛ گستاخی، بی خامی؛ مناعت، بی غرور؛ عشق، بی هوس؛ تنهایی، در انبوه جمعیت؛ دوست داشتن، بی آنکه دوست بداند؛ روزی کن.

باسپاس فراوان از اساتید محترم دکتر مهدی رضایی، دکتر حسن خوش قلب و اساتید مشاور محترم دکتر مجتبی ممرآبادی و مهندس حسن قربانی قوژدی همچنین سرکار خانم دکتر پارسا که با راهنمایی و کمک های بی دریغشان مرا در انجام این پایان نامه راهنمایی نمودند.

با تشکر از دوستان گرامی

مسئولین آزمایشگاه آقای مهندس محمد ابراهیم حسین پور، خانم مهندس سمیه فرجی و آقای علی حسین پور (مسئول گلخانه) دیگر عزیزانی که مرا در انجام این پایان نامه یاری نمودند تشکر و قدردانی می نمایم.

تعهدنامه

اینجانب **الهام فراحی قصر ابونصر** دانشجوی دوره کارشناسی ارشد رشته مهندسی کشاورزی- باغبانی دانشکده مهندسی کشاورزی دانشگاه شاهرود نویسنده پایان نامه **بررسی اثر هورمون‌های اکسینی و اگروباکتریوم رایزوژنز بر ریشه‌زایی قلمه‌های سرخدار(*Taxus baccata*)** تحت راهنمایی دکتر مهدی رضایی و دکتر حسن خوش قلب متعهد می‌شوم.

- تحقیقات در این پایان نامه توسط اینجانب انجام شده است و از صحت و اصالت برخوردار است.
- در استفاده از نتایج پژوهشهای محققان دیگر به مرجع مورد استفاده استناد شده است.
- مطالب مندرج در پایان نامه تاکنون توسط خود یا فرد دیگری برای دریافت هیچ نوع مدرک یا امتیازی در هیچ جا ارائه نشده است.
- کلیه حقوق معنوی این اثر متعلق به دانشگاه صنعتی شاهرود می‌باشد و مقالات مستخرج با نام « دانشگاه صنعتی شاهرود » و یا « Shahrood University of Technology » به چاپ خواهد رسید.
- حقوق معنوی تمام افرادی که در به دست آمدن نتایج اصلی پایان نامه تأثیرگذار بوده اند در مقالات مستخرج از پایان نامه رعایت می گردد.
- در کلیه مراحل انجام این پایان نامه ، در مواردی که از موجود زنده (یا بافتهای آنها) استفاده شده است ضوابط و اصول اخلاقی رعایت شده است.

تاریخ

امضای دانشجو

مالکیت نتایج و حق نشر

- کلیه حقوق معنوی این اثر و محصولات آن (مقالات مستخرج، کتاب، برنامه های رایانه ای، نرم افزار ها و تجهیزات ساخته شده است) متعلق به دانشگاه صنعتی شاهرود می باشد. این مطلب باید به نحو مقتضی در تولیدات علمی مربوطه ذکر شود.
- استفاده از اطلاعات و نتایج موجود در پایان نامه بدون ذکر مرجع مجاز نمی باشد.

چکیده

به منظور بررسی اثر باکتری اگروباکتریوم رایزوژنز و هورمون‌های اکسینی ایندول بوتریک اسید و نفتالین استیک اسید روی ریشه‌زایی قلمه‌های سخت ریشه‌زای سرخدار، آزمایشی گلخانه‌ای روی قلمه‌های این گیاه انجام شد. قلمه‌های ۱۵-۲۰ سانتی‌متری تیمار شده این گیاه به بستر کشتی شامل ۱/۲ پیت و ۱/۲ پرلایت منتقل شده و در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد و دمای بستر کشت ۱۵-۲۰ درجه سانتی گراد نگهداری شدند. تیمارها شامل استرین‌های $C_{58}C_2$, LB_{9402}, A_4 و هورمون‌های اکسینی نفتالین استیک اسید و ایندول بوتریک اسید در غلظت‌های ۰، ۵۰۰ و ۲۵۰۰ پی‌پی‌ام از نفتالین استیک اسید و ۰ ،۲۵۰۰، ۵۰۰ و۵۰۰۰ پی‌پی‌ام از ایندول بوتریک اسید بود. نتایج این پژوهش نشان داد استرین‌های A_4 و LB_{9402} و تیمار هورمونی نفتالین استیک اسید تاثیر معنی‌داری در درصد ریشه‌زایی و درصد کالوس‌زایی کل و تعداد ریشه و تعداد ریشه‌های فرعی قلمه‌ها داشتند. تیمار هورمونی ایندول بوتریک اسید نیز افزایشی معنی‌دار در درصد ریشه‌زایی ، تعداد ریشه ، تعداد ریشه‌های فرعی ، متوسط طول ریشه و بلندی ارتفاع ریشه نشان داد. کاربرد استرین‌های اگروباکتریوم رایزوژنز در حضور هورمون ایندول بوتریک اسید باعث افزایش در درصد ریشه‌زایی و درصد کالوس‌زایی کل و تعداد ریشه و متوسط طول ریشه و بلندی ارتفاع ریشه شدند. در تیمار استرین باکتری به همراه هورمون نفتالین استیک اسید، درصد ریشه‌زایی و درصد کالوس‌زایی کل، تعداد ریشه‌های فرعی و متوسط طول ریشه و بلندی ارتفاع ریشه افزایش معنی‌داری داشتند. استفاده همزمان هورمون‌های نفتالین استیک اسید و ایندول بوتریک اسید باعث افزایش معنی‌داری در درصد ریشه‌زایی و درصد کالوس‌زایی کل، تعداد ریشه‌های فرعی و متوسط طول ریشه و بلندی ارتفاع ریشه و تعداد ریشه داشتند. در اثرات سه‌گانه (استرین‌های اگروباکتریوم رایزوژنز و هورمون‌های نفتالین استیک اسید و ایندول بوتریک اسید) تنها در درصد ریشه‌زایی و درصد کالوس‌زایی کل افزایش معنی‌داری مشاهده گردید. بیشترین درصد ریشه‌زایی به میزان ۹۰/۶۶٪ و درصد کالوس‌زایی از تیمار استرین A_4 در حضور هر دو هورمون ایندول بوتریک اسید و نفتالین استیک اسید به‌ترتیب با غلظت‌های ۵۰۰۰ و

۲۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر به‌دست آمد. استرین LB_{9402} نیز در حضور غلظت‌های مذکور دو هورمون ایندول بوتریک اسید و نفتالین استیک اسید با درصد ریشه‌زایی ۸۷/۵٪ و درصد کالوس‌زایی بالایی تاثیر چشمگیری روی ریشه‌زایی و کالوس‌زایی قلمه‌ها نشان داد.

کلمات کلیدی: سرخدار، اگروباکتریوم رایزوژنز، تنظیم‌کننده‌های رشد (IBA، NAA)، ریشه‌زایی و کالوس‌زایی قلمه

فهرست:

فصل اول: **مقدمه و کلیات**

۱- مقدمه و کلیات ۲

۱-۱ معرفی درخت سرخدار ۳

۱-۲ ویژگی‌های ظاهری سرخدار(*Taxus baccata*)..... ۴

۱-۳ تقاضای اکولوژیکی ۶

۱-۴ دلایل انقراض سرخدار در ایران و جهان ۶

۱-۵ جنگل های شمال کشور و روند تخریب آنها ۸

۱-۶ تکثیر سرخدار ۹

۱-۷ موارد استفاده از سرخدار ۱۰

۱-۷-۱ سرخدار به‌عنوان یک درخت جنگی ۱۰

۱-۷-۲ فضای سبز ۱۱

۱-۷-۳ استفاده های دارویی ۱۱

۱-۷-۴ مقاومت در مقابل آلوده کننده‌ها ۱۲

۱-۷-۵ سرخدار در ایران ۱۲

۱-۸ اگروباکتریوم رایزوژنز ۱۳

۱-۸-۱ ساختار و عملکرد Ri پلاسمید..... ۱۴

۱-۸-۲ توالی نوکلئوتیدی Ri plasmid..... ۱۵

۱-۸-۳ ساختار Ri پلاسمید..... ۱۵

۱-۸-۴ آنالیز مولکولی و ژنتیکی پلاسمید القا ریشه(Ri) اگروباکتریوم رایزوژنز ۱۵

۱-۸-۵ مکانیسم عملکرد سلول گیاهی و اگروباکتریوم رایزوژنز..... ۱۶

۱-۹ اکسین ۱۷

فصل دوم : **بررسی منابع**

۲- مروری بر پژوهش های گذشته ۲۰

فصل سوم : **مواد و روش ها**

۳- مواد و روش ها..... ۳۶

۳-۱ سال و خصوصیات محل آزمایش..... ۳۶

۳-۲ طرح آزمایش ۳۶

۳-۳ مواد گیاهی(آماده سازی قلمه‌ها) ۳۶

۳-۴ استرین‌های باکتری..... ۳۷

۳-۵ هورمون‌های اکسین..... ۳۸

۳-۶ تیمار کردن قلمه‌ها ۳۸

۳-۷ نحوه تیمار کردن قلمه با غلظت‌های مختلف هورمون‌های اکسینی ۳۸
۳-۸ نحوه آلوده کردن ریزنمونه‌ها توسط باکتری جهت القای ریشه مویین ۳۹
۳-۹ شرایط نگهداری قلمه‌های سرخدار ۳۹
۳-۱۰ نمونه‌برداری ۳۹
۳-۱۱ صفات مورد اندازه‌گیری ۴۰

فصل جهارم : **نتایج وبحث**

۴- نتایج ۴۴
۴-۱ درصد کالوس‌زایی کل ۴۴
۴-۲ درصد ریشه‌زایی ۵۰
۴-۳ تعداد ریشه ۵۴
۴-۴ متوسط طول ریشه ۵۷
۴-۵ بلندترین طول ریشه ۶۱
۴-۶ تعداد ریشه فرعی ۶۵
۴-۷ بحث ۶۸
۴-۸ نتیجه‌گیری کلی ۷۱
۴- ۹پیشنهادات ۷۴

فصل پنجم : **منابع**

۵- منابع ۷۶

پیوست ها

فهرست اشکال:

شکل ۱-۱ گل آذین نر و میوه درخت ماده، چوب درخت سرخدار(: a= دانه، b= آریل، ♀= درخت ماده، ♂= درخت نر)..... ۶
شکل ۱-۲ تنه جوش های درخت سرخدار..... ۱۰
شکل ۱-۳ ساختار Ri plasmid ۱۶
شکل ۱-۴ انتقال T.DNA اگروباکتریوم رایزوژنز به سلول گیاهی..... ۱۷
شکل ۳-۱ بستر کشت قلمه‌های سرخدار(تیمار استرین A4 و غلظت‌های مختلف هورمون‌های NAA و IBA)..... ۴۱
شکل ۴-۱ کالوس های قلمه‌های سرخدار در اثر تیمار با استرین A_4 و هورمون IBA در هفته چهارم کشت در بستر ریشه‌زایی ۴۷
شکل ۴-۲ تاثیراسترین‌های باکتری اگروباکتریوم رایزوژنز بر درصد کالوس‌زایی قلمه‌های سرخدار ۴۷
شکل ۴-۳ تاثیر غلظت‌های مختلف هورمون NAA (میلی‌گرم در لیتر) بر درصد کالوس‌زایی قلمه‌های سرخدار ۴۸
شکل ۴-۴ تاثیر غلظت‌های مختلف IBA(میلی‌گرم در لیتر) بر درصد کالوس‌زایی قلمه‌های سرخدار ۴۸
شکل ۴-۵ تاثیر استرین‌های باکتری اگروباکتریوم رایزوژنز و غلظت‌های مختلف IBA (میلی‌گرم در لیتر) بر درصد کالوس‌زایی قلمه‌های سرخدار..... ۴۸
شکل ۴-۶ تاثیر غلظت‌های مختلف هورمون‌های NAA و IBA (میلی‌گرم در لیتر) بر درصد کالوس‌زایی قلمه‌های سرخدار..... ۴۹
شکل ۴-۸ تاثیر استرین‌های باکتری اگروباکتریوم رایزوژنز بر میانگین درصد ریشه‌زایی قلمه‌های سرخدار ۵۲
شکل ۴-۹ تاثیر غلظت‌های مختلف هورمون NAA (میلی‌گرم در لیتر) بر میانگین درصد ریشه‌زایی قلمه‌های سرخدار ۵۲
شکل ۴-۱۰ تاثیر غلظت‌های مختلف IBA (میلی‌گرم در لیتر) بر میانگین درصد ریشه‌زایی قلمه‌های سرخدار ۵۲
شکل ۴-۱۱ تاثیر استرین‌های باکتری اگروباکتریوم رایزوژنزو غلظت‌های مختلف IBA(میلی‌گرم در لیتر) بر میانگین درصد ریشه‌زایی قلمه‌های سرخدار..... ۵۳
شکل ۴-۱۲ تاثیر غلظت‌های مختلف هورمون‌های NAA و IBA (میلی‌گرم در لیتر) بر میانگین درصد ریشه‌زایی قلمه‌های سرخدار ۵۳
شکل ۴-۱۴ قلمه‌های تیمار شده با استرین باکتری(سمت راست)، قلمه‌های تیمار شده با هورمون‌های NAA و IBA (سمت چپ)..... ۵۵
شکل ۴-۱۵ تاثیر استرین‌های باکتری اگروباکتریوم رایزوژنز بر تعداد ریشه قلمه‌های سرخدار ۵۶
شکل ۴-۱۶ تاثیر غلظت‌های مختلف هورمون NAA (میلی‌گرم در لیتر) بر تعداد ریشه قلمه‌های سرخدار ۵۶
شکل ۴-۱۷ تاثیر غلظت‌های مختلف هورمون IBA (میلی‌گرم در لیتر) بر تعداد ریشه قلمه‌های سرخدار..... ۵۶
شکل ۴-۱۸ تاثیر استرین‌های باکتری اگروباکتریوم رایزوژنز و غلظت‌های مختلف هورمون NAA (میلی‌گرم در لیتر) بر تعداد ریشه قلمه‌های سرخدار..... ۵۷
شکل ۴-۱۹ تاثیر غلظت‌های مختلف هورمون‌های NAA و IBA (میلی‌گرم در لیتر) بر تعداد ریشه قلمه‌های سرخدار ۵۷
شکل ۴-۲۰ متوسط طول ریشه قلمه‌های تیمار شده یا استرین باکتری (سمت راست)، قلمه‌های تیمار شده با هورمون‌های NAA و IBA (سمت چپ) ۵۹
شکل ۴-۲۱ تاثیر استرین‌های باکتری اگروباکتریوم رایزوژنز بر متوسط طول ریشه قلمه‌های سرخدار ۵۹
شکل ۴-۲۲ تاثیر غلظت‌های مختلف هورمون NAA (میلی‌گرم در لیتر) بر متوسط طول ریشه قلمه‌های سرخدار... ۶۰

شکل ۴-۲۳ تاثیر غلظت‌های مختلف هورمون IBA (میلی‌گرم در لیتر) بر متوسط طول ریشه قلمه‌های سرخدار ۶۰
شکل ۴-۲۴ تاثیر استرین‌های باکتری اگروباکتریوم رایزوژنزو غلظت‌های مختلف هورمون NAA (میلی‌گرم در لیتر) بر متوسط طول ریشه قلمه‌های سرخدار..... ۶۰
شکل ۴-۲۵ تاثیر استرین‌های باکتری اگروباکتریوم رایزوژنز و غلظت‌های مختلف هورمون IBA (میلی‌گرم در لیتر) بر متوسط طول ریشه قلمه‌های سرخدار..... ۶۱
شکل ۴-۲۶ تاثیر غلظت‌های مختلف هورمون‌های NAA و IBA(میلی‌گرم در لیتر) بر متوسط طول ریشه قلمه‌های سرخدار..... ۶۱
شکل ۴-۲۷ طول ریشه‌های تیمار شده با استرین باکتری (LB_{9402}) و هورمون IBA..... ۶۳
شکل ۴-۲۸ طول ریشه‌های تیمار شده با هورمون‌های NAA و IBA ۶۳
شکل ۴-۲۹ تاثیر استرین‌های باکتری اگروباکتریوم رایزوژنز بر افزایش طول ریشه قلمه‌های سرخدار..... ۶۴
شکل ۴-۳۰ تاثیر غلظت‌های مختلف هورمون NAA(میلی‌گرم در لیتر) بر افزایش طول ریشه قلمه‌های سرخدار ۶۴
شکل ۴-۳۱ تاثیر غلظت‌های مختلف هورمون IBA (میلی‌گرم در لیتر) بر افزایش طول ریشه قلمه‌های سرخدار ... ۶۴
شکل ۴-۳۲ تاثیر استرین‌های باکتری اگروباکتریوم رایزوژنزو غلظت‌های مختلف هورمون NAA(میلی‌گرم در لیتر) بر افزایش طول ریشه قلمه‌های سرخدار ۶۵
شکل ۴-۳۴ ریشه‌های فرعی ساقه های تیمار شده با هورمون‌های NAA و IBA (شکل راست) و ساقه های تیمار شده با باکتری (شکل چپ) ۶۶
شکل ۴-۳۵ تاثیراسترین‌های باکتری اگروباکتریوم رایزوژنز بر تعداد ریشه فرعی قلمه‌های سرخدار ۶۷
شکل ۴-۳۶ تاثیرغلظت‌های مختلف هورمون IBA (میلی‌گرم در لیتر) بر تعداد ریشه فرعی قلمه‌های سرخدار ۶۷
شکل ۴-۳۷ تاثیر استرین‌های باکتری اگروباکتریوم رایزوژنزو غلظت‌های مختلف IBA (میلی‌گرم در لیتر) بر تعداد ریشه فرعی قلمه‌های سرخدار..... ۶۷
شکل ۴-۳۸ ظهور برگچه های جدید روی قلمه‌های سرخدار پس از ۴۰ روز ۷۲
شکل ۴-۳۹ ریشه‌های رشد کرده قلمه‌ها در بستر شن(سمت چپ) و ظهور برگچه‌های جدید یک ماه پس از ریشه‌دار شدن قلمه‌ها(سمت راست) ۷۳

فهرست جدول:

جدول ۴-۱ تجزیه واریانس اثر تیمارهای مختلف استرین‌های اگروباکتریوم رایزوژنز و غلظت‌های مختلف هورمون‌های NAA و IBA ۴۴

فصل اول:

مقدمه و کلیات

۱ مقدمه و کلیات

سرخدار با نام علمی *Taxus baccata* از درختان سوزنی‌برگ همیشه‌سبز و متعلق به تیره *Taxaceae* گیاهی زینتی-دارویی است. از این گیاه در صنعت دارویی و فضای سبز استفاده زیادی می‌شود. از آنجایی‌که این گیاه در مقابل سولفور دی اکسید و هیدروژن فلوراید مقاوم‌اند و در مقابل هیدروژن سولفورید حساس هستند، لذا به‌عنوان یک گیاه مقاوم به آلودگی در خیابان‌ها و پارک‌ها و در جوار بعضی کارخانجات دودزا مخصوصا کارخانجات مس آن را کشت می‌کنند. از برگ و پوست سرخدار ماده تاکسول[1] به‌دست می‌آورند که در درمان سرطان از آن استفاده می‌شود. حتی در ژاپن از دم‌کرده برگ آن برای درمان مرض قند استفاده می‌کنند و مصرف فراورده‌های آن برای رفع رماتیسم مناسب است. از آریل میوه آن برای تهیه شربت ژله که به عنوان نرم کننده ملین، رفع سیاه سرفه و... استفاده می‌شود. به دلیل قطع بی‌رویه و بهره‌برداری غیر علمی و نقصان توان رشد و زادآوری این گونه ارزشمند در صدد انقراض می‌باشد که در حال حاضر جهت حفظ این گونه جزو درختان حفاظت شده محسوب می‌شود (مصدق، ۱۳۸۳).

سرخدار گونه‌ای سایه‌پسند، عموما دو پایه با رشد سالیانه بسیار کند و دارای دیرزیستی بسیار طولانی (بیش از ۳۰۰ سال) می‌باشد. این گونه گیاهی میراث زنده دنیا و جنگل‌های شمال ایران و از نظر تنوع زیستی و بوم‌شناسی، منحصر به فرد و بومی منطقه هیرکانی و باقی‌مانده از دوران سوم زمین شناسی است. درخت سرخدار رطوبت دوست است و رطوبت خاک و هوا را دوست دارد و در ارتفاعات می‌روید. به‌طور معمول زادآوری طبیعی در توده‌های آن ضعیف بوده و به‌ندرت دیده می‌شود. رشد طولی سالیانه سرخدار حدود ۱۰ سانتی‌متر و رشد قطری آن حدود ۰/۶ میلی‌متر گزارش شده است. تکثیر سرخدار به‌طور طبیعی با مشکلات زیادی همراه بوده و در جنگل‌های شمال ایران در مرحله اوج

[1]-Taxsol

کلیماکس[1] خود بوده، لیکن زادآوری در آن بسیار اندک است. کارهای انجام شده در این زمینه بسیار کم است (لسانی و همکاران، ۱۳۶۴).

کاربرد خارجی هورمون‌های اکسینی برای ریشه‌زایی قلمه‌های بسیاری از گیاهان سخت ریشه زا استفاده می‌شود. اخیرا از نژادهای اگروباکتریوم استفاده می‌شود که نوعی انتقال ژن در گیاه رخ داده و گیاه را تحریک به ریشه‌دهی می‌کند. القاء ریشه‌های نابجا با هورمون‌های ریشه‌زایی و نژادهای مختلف اگروباکتریوم رایزوژنز[2] به‌صورت جداگانه یا ترکیب با هم روشی جدید است که برای تشکیل ریشه‌های نابجا و افزایش درصد ریشه‌زایی در گیاهان سخت ریشه‌زا استفاده می‌شود.

هدف از این تحقیق به‌دست آوردن راهی علمی و عملی برای تکثیر و تولید نهال سرخدار جهت احیا جنگل‌ها و استفاده آن در فضای سبز و بهره‌برداری دارویی می‌باشد. از آن‌جا که قلمه‌زنی یکی از رایج‌ترین و ارزان‌ترین روش ازدیاد گیاهان از قدیم تاکنون بوده است، قلمه به‌عنوان بهترین و ارزان‌ترین راه جهت ازدیاد سرخدار انتخاب گردید. به‌همین منظور در این پژوهش اثر استرین‌های اگروباکتریوم رایزوژنز(A_4 , LB_{9402} ,$C_{58}C_2$) و دو هورمون اکسین ایندول بوتریک اسید در غلظت‌های ۰، ۵۰۰، ۲۵۰۰ و۵۰۰۰ پی‌پی‌ام و نفتالین استیک اسید در غلظت‌های ۰، ۵۰۰ و ۲۵۰۰ پی‌پی‌ام به‌صورت ساده و ترکیبی بر ریشه‌زایی قلمه‌های سرخدار مورد بررسی قرار گرفت.

۱-۱ معرفی درخت سرخدار

مطالعات فسیل‌شناسی نشان می‌دهد که قدمت درختان سرخدار بالغ بر ۱۹۰ میلیون سال است و در نیمکره شمالی تا عرض جغرافیایی ۶۱ درجه شمالی گسترده شده است. گونه سرخدار در جنگل‌های شمال ایران به‌صورت پراکنده و یا به‌صورت توده یک‌دست موجود می‌باشد. حتی در ایران

[1] کلیماکس در لغت به معنی قله و اوج است و جوامع کلیماکس واژه‌ای صرفا اکولوژیکی برای جمعیت‌های بیولوژیک از گیاهان و جانوران است که در طی پدیده توالی اکولوژیکی بوجود می‌آیند.

[2] *Agrobacterium rizhogenes*

درخت ۱۰۰۰ ساله آن در روستای یخکش از توابع بهشهر مشاهده شده است. گونه‌ای سایه‌پسند می‌باشد و اغلب همراه گونه‌های راش[۱]، ممرز[۲]، نوئل[۳]و کاج[۴]هستند.

جامعه مشخص آن به‌نام اونینو_تاکسیتوم[۵]اسم‌گذاری شده است.

سرخدار معمولی یکی از شش سوزنی‌برگ بومی ایران است و از خانواده تاکزاسه[۶]و مربوط به دوران سوم زمین‌شناسی و از گونه‌های منحصر به فرد و مهم منطقه هیرکانی می‌باشد و از گونه‌هایی است که انتشار عمده آن در اروپای مرکزی است. جنس سرخدار دارای ۸ گونه می‌باشدکه مشخصات گیاه‌شناسی و اکولوژیکی آنها بسیار شبیه هم است. لذا به نظر عده‌ای از گیاه‌شناسان تمام گونه‌های آن فرم‌های مختلف جغرافیایی از یک گونه به نام تاکسوس باکاتا[۷] هستند. این جنس مختص نیمکره شمالی است و در سواحل اقیانوس آرام، آمریکای شمالی، مکزیک، اروپا، شمال آفریقا، غرب آسیا و شرق آسیا در جنگل‌های شمال ایران در ارتفاعات نسبتاً زیاد پراکنده هستند. در طرح جنگلداری سورخدار در علی‌آبادکتول آن را سوختال می‌نامیدند (عالمی و همکاران، ۱۳۹۲).

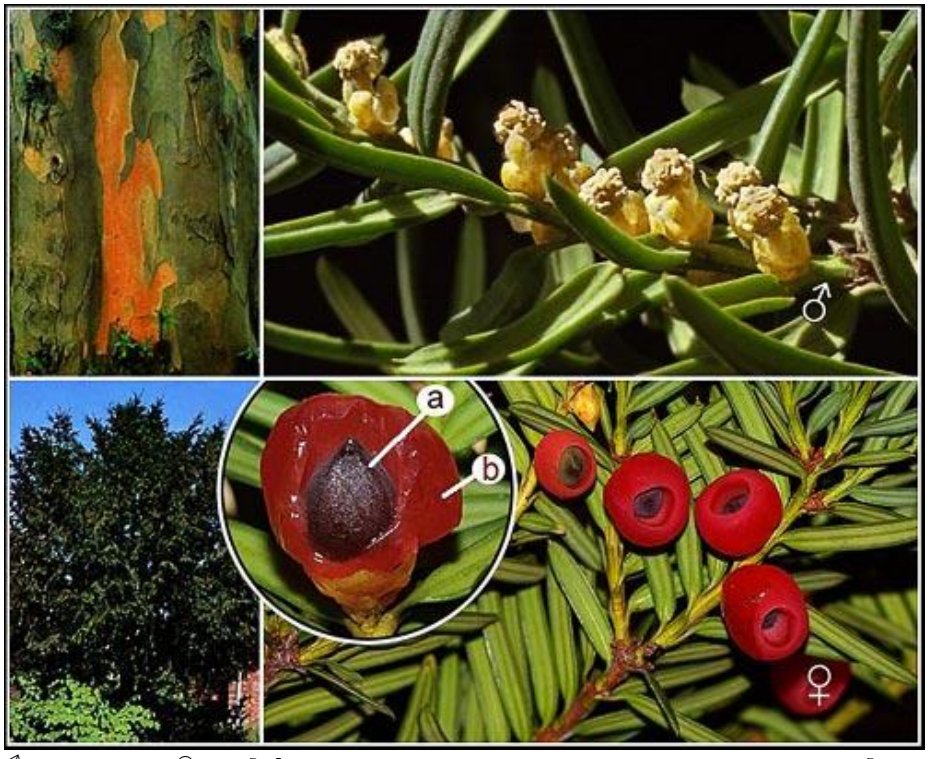
۱-۲ ویژگی‌های ظاهری سرخدار (*Taxus baccata*)

سرخدار به صورت درخت یا درختچه و گاهی بوته‌مانند است. پوست فلس‌دار به رنگ قهوه‌ای قرمز، تاج گسترده، شاخه‌های متناوب و نامنظم دارد. شاخه‌ها باریک، کوتاه و کمی‌آویزان و جوانه‌ها فلس‌دار هستند. برگ‌ها دائمی، متناوب و غالبا به‌صورت دو ردیف روی شاخه‌های افقی قرار دارند. آرایش برگ‌ها به‌صورت مارپیچی است. شکل برگ‌ها در سرخدار به‌صورت خطی و مسطح با دمبرگ کوتاه و تاب‌خورده است که در انتها به نوک بسیار کوتاهی ختم می‌شود. طول برگ‌ها ۱۲ تا ۳۰ میلی‌متر و عرض آن‌ها ۲ تا ۳ میلی‌متر است. برگ‌های این درخت دائمی و همیشه‌سبز است که در قسمت‌های پایینی درخشان و براق است. سرخدار معمولی درختی است به ارتفاع ۹ تا ۱۵متر و

[1]-*Fagus sylvatica*
[2]-*Carpinus betulus*
[3]- *Abies nordmaniana*
[4]-*Picea orientali*
[5]-Evonyno _Taxetum
[6]-*Taxaceae*
[7]-*Taxus baccata*

گاهی۲۴ متر و قطر تنه به ۱/۵متر می‌رسد. تاج گسترده و متمایل به کروی است. پوست تنه و شاخه یک‌ساله تقریبا سبز است.

گل‌ها در اواخر اسفند و فروردین‌ماه ظاهر می‌گردند . گل‌ها تک جنسی، فاقد کاسه و جام، دو پایه و به‌ندرت تک‌پایه و در طول محور ساقه قرار دارد. گل ماده به رنگ سبز متمایل به زرد و مرکب از تعدادی فلس‌های روی هم قرار گرفته است که فقط فلس‌های بالایی آن بارور است. گل‌آذین نر به‌طور منفرد و به‌صورت شاتون کروی مرکب از ۶ تا ۱۴پرچم و گل‌های ماده مثل جوانه‌های برگ است و فقط بوسیله رنگ زرد آن متمایز می‌شوند (شکل ۱-۱). گل‌های ماده مرکب فلس‌های متعددی دارند که به‌طور فشرده روی هم قرار گرفته اند. فلس انتهایی فقط حامل یک تخمک برافراشته است و در قاعده تخمک یک دیسک وجود دارد. میوه فقط دارای یک دانه تخم‌مرغی شکل و پوسته‌ای سخت و استخوانی است که در یک زایده آبدار به نام آریل محصور شده است و با دانه به هیچ‌وجه پیوستگی ندارد. قسمت بالای آن کاملا باز و هنگام رسیدن به رنگ قرمز درخشان درمی‌آید و دانه دارای آلبومن یکنواختی است (شکل ۱-۱). تمام اندام‌های سرخدار(ساقه، ریشه و برگ) سمی است فقط قسمت گوشتی میوه (آریل) سمی نیست که دارای کارتنوئیدی به نام گزانتوفیل می‌باشد که برای آشامیدنی‌ها و فرآورده‌های آرایشی و ... مصرف می‌شود. جست‌هایی از اطراف ریشه سرخدار بیرون می‌زند که این حالت کمتر در سوزنی برگان مشاهده می‌شود (ثابتی، ۱۳۸۷).



شکل ۱-۱ گل آذین نر و میوه درخت ماده، چوب درخت سرخدار(: a= دانه، b= آریل، ♀= درخت ماده، ♂= درخت نر)

۱-۳ تقاضای اکولوژیکی

سرخدار در اغلب خاک‌ها رشد می‌کند ولی در خاک‌های اسیدی بهتر می‌تواند رشد نماید. رشد آن در خاک‌های ضعیف و خشک خوب نیست. گونه ای سایه‌پسند است و به‌همین دلیل در داخل دره‌های نسبتا تاریک و مرطوب رشد می‌نماید. بیشتر در زیر اشکوب قرار می‌گیرد. در پارک‌ها و در جوار منازل آن‌را برای تزئین می‌کارند. سرمای سخت به آن آسیب می‌رساند. رطوبت هوا برای آن باید زیاد باشد. در مناطق کوهستانی آن‌را می‌توان پیدا کرد. گونه تاکسوس کاسپیداتا[1] که در ژاپن رشد می‌کند نسبت به سرما مقاوم است. دورگه آن *TX.Media*(*T.baccata*×*T.cuspidata*) به سرما مقاوم می‌باشد.

۱-۴ دلایل انقراض سرخدار در ایران و جهان

سال‌هاست که بسیاری از گونه‌های نادر جنگلی به علل مختلف از جمله سهل انگاری انسان‌ها در معرض انقراض قرار گرفته‌اند. این در حالی است که جنگل‌های ایران با وسعت بسیار زیاد یکی از

[1] *Taxus cuspidata*

کهنسال‌ترین جنگل‌های دنیا محسوب می‌شود. با وجود اهمیت و ارزش فراوان از منابع درختی غنی اتفاقی که در سال‌های اخیر در حال وقوع است اینکه به علت دخالت‌ها و سهل انگاری‌های انسانی، بیماری، تغییر شرایط آب و هوا و بهره برداری‌های بی‌رویه، به‌طور ناباورانه و غم‌انگیزی از وسعت جنگل‌های شمال کاسته شده و گونه‌های زیادی از درختان این منطقه و مناطق دیگر جنگلی در حال انقراض است.

درخت سرخدار یکی از گونه‌های نادر و زیبا در جهان است که در جنگل ابر شاهرود از نظر ارتفاع، قطر و وسعت در جهان بی‌نظیر است. اما مدتی است به‌علت ساخت جاده در جنگل ابرگونه نادر درخت سرخدار جنگل ابر در آستانه انقراض قرار دارد.

مهندس یوسف پور درباره این گونه می‌گوید: «یکی دیگر از علل انقراض سرخدار بعد از عوامل انسانی، بذر این درخت است. بذر درخت سرخدار برای سبز شدن و تبدیل شدن به نهال شرایط ویژه‌ای را می‌طلبد. این بذر باید دو سال در زیر خاک بماند تا سبز شود. در سال‌های گذشته این شرایط به‌راحتی مهیا بود، ولی امروز به عللی که عنوان شد این شرایط احیا نمی شود.

حضور دام در جنگل بنا به دلایل مستدل و علمی و بر پایه تحقیقات مجامع دانشگاهی از عوامل مؤثر در جلوگیری از تجدید حیات می‌باشد، زیرا با نظر اجمالی به سیمای جنگل‌های شمال کشور به این نتیجه می‌رسیم که به‌دلیل حضور دام و دامدار در عرصه‌های جنگلی سرشاخه‌های اکثر درختان قطع و تاج بری گردیده‌اند .

به‌دلیل فشردگی خاک جنگل در اثر برخورد با سم دام و تعلیف نهال‌های مستقر شده و حذف گونه‌های کیفی و جایگزینی گونه‌های نامرغوب از قبیل سرخس، آقطی و گزنه و تمشک و ... امکان تجدید حیات مجدد و رشد بذور به هیچ وجه امکان پذیر نمی‌باشد. بنا به دلایل مذکور وضعیت عمومی جنگلهای شمال کشور در مجموع از حالت طبیعی خارج و اکثریت سطح جنگل‌ها پوشیده از

درختان مسن می‌باشد. پشتوانه جنگل به‌دلیل عدم استقرار تجدید حیات جداً دچار مخاطره گردیده است

۱-۵ جنگل های شمال کشور و روند تخریب آنها

طبق گزارش FAO در سال ۱۹۶۰ میلادی، سطح جنگل‌های شمال ۳/۶ میلیون هکتار بوده است. عکس‌های هوایی انجام شده در سال ۱۳۳۷، مساحت جنگل‌های شمال را ۳/۴ میلیون هکتار نشان داده است. آماربرداری سال ۵-۱۳۶۴ از جنگل‌های خزری، کل این جنگل‌ها را ۱/۹ میلیون هکتار تعیین کرده که تنها ۲۲ درصد آن از جنگل انبوه با بیش از ۳۵۰ متر مکعب چوب در هکتار پوشیده شده است. بررسی‌های بیشتر نشان می‌دهد که تا یک قرن پیش این جنگل‌ها عمدتا بکر و دست نخورده بوده است. تازه‌ترین آمارها درباره وضعیت جنگل‌های شمال که توسط سازمان حفاظت محیط زیست انتشار یافته است (فروردین ۱۳۸۳) نشان می‌دهد که مساحت جنگل‌های شمال در طول دو دهه گذشته ۱۷ درصد کاهش یافته است. در این مدت استان‌های گلستان با ۲۷ درصد، گیلان ۲۲ درصد و مازندران با ۲۱ درصد کاهش جنگل رو به رو بوده است. بنابر اعلام سازمان حفاظت محیط زیست، عدم توجه به ارزش‌های زیست محیطی و تنوع زیستی، عدم ساماندهی صحیح مراکز جمعیت و مشاغل داخل و حاشیه جنگل، بهره‌برداری‌های مجاز ولی بی‌رویه، غیراصولی و کم زمان، بهره‌برداری‌های غیرمجاز و قاچاق، نبود هماهنگی و نظارت کافی در مدیریت و بهره‌برداری خارج از ضوابط زیست محیطی از معادن داخل جنگل ، جاده سازی بدون رعایت ملاحظات زیست محیطی (بیش از ۶ هزار کیلومتر)، واگذاری‌های بدون برنامه در داخل جنگل و تغییر کاربری اراضی جنگلی به دلیل بورس بازی و تبدیل ۱۰ هکتاری‌های حاشیه‌ی دریای خزر به شهرک و ... از عوامل کاهش مساحت جنگل‌های کشور است.

امروزه از جنگل‌هایی که روزگارانی جلگه‌های گیلان و طوالش به وسعت ۳۶۰ هزار هکتار را می‌پوشانده، اثری بر جای نمانده است و از جنگل‌های جلگه‌ای مازندران به جز مساحت اندکی که به‌صورت ذخیره گاه جنگلی، پارک جنگلی و اثر طبیعی ملی اداره می‌شود، بقیه به‌طور کامل از بین

رفته و به اراضی مزروعی، ساختمان‌ها و تاسیسات مسکونی و صنعتی و ... تبدیل شده است. جنگل‌های کوهستانی این مناطق نیز اکنون تحت شدیدترین فشارهای تخریبی قرار دارد. آمارهای سازمان جنگل‌ها و مراتع (۶۵-۶۴) حاکی از آن است که دام‌های محدوده جنگلی شمال کشور به حدود ۵/۷۹۷ هزار واحد دامی بالغ می‌شود و این در حالی است که بیش از ۴۳۷ هزار هکتار اراضی کشاورزی، حاصل از قطع درخت در دل جنگل وجود دارد و سالانه بیش از ۷۷ هزار هکتار دیگر تحت آیش است و مهم‌تر آن‌که میزان مصرف چوب برای هیزم حدود ۲/۸۷۶/۰۰۰ مترمکعب و برای ساختن اصطبل بیش از ۸۴ هزار متر مکعب است.

همچنین در سال های گذشته با وجود گسترش سطح کاشت درختان مختلف شیوه غلط بهره‌برداری از اراضی و جنگل‌ها موجب انهدام بخش وسیعی از پوشش گیاهی شده است. جنگل‌نشینان، روستاییان و عشایر به لحاظ شیوه معیشتی خود به منابع جنگلی وابسته‌اند و بسیاری از مایحتاج خود ازجمله سوخت را از این منبع تامین می‌کنند.

یکی دیگر از نمونه‌های بارز تخریب خاک ، استفاده از جنگل‌های تنک برای کشت غلات با انگیزه گسترش اراضی و در ادامه آن ، برداشتن موانع ادوات کشاورزی است . از این رو، قطع درختان باعث کاهش پوشش گیاهی، جاری شدن آب در سطح زمین و افزایش هدر رفتن خاک در اثر رواناب می‌شود.

آتش‌سوزی نیز به نابودی جنگل‌ها منجر می‌شود. انسان اصلی‌ترین عامل بروز آتش‌سوزی در جنگل است. آتش نه تنها باعث کاهش مساحت جنگل می‌شود، بلکه روی کرم‌ها و جمعیت‌های میکروبی درون خاک نیز تاثیر می‌گذارد.

۱-۶ تکثیر سرخدار

ازدیاد این درخت توسط بذر و قلمه صورت می‌گیرد. در تکثیر به‌وسیله قلمه بهترین زمان برای گرفتن قلمه اوایل پاییز و زمستان است که گیاه در خواب به‌سر می‌برد. بهترین اندازه برای قلمه‌ها

۷/۵-۱۰سانتی‌متر می‌باشد. اگر قلمه‌های گرفته شده دارای یک گره باشند ریشه‌دهی بهتر انجام می‌شود. بذر سرخدار توسط پرندگان از جمله قرقاول پخش می‌شود. سنجاب‌ها نیز به انتشار بذر سرخدار کمک می‌کنند. تنه درخت سرخدار ساقه جوش زیادی تولید می‌کند(شکل ۱-۲).

شکل ۱-۲ تنه جوش های درخت سرخدار

برای اینکه بذر آن بهتر جوانه بزند از ماده تترازولیوم[1]استفاده شده است. بذر را در محلول نیم درصد آن غوطه ور می‌نمایند.

۱-۷ موارد استفاده از سرخدار

۱-۷-۱ سرخدار به‌عنوان یک درخت جنگی

جنگل‌ها به‌طور کلی در توسعه اقتصادی کشورها دارای سه نقش عمده حفاظتی، زیبایی، بهداشتی و تولید دارند. جنگل یا طلای سبز از منابع بسیار مهم می‌باشد که از بزرگ‌ترین نعمت‌های خداوند و با ارزش‌ترین سرمایه‌های کشورهاست ، این نعمت‌های خدادادی نقش موثری در زندگی انسان‌ها دارند.

[1]-Tetrazolium

جنگل به کمک شاخ و برگ درختان از سرعت باد می‌کاهد و با ریشه‌ی گیاهان، خاک را حفظ می‌کند و مانع ایجاد فرسایش می‌شود.

تاج درختان و پوشش کف جنگل از شدت ضربات قطرات باران به‌طور مستقیم بر روی خاک جلوگیری نموده و آب باران به تدریج توسط ریشه‌های درختان و پوشش گیاهی با فرصت و زمان بیشتری در خاک نفوذ می کند که باعث جلوگیری از فرسایش خاک می‌شود .

جنگل‌ها نقش اساسی در تثبیت کربن بازی می‌کنند که آن‌ها را تبدیل به یک ابزار مهم در کاهش اثرات تغییرات اقلیمی می‌نماید.

جنگل‌ها و مراتع جزء منابع تجدید شونده می باشند که جایگاه بسیار مهمی در توسعه اقتصادی – اجتماعی و شرایط زیست محیطی هر منطقه دارند ، به‌طوری که در چهار چوب‌هایی که پیش بینی شده است شامل حفظ ، احیاء ، توسعه و بهره برداری بهینه و معقول که ضامن پایداری سرمایه طبیعی می‌باشد اجرا شود تا این گنجینه ی با ارزش و گران بها به نسل های آینده نیز انتقال یابد. یکی ازگونه‌های زیبای همیشه سبز جنگلهایمان درخت سرخدار است.

۱-۷-۲ فضای سبز

تاکسوس برویفولیا[1] به‌صورت زینتی اولین مرتبه در سال ۱۸۵۴ وتاکسوس کانادنسیس[2]در سال ۱۸۰۰ و تاکسوس کاپیدا[3] در سال ۱۸۵۵کاشته شده است.

۱-۷-۳ استفاده های دارویی

از برگ و پوست سرخدار ماده تاکسول[4] به‌دست می‌آورند که در درمان سرطان از آن استفاده می‌شود. کمپانی بزرگی در ایالت ارگون آمریکا به کشت آن در سطح وسیع اقدام کرده است که با دانشگاه برکلی همکاری می‌نماید. در ژاپن از دم کرده برگ آن برای درمان مرض قند استفاده می‌کنند و مصرف

[1] *Taxus Brevifolia*
[2]-*Taxus canadensis*
[3]-*Taxus cupida*
[4]-Taxsol

فرآورده‌های آن برای رفع رماتیسم مناسب است. از آریل آن برای تهیه شربت ژله که به عنوان نرم کننده، ملین و رفع سیاه سرفه و . . . استفاده می‌شود.

۱-۷-۴ مقاومت در مقابل آلوده کننده‌ها

سرخدارها در مقابل سولفوردی‌اکسید مقاوم‌اند و در مقابل هیدروژن‌سولفورید حساس هستند. لذا در نیویورک، توکیو و سانفرانسیسکو در خیابان‌ها و پارک‌ها کاشته شده‌اند. در جوار بعضی‌کارخانجات دودزا مخصوصا کارخانجات مس آن را کاشته‌اند. مقاوم در مقابل هیدروژن فلوراید نیز می‌باشد. سرمای شدید به آن آسیب می‌رساند، مثلا درجه حرارت ۲۱- سانتی‌گرادکاملا آن را از بین می‌برد.

در مورد واریته‌های آن فرم‌های مختلفی وجود دارد که از راه قلمه و پیوند ازدیاد می‌نمایند. واریته‌های مهم آن عبارتند از:

Taxus baccata
Taxus b. var. aurea
Taxus b. var. elegantissina
Taxus b. var. latea
Taxus b. var. procamben

۱-۷-۵ سرخدار در ایران

گل‌های سرخدار در خرداد ماه ظاهر می‌شود. اوایل پاییز میوه آن می‌رسد. بذر آن را در مهرماه و آبان‌ماه می‌توان جمع آوری نمود. در یک کیلوگرم آن ۲۰۰۰۰-۱۵۰۰۰ دانه وجود دارد. طبق آزمایش درجه خلوص بذر آن ۷۸درصد بوده است. بذر آن در آزمایشگاه دانشکده منابع طبیعی دانشگاه تهران تا دو سال حفظ شده است.

توده‌های سرخدار ایران در روی خاک هوموس کربناته قرار دارند. این خاک‌ها ریز بافت هستند. از ماده آلی غنی می‌باشند، معدنی شدن ماده آلی بسیار کند است، که منجر به تولید هوموس خام گردیده است. ظرفیت تبادلی این خاک‌ها در افق‌های هوموسی خیلی زیاد است. رویشگاه آن نیمه مرطوب است. زادآوری در این خاک‌ها بسیار ضعیف است. عملا زادآوری در این جنگل‌ها کم صورت می‌گیرد، لذا آینده

جنگل سرخدار در حال تهدید است. اغلب جنگل‌های سرخدار ایران در ته دره‌های سایه دار و در ارتفاعات بالا موجود است. سرخدارهای موجود در ایران از بهترین سرخدارهای دنیا به‌حساب می‌آیند. مقاومت آن نسبت به کلسیم و خشکی ثابت شده‌است.

۱-۸ اگروباکتریوم رایزوژنز

اگروباکتریوم رایزوژنز عاملی برای ایجاد ریشه‌های مویین وافزایش تولید متابولیت‌های ثانویه می‌باشد. این باکتری یک باکتری گرم منفی در خاک‌های معمولی است. زمانی که ژن‌های باکتری وارد ژنوم گیاه می‌شود تشکیل ریشه‌های ثانویه را به گیاه القا می‌کند (یک قسمت بزرگی از پلاسمید Ri به گیاه منتقل می‌شود). ریشه‌های مویین نوعی بیماری گیاهی است که توسط اگروباکتریوم رایزوژنز ایجاد می‌شود. زمانی که باکتری وارد گیاه می‌شود، تعدادی از ژن‌ها از پلاسمید باکتری به گیاه منتقل شده و وارد ژنوم هسته‌ای گیاه میزبان می‌شود. حاصل این انتقال تولید ریشه‌های مویین در نزدیکی جایگاه ورود باکتری است. اگروباکتریوم رایزوژنز در اثر اکسین دخالت دارد در واقع بیشتر روی افزایش حساسیت اکسین بافت‌سلولی نسبت به افزایش تولید اکسین اثر دارد (Riker et al, 1930).

Scientific classification

Kingdom: *Bacteria*

Phylum: *Proteobacteria*

Class: *Alpha Proteobacteria*

Order: *Rhizobiales*

Family: *Rhizobiaceae*

Genus: *Agrobacterium*

Species

- *Agrobacterium atlanticum*
- *Agrobacterium ferrugineum*
- *Agrobacterium gelatinovorum*
- *Agrobacterium larrymoorei*
- *Agrobacterium meteori*

- *Agrobacterium radiobacter*
- *Agrobacterium rhizogenes*
- *Agrobacterium rubi*
- *Agrobacterium stellulatum*
- *Agrobacterium tumefaciens*
- *Agrobacterium vitis*

۱-۸-۱ ساختار و عملکرد Ri پلاسمید

پلاسمید Ri در اگروباکتریوم رایزوژنز و Ti پلاسمید در اگروباکتریوم تومی فاسیینس می‌باشد. این باکتری‌ها توانایی انتقال ژن در دولپه‌ای‌ها را دارند و منجر به ایجاد بیماری گال و ریشه‌های مویین می‌شوند.

نواحی T شامل ژن‌های موتاسیون است که در گیاه میزبان بیان می‌شوند. برخی از این ژن‌ها برای آنزیم‌هایی است که اکسین و سایتوکنین را سنتز می‌کنند. نوع دیگر فقط در Ri پلاسمید است که حساسیت هورمونی زیاد را روی بافت‌های تلقیح شده اعمال می‌کند. T.DNA اغلب شامل ژن‌هایی است که برای آنزیم‌های سنتزکننده اپاین‌های باکتریایی است. با استقرار ژن‌ها در نواحی Vir(virulence) پلاسمید به وسیله مواد فنولیکی ناشناخته بافت‌های زخمی شده انتقال T.DNA آغاز می‌شود. تولیدات نواحی Vir و ژن‌های کروموسومال واسطه، T.DNA را به سلول‌های گیاه میزبان انتقال می‌دهد. بیماری گال به وسیله تولید اکسین و سایتوکنین با T.DNA انتقال داده شده ایجاد می‌شود. کدهای T.DNA پلاسمید Ri برای سه ژن است که هر کدام می‌توانند باعث القا تشکیل ریشه شوند و با یکدیگر می‌توانند باعث تشکیل ریشه‌های مویین از بافت گیاه شوند. نتایج بررسی‌ها نشان می‌دهد که تولیدات این ژن‌ها یک پتانسیل برای افزایش حساسیت اکسینی، وقتی که سلول‌های تغییر شکل یافته در معرض سطح خاصی از اکسین قرار می‌گیرند را القا می‌کند، بعد از این مرحله ریشه‌های انتقال ژن یافته می‌توانند در کشت بدون مصرف خارجی هورمون‌ها رشد کنند(*Vilas et al*, 1988).

۱-۸-۲ توالی نوکلئوتیدی Ri plasmid

اولین توالی نوکلئوتید از Ti پلاسمید شناسایی شده ولی ساختار عمومی این پلاسمیدهای انتقال دهنده T.DNA عامل تومور ناشناخته است. تمام توالی نوکلئوتیدی یک Ri پلاسمید نوع اپاین PRi1724 را آنالیز کردند. سایز این پلاسمید 217-594bp است و در کل ۱۷۳، oRfs دارد که همگی به جز ۲۷، oRfs ناشناخته به صورت نامتقارن توزیع شدند. ۱۷۳، oRfs به ۱۲ گروه طبقه‌بندی شدند: سه تا برای رونوشت DNA، نه تا برای تغییر و تبدیل پلاسمید، ۲۲ تا برای پیوستگی، ۲۶ تا برای Virulence، ۱۱ تا برای ژن T.DNA، ۱۹ تا برای انتقال اپاین و لاکتام اپاین، ۱۰ تا برای متابولیسم اپاین ناشناخته، ۷ تا برای کنترل رونویسی، ۵ تا برای انتقال قند، ۵ تا برای متابولیسم گلیسرول، ۴ تا برای گیرنده‌های شیمیایی و ۳۲ تا برای غیره (*Steen et al*, 2006).

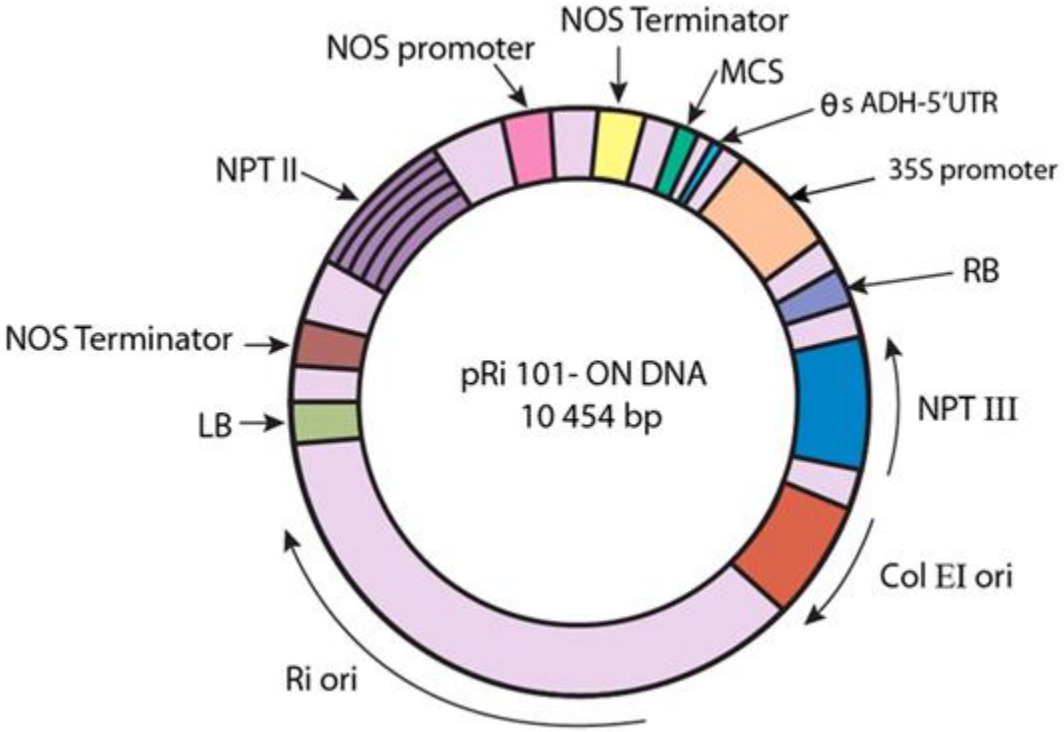
۱-۸-۳ ساختار Ri پلاسمید

یکی از پلاسمیدهای Ri، PRiA4b است. استرین A4 اگروباکتریوم رایزوژنز شامل سه پلاسمید PRiA4a(ca.170kb)، PRiA4b(ca.250kb) و PRiA4c(ca.420kb) می‌باشد. PRiA4c برای نگهداری با هیچ یک از PRiA4a و PRiA4b در یک باکتری مناسب نیست و دارای سایزی درشت و برابر با جمع دو پلاسمید دیگر است. با کشت سلول‌های بدون PRiA4c دریافتند که هر دو پلاسمید PRiA4a و PRiA4b با یک بسامد برابر و مشابه ظاهر می‌شود که این حالت شبیه پلاسمید دیگری به نام PRi15834 است(شکل ۱-۳).

۱-۸-۴ آنالیز مولکولی و ژنتیکی پلاسمید القا ریشه (Ri) اگروباکتریوم رایزوژنز

نواحی T.DNA پلاسمید القا ریشه PRiA4b اگروباکتریوم رایزوژنز دارای دو ناحیه TL.DNA و TR.DNA است که با ژنوم گیاه مخلوط می‌شوند. TL.DNA یک ناحیه ۱۵-۲۰ KB است که حداقل با ۱۵ KB از نواحی TR.DNA جدا شده است. ناحیه TR.DNA یک ناحیه 20KB می‌باشد که دارای پلاسمید Ti (القا تومور) است که در اگروباکتریوم تومی فاسیینس می‌باشد. ژن‌های tms از هر

دو پلاسمید Ti و Ri در موتاسیون‌ها عملکرد مشابهی نشان دادند. پیشنهاد می‌شود که یک وظیفه به هم مرتبطی بین یک یا بیشتر ژن‌هایTL.DNA و مکان سنتز سایتوکنین tmr پلاسمید Ti است(*White et al*, 1985).

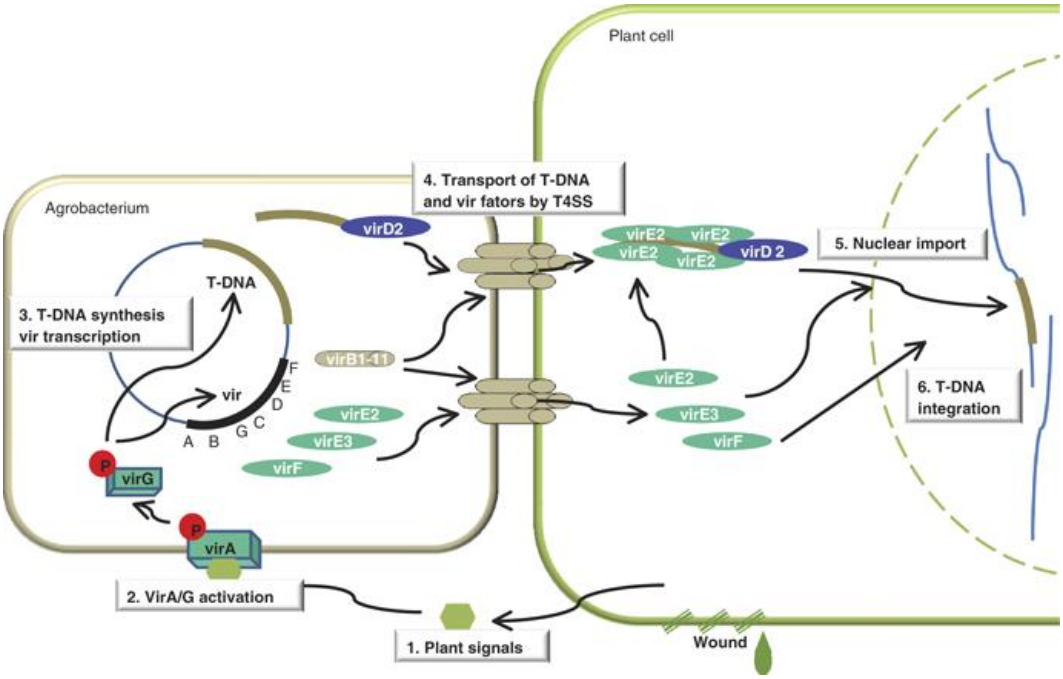


شکل ۱-۳ ساختار Ri plasmid

۱-۸-۵ مکانیسم عملکرد سلول گیاهی و اگروباکتریوم رایزوژنز

اولین مرحله در عملکرد بین اگروباکتریوم رایزوژنز و یک گیاه تماس باکتری با قسمتی از سلول گیاهی است .یک سلول گیاهی مناسب وقتی حساس به اگروباکتریوم رایزوژنز است که زخم شده باشد. سلول‌های زخم شده ترکیبات فنولی آزاد می‌کنند که ناحیه Vir پلاسمید باکتریایی فعال می‌شود. پلاسمید باکتری سه ترکیب ژنتیکی را که برای انتقال ژن به سلول‌های گیاهی نیاز هستند را با خود حمل می‌کنند. اولین ترکیب T.DNA است که با سلول‌های گیاهی مختلط می‌شود T.DNA یک DNA متحرک است. دومین ترکیب نواحیVirulence می‌باشد که شامل ژن‌های Vir هستند. این ژن‌ها نمی‌توانند وارد سلول‌های گیاه شود اما با کروموزوم‌های DNA با یکدیگر باعث انتقال

T.DNA می‌شود. سومین ترکیب که معمولا توالی Border نامیده می‌شوند که (bp) 25 هستند که در کروموزوم‌های باکتری قرار دارند. تحرک T.DNA به‌وسیله این توالی تعیین می‌شود که آن‌ها تنها عناصر Cis ضروری برای هدایت کردن فرآیند انتقال T.DNA هستند(شکل ۱-۴).



شکل ۱-۴ انتقال T.DNA اگروباکتریوم رایزوژنز به سلول گیاه

۱-۹اکسین

برای آغازیدن ریشه نابجا غلظت‌هایی معین از موادی که به‌طور طبیعی در گیاه قرار داشته و ویژگی هورمونی[۱] دارند از سایر مواد مناسب‌ترند. از این مواد اکسین‌ها بیشترین اثر را روی تشکیل ریشه در قلمه‌ها دارند.

اکسین‌ها فعالیت‌های مختلف گیاهی مانند رشد ساقه تشکیل ریشه نابجا جلوگیری از رشد جوانه‌های جانبی ریزش برگ‌ها و میوه ها فعال کردن یاخته‌های لایه زاینده و غیره دخالت دارد.

[۱] هورمون‌های گیاهی مواد آلی می‌باشد که مواد غذایی نبوده و توسط گیاهان تولید می‌شود و در غلظت‌های کم،فرآیند فیزیولوژیکی را تنظیم می‌کند. آن‌ها به‌طور معمول در درون گیاه از محل تولید به محل اثر، انتقال می‌یابد.

ایندول بوتریک اسید و نفتالین استیک اسید هورمون‌های اکسینی سنتزی هستند که به‌طور طبیعی یافت نمی‌شود حتی از ایندول استیک اسید که درطبیعت یافت می‌شود در تحریک ریشه روی قلمه‌ها موثرتر هستند.

به‌کارگیری اکسین به صورت طبیعی یا مصنوعی لازمه‌ای برای آغازیدن ریشه نابجا روی ساقه است. در واقع تقسیم اولین یاخته‌های آغازنده ریشه، به وجود اکسین درونی و یا اکسینی که از خارج به‌کار برده می‌شود، وابسته می‌باشد.

فصل دوم:

بررسی منابع

۲ مروری بر پژوهش های گذشته

برای درخت سرخدار تولید دانه بسیار محدود است و دانه‌هاش بسیار سخت جوانه می‌زنند. لذا برای تکثیر این درخت از قلمه‌های ساقه استفاده می‌کنند. گونه های سرخدار از جمله گیاهان سخت ریشه زا می‌باشند. روی ریشه‌زایی قلمه سرخدار کارهای پژوهشی متعددی تاکنون انجام شده است.

در پژوهشی تاثیر هورمون‌های ایندول بوتریک اسید , ایندول استیک اسید , نفتالین استیک اسید و جیبرلین با غلظت‌های مختلف ۱۰۰۰، ۲۵۰۰، ۵۰۰۰، ۱۰۰۰۰ و ۱۲۵۰۰ پی‌پی‌ام روی ریشه‌زایی قلمه‌های سرخدار بررسی شد. در این پژوهش قلمه‌هایی با طول ۱۰-۲۰ سانتی‌متر و ضخامت ۰/۵-۱ سانتی‌متر و با ۳-۴ گره مدنظر قرار گرفتند و دو روش غوطه وری قلمه‌ها و استفاده از پودر تاک نیز مورد مقایسه قرار گرفت. نتایج این پژوهش نشان داد که قلمه‌ها نسبت به هورمون‌های مختلف و روش‌های کاربردی متفاوت پاسخ‌های مختلفی می دهند. هورمون ایندول بوتریک اسید بیشترین تحریک روی درصد ریشه‌دهی با غلظت ۱۰۰۰۰ پی‌پی‌ام و با پودر تالک را داشت. ایندول استیک اسید هورمون بهتری بعد از ایندول بوتریک اسید و در ادامه نفتالین استیک اسید و نهایتا جیبرلین بود. روش دوم بدون در نظر گرفتن نوع و غلظت هورمون نسبت به روش اول تحریک ریشه‌دهی بیشتری را نشان داد (Singh, 2011).

در تحقیقی دیگر تحریک به ایجاد ریشه‌های مویین و رشد ریشه‌ها در قلمه درختان جنگلی به وسیله باکتری‌ها بررسی شده است. در این آزمایش درختان سوزنی‌برگ و خزان‌دار مثل (لاریکس، تاکسوس، کاج و ...) و دانهال‌های راش و بلوط را با باکتری‌های (باسیلوس، سپودوموناس و اگروباکتریوم) تحریک به ایجاد ریشه‌های نابجا کردند. در همه گونه‌های گیاهی تیمار شده افزایش رشد ریشه‌ها در ریشه‌های القا شده مشاهده شد. برای گونه تاکسوس باکاتا از درختان پیر(۵۰ ساله) قلمه گرفتند. باکتری استفاده شده در این پژوهش برای درخت سرخدار *Bacillus subtilis* و طول دوره ریشه‌دهی پنج ماه بود. بهبود ریشه‌دهی در سرخدار به‌وسیله دو استرین *B. subtilis* (T99 و Z1) بررسی شد. فقط یک استرین باعث تحریک قلمه‌ها به ریشه‌دهی گردید، استرین دوم تاثیری روی ریشه‌دهی قلمه‌ها نشان

نداد. در تحریک رشد ریشه به‌وسیله استرین محرک باسیلوس یک کاهش کمی در رشد شاخه‌ها در مرحله اول تکثیر رویشی مشاهده شد. نتایج این پژوهش نشان داد که موفقیت در تحریک به ریشه‌دهی قلمه بستگی به نوع باکتری، استرین و ژنوتیپ گونه‌های گیاهی دارد و همچنین سن فیزیولوژیکی گیاه تشکیل ریشه‌های نابجا را تعدیل و تغییر می‌دهد (Zaspel & Ewald, 2000).

عصاره و همکاران در سال ۱۳۸۱ از دو رویشگاه طبیعی سرخدار، دره زرین گل و کوه‌های درفک گیلان جهت تهیه قلمه نمونه‌برداری کردند. قلمه‌ها در سه گروه؛ ۱: قلمه‌های تهیه شده از پاجوش‌ها و شاخه‌های یک‌ساله درختان جوان کمتر از ۸ سال به‌صورت پاشنه‌دار ۲: قلمه‌های تهیه شده از شاخه‌های یک‌ساله درختان کهنسال به صورت پاشنه‌دار ۳: قلمه‌های بدون پاشنه از شاخه‌های یک‌ساله سرخدار تهیه گردیدند. گروه‌های ۱، ۲ و۳ در چهار تیمار بستر کشت شامل تیمار ۱: شن خالص، ۲: شن خالص + ماده جاذب الرطوبه هیدروژل + هورمون (1000 ppm) ایندول بوتریک اسید ، تیمار ۳: مخلوط خاک جنگل، تیمار ۴: خاک باغبانی مورد استفاده در موسسه تحقیقات جنگل‌ها و مرتع، کشت گردیدند. قلمه‌ها به مدت نه ماه با آب معمولی آبیاری و تحت شرایط میست در گلخانه در دمای ۲۵ درجه در روز و ۱۵ درجه در شب نگهداری شدند. نتیجه نهایی نشان داد که بیشترین درصد زنده‌مانی و ریشه‌دهی در تیمار شن خالص+ ماده جاذب‌الرطوبه و هورمون ایندول بوتریک اسید می‌باشد. تمام قلمه‌های سرخدار در قسمت تحتانی آن به‌راحتی واجد کالوس گردیدند. بررسی‌های آناتومیکی کالوس‌های ایجاد شده در انتهای قلمه‌ها نشان دهنده ریشه‌دهی قریب‌الوقوع قلمه‌ها بوده و سرخدار خصوصیات گیاهان با ریشه اتفاقی را بروز می‌دهد و در هر زمان از سال به شرط ایجاد کالوس در انتهای آن قادر به ریشه‌دهی است (عصاره و همکاران, ۱۳۸۱).

هالووی و همکاران تاثیر تیمار ایندول بوتریک اسید را روی ریشه‌دهی قلمه‌های سرخدار بررسی کردند. در این پژوهش غوطه‌وری انتهای قلمه‌ها در پودر ایندول بوتریک اسید (۸٪) روی هیچ‌یک از صفات ریشه‌دهی و رشد ریشه‌های نابجا در مقایسه با شاهدها تاثیر مفیدی نداشت(لذا با صرف نظر از

توانایی خود کلون‌های مورد نظر در ریشه‌دهی). غوطه‌وری سریع در محلول ایندول بوتریک اسید با غلظت‌های ۰، ۰/۵، ۱ ، ۱/۵ و ۲٪ در ۵۰٪ اتانول باعث تحریک ریشه‌دهی شد. با غلظت ۰/۵ و ۱٪ ریشه‌های تولید شده بیشترین بقا را داشتند. با غلظت ۲٪ بهترین رشد ریشه به‌دست آمد. در این پژوهش تاثیر مواد مغذی در کلون‌ها هم روی ریشه‌دهی بررسی کردند و متوجه شدند در کلون‌های سخت ریشه‌زا تفاوت معنی‌داری در نسبت مواد مغذی گیاه با غلظت عناصر ماکرو در برگ به جز برای کلسیم وجود ندارد(کلسیم تجمع زیادی در گیاه دارد) و دریافتند که غلظت مناسب نیتروژن و فسفر تاثیر مثبتی روی ریشه‌دهی دارد ولی غلظت پتاسیم و منیزیم تاثیرات منفی متقابلی روی درصد ریشه‌زایی دارند (*Holloway et al*., 2008).

مدانلو و همکاران در سال ۱۳۸۷ اثرات غلظت‌های مختلف نمک پتاسیم و ایندول بوتریک اسید و نوع قلمه‌گیری از محل شاخه در ریشه‌زایی گونه سرخدار (*Taxus baccata L.*) بررسی کردند. در این طرح هورمون نمک پتاسیم ایندول بوتریک اسید در چهار سطح ۰، ۲۵، ۵۰ و ۷۵ میلی‌گرم در لیتر و محل قلمه‌گیری از شاخه از سه قسمت فوقانی، میانی و تحتانی مورد آزمایش قرار گرفت. نتیجه آزمایش نشان داد که بیشترین درصد ریشه‌زایی در غلظت ۷۵ میلی‌گرم در لیتر به مدت یک ساعت به‌دست می‌آید و قلمه قسمت فوقانی شاخه‌ها، بیشترین درصد زنده‌مانی و ریشه‌زایی را نشان می‌دهند (مدانلو و همکاران ، ۱۳۸۷).

در یک پژوهش تاثیر قارچ میکروریزا را در محیط ریشه‌زایی روی کیفیت و کمیت ریشه‌های قلمه سرخدار بررسی گردید. نتایج نشان داد که با مایه‌کوبی قارچ میکروریزا به محیط ریشه‌زایی، قلمه‌های ریشه دار افزایش می یابد. بعد از تیمار قلمه‌ها با هورمون‌های ریشه‌دهی نیز استفاده ازاین قارچ باعث افزایش آغازش ریشه می‌شود. با افزایش سطح مایه‌کوبی افزایشی در آغازش ریشه‌های نابجا بدون افزایش در رشد ریشه مشاهده شد. استفاده از سطح مناسب این قارچ برای اصلاح آغازش و رشد ریشه‌ها مورد نیاز است. در درخت سرخدار نسبت ۱:۱۰۰ یا ۲:۱۰۰ قارچ *G.intraradices* در محیط

ریشه‌زایی باعث افزایش تعداد ریشه‌های اولیه و رشد ریشه‌های نابجا را بیشتر از استفاده هورمون‌های ریشه‌زایی به‌تنهایی می‌شود (*Scagel* et al., 2000).

ویلاد و همکاران تاثیر نوع محیط های پرلایت، پیت و پیت و پرلایت روی ریشه‌دهی قلمه‌های سرخدار بررسی کردند. نتایج این آزمایش نشان داد که تعداد قلمه‌های ریشه‌دار شده مخلوط پرلایت و پیت بیشتر از سایر محیط ها می‌باشد (*Vlad et al*., 2009).

لیلیانا و همکاران تاثیر سن قلمه و دمای محیط روی ریشه‌دهی قلمه‌های سرخدار آزمایش کردند. در این آزمایش دو دمای مختلف را برای بستر کشت در نظر گرفتند (۱۸-۲۳) و سن قلمه‌ها را جوان و پیر جهت بررسی قدرت ریشه‌دهی انتخاب کردند. نتیجه گرفتند که دمای پایین برای ریشه‌دهی مطلوب‌تر است و شاخه‌های جوان بیشتر از بالغ ریشه‌دهی دارند و دریافتند که زخم‌زنی ته قلمه تاثیری روی ریشه‌دهی قلمه ندارد. یک واریته وحشی کشف کردند که از نظر توانایی ریشه‌دهی می‌تواند با درختان بخشنده با ژنتیک و فیزیولوژی متفاوت همبستگی داشته باشد (*Liliana Munoz-et al*, 2009).

بیابانی و همکاران در سال ۱۳۹۰ در یک پژوهش ریشه‌زایی سرشاخه های انار رقم رباب را در تیمار با هورمون‌های اکسینی (ایندول بوتریک اسید) و (نفتالین استیک اسید) هر کدام در غلظت های۱۵۰۰و ۱۰۰۰ ، ۵۰۰ ،۰ میلی گرم درلیتر و ترکیبی از آن ها مورد بررسی قرار داد. نتایج نشان داد که تیمار سرشاخه‌ها با ایندول بوتریک اسید به طور معنی داری موجب افزایش درصد ریشه زایی، تعداد ریشه، طول ریشه، وزن تر، وزن خشک و درصد ماده خشک ریشه شد. بیشترین درصد ریشه زایی (۹۱/۷) در غلظت ۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر تیمار ایندول بوتریک اسید دست آمد.

شیاما و همکاران مطالعه‌ای بر روی تأثیر ایندول بوتریک اسید و نفتالین استیک اسید به همراه ترکیبات فنولیکی کومارین[1]، اسید جنتیسیک[2] و فلوروگلوسینول[1] و یک قارچ‌کش سیستمیک

[1]Coumarin
[2]Gentisic acid

باویستین[۲] را روی تحریک تشکیل ریشه‌های نابجا روی قلمه‌های سرخدار انجام دادند. در استفاده از فلوروگلوسینول به تنهایی ۴۰٪ موفقیت در ریشه‌دهی به‌دست آمد. نتایج نشان داد که غلظت ۰/۲۵ میلی‌مول از ایندول بوتریک اسید ونفتالین استیک اسید به همراه ترکیب فنولی فلوروگلوسینول باعث افزایش سرعت تشکیل کالوس و افزایش ریشه‌دهی می‌شود ولی کومارین و جنتیسیک اسید اثری روی ریشه‌دهی نداشتند. قارچ کش باویستین اثر خوبی روی کالوس‌دهی داشت (بالای ۹۰٪) به‌همان اندازه‌ای که روی ریشه‌دهی موثر بود (بالای ۸۰٪). نتایج نشان داد که ۰/۲۵ میلی مول ایندول بوتریک اسید و نفتالین استیک اسید به اضافه ۰/۰۵ درصد قارچ‌کش باویستین و ۰/۱۵ میلی‌مول فلوروگلوسینول باعث افزایش ریشه‌دهی در قلمه‌های سرخدار می‌شود. در کل در تیمار با همه هورمون‌های اکسینی به‌صورت تکی یا ترکیب چند هور مون با هم تشکیل کالوس کاملا افزایش می‌یافت (بالای ۷۰٪). اثر بخشی ترکیبات مختلف برای ریشه‌دهی قلمه‌های ساقه جوان آزمایش شد و ترکیب سفارش شده شامل:

0/25Mm IBA> 0/05 Bavestin > 0/25Mm NAA> 1/25 Mm IBA> 15 Mm Phloroglucinol > IBA+NAA (هرکدام ۰/۲۵ میکرومول).

قارچ‌کش باویستین خاصیت مشابه اکسین روی تشکیل ریشه‌های نابجا در گیاه سرخدار و دیگر گونه‌های گیاهی دارد (*Shyama et al*., 1996).

در یک پژوهش قلمه‌های سرخدار را با اکسین‌های مختلف (ایندول استیک اسید, ایندول بوتریک اسید, نفتالین استیک اسید) تیمار کردند. به این نتیجه رسیدند که ایندول بوتریک اسید مناسب‌ترین هورمون و در ادامه نفتالین استیک اسید و ایندول استیک اسید به‌ترتیب برای القا بیشترین درصد کالوس‌دهی، درصد ریشه‌زایی، تعداد ریشه و طول ریشه مناسب می‌باشند. طبق این پژوهش غلظت ۵۰۰ پی‌پی‌ام از ایندول بوتریک اسید بهترین غلظت برای ریشه‌دهی قلمه‌های سرخدار بود Anjum). et al., 2011)

[1]Phloroglucinol
[2]Bavistin

در تحقیق دیگری تأثیرهورمون‌های ایندول بوتریک اسید و نفتالین استیک اسید به غلظت‌های ۲۵۰، ۵۰۰ و۷۵۰ میلی‌گرم در لیتر به همراه تیامین[1] در ریشه‌دهی سرخدار بررسی شد و به این نتیجه رسیدند که اگر همراه هورمون‌های ریشه‌زایی از ۰/۰۸درصد تیامین استفاده شود میزان ریشه‌دهی بهتر می‌شود و بهترین غلظت از هر دو هورمون ۲۵۰ میلی‌گرم ارزیابی شد (chee, 1995). در یک آزمایش با استفاده از اگروباکتریوم رایزوژنز ریزنمونه‌های کاج رادیاتا را که شامل هیپوکوتیل، دانهال‌های سالم، قلمه‌های دانهال‌های ریشه‌دار شده و شاخه‌های نابجا بود، تحریک به ریشه‌دهی کردند. استفاده ازدو استرین اگروباکتریوم رایزوژنز (A_4, LB_{9402}) همراه یا بدون کاربرد ایندول بوتریک اسید می‌تواند باعث ریشه‌دهی در ریزنمونه‌های مختلف کاج می‌شود. استرین LB_{9402} تاثیر بیشتری نسبت به A_4 در درصد ریشه‌زایی و تعداد ریشه دارد. به همراه دو استرین اگروباکتریوم رایزوژنز استفاده از ۴/۴ میکرومول ایندول بوتریک اسید افزایش تاثیر بیشتری در ریشه‌دهی هیپوکوتیل دارند. استفاده از استرین LB_{9402} و ایندول بوتریک اسید باعث می‌شود بیشتر از ۷۵٪ از ریزنمونه‌های هیپوکوتیل ریشه دهند. با تلقیح شاخه‌های نابجا سه ساله کاج با استرین LB_{9402} اثر مثبتی روی ریشه‌دهی مشاهده شد ودر نهایت نتیجه گرفتند که این تیمارهای ریشه‌دهی کمک بزرگی به تکثیر کاج رادیاتا می‌کند (*Mingshanli et al*., 2003).

قلمه‌های چوب نرم دو رقم Casina و Ennis فندق را تحت شرایط میست تکثیر کردند و مشاهده کردند که اگروباکتریوم رایزوژنز و هورمون ایندول بوتریک اسید هر دو باعث تحریک ریشه‌دهی قلمه‌های ساقه شد. ایندول بوتریک اسید باعث شد که تقریبا همه جوانه‌های روی قلمه ریزش کند. ریشه‌دهی بهتر و بقای جوانه در رقم Casina بیشتر از رقم Ennis دیده شد. زمانی که قلمه‌ها را با اگروباکتریوم رایزوژنز تلقیح کردند بقای جوانه‌ها روی قلمه‌ها بهبود یافت مثل قلمه‌هایی که از شاخه‌های نیمه‌سخت گرفته می‌شوند. ۶ ماه بعد از کشت، قلمه‌های تلقیح شده با اگروباکتریوم رایزوژنز سیستم ریشه مویین

[1] Tiamin

گسترده‌ای را تشکیل دادند. لذا استرین‌های اگروباکتریوم رایزوژنز عاملی موثر در ریشه‌دهی فندق می‌باشد که می‌تواند ریزش جوانه در اثر ایندول بوتریک اسید را کاهش دهد (*Bassil et al*., 1991).

در پژوهشی تاثیر ایندول بوتریک اسید را در غلظت‌های ۲۵۰، ۵۰۰ و ۷۵۰ پی‌پی‌ام به‌تنهایی یا ترکیب با سه استرین (A_1, A_{16} , A_{18}) از *Agrobactrium rubi* روی توانایی ریشه‌دهی قلمه‌های نرم و نیمه‌سخت گیلاس بررسی گردید. استرین‌های باکتری استفاده شده در این پژوهش از شاخ و برگ دانه داران (سیب و گلابی) رشد کرده در آنتالیای ترکیه جدا شدند. قلمه‌های تیمار نشده با ایندول بوتریک اسید و باکتری و گیلاس وحشی ریشه‌دهی نشان ندادند ولی وقتی با هورمون و باکتری تیمار شدند درصدهای ریشه‌دهی متفاوتی را نشان دادند. بیشترین درصد ریشه‌دهی ٪۶۵ برای قلمه چوب‌های نرم و ٪۷۰ برای چوب نیمه‌سخت وقتی با ۲۵۰ پی‌پی‌ام و استرین A_{16} تیمار شدند، مشاهده گردید. در قلمه‌های چوب نرم تیمار شده، استرین باکتری A_{16} (٪۴۳/۸) و A_1 (٪۴۲/۵) اثر بیشتری روی ریشه‌دهی قلمه‌ها نسبت به A_{18} (٪۱۸/۸) و تیمار نشده های کنترل شده (٪۱۳/۱) داشت. در مورد غلظت‌های هورمونی بهترین درصد ریشه‌دهی در تیمار ۲۵۰ پی‌پی‌ام از هورمون ایندول بوتریک اسید مشاهده شد. در قلمه‌های نیمه‌سخت بهترین درصد ریشه‌دهی در تیمار با A_{16} (٪۴۹/۴) و ۷۵۰ پی‌پی‌ام ایندول بوتریک اسید (٪۴۶/۹) به‌دست آمد. نتایج نشان داد ترکیب ایندول بوتریک اسید و باکتری اثر بالایی در افزایش توانایی ریشه‌دهی دارند نسبت به وقتی که تیمار صورت نگیرد و یا با باکتری و هورمون به‌تنهایی تیمار کنند (Esitken et al., 2002).

در یک پژوهش القا ریشه‌دهی در بادام تلخ را تحت شرایط مزرعه‌ای و درون شیشه ای با استفاده از اگروباکتریوم رایزوژنز بررسی شد. تلقیح قلمه‌های چوب نرم بادام تلخ با اگروباکتریوم رایزوژنز تحت شرایط مزرعه‌ای(محیط باز) کاملا ناموفق بود. لذا محیط MS بهترین محیط برای ریشه‌دهی شاخه‌های بادام تلخ می‌باشد. در ادامه به‌وسیله محیط B&N و محیط WP به‌ترتیب بیشترین درصد ریشه‌دهی و نسبت تعداد ریشه به شاخه‌های ریشه‌دار شده، به‌دست می‌آید. درحالی‌که B&N و محیط WP بلندترین طول ریشه را نشان می‌دهد. اضافه کردن ذغال فعال به محیط ریشه‌دهی منجر به کاهش شدید درصد

ریشه‌زایی می‌شود. نفتالین استیک اسید یک هورمون اکسین با اثر زیاد در القا ریشه‌زایی زیاد می‌باشد. افزایش تعداد ریشه‌ها نسبت به شاخه ریشه‌دار شده و طول ریشه در قلمه‌های بادام تلخ با استفاده از ایندول بوتریک اسید به‌دست می‌آید. استرین مناسب برای تلقیح قلمه‌های کوچک در شرایط درون شیشه ای برای بادام تلخ استرین 1855 می‌باشد. عدم تلقیح اگروباکتریوم رایزوژنز در شرایط مزرعه‌ای می‌تواند به‌دلیل توانایی اگروباکتریوم رایزوژنز برای تولید ریشه‌های مویین در گیاه میزبان باشد. به‌هرحال این مرتبط است به استرین‌های باکتری و کیفیت گیاهان دارد. سازگار بودن اگروباکتریوم رایزوژنز و بافت گیاه میزبان، T.DNA، فیتوهورمون و جوانی بافت میزبان فاکتورهای مهمی در تلقیح و تولید ریشه‌های مویین هستند. بنابراین هر یک از دلایل قبلی می‌تواند منجر به شکست در تلقیح و ریشه‌دهی شود (Abou Rayya et al., 2010).

شارمان ماکری[1] و همکاران در سال ۱۹۹۳ القا ریشه‌های مویین روی گیاه اکالیپتوس را با استرین‌های اگروباکتریوم رایزوژنز LB_{9402}، R_{1601} و $TR_{8,3}$ بررسی کردند. ریزنمونه‌های گیاه را با استرین‌های اگروباکتریوم رایزوژنز تلقیح کرده و در محیط MS کشت کردند. از هورمون ایندول بوتریک اسید به غلظت یک پی‌پی‌ام نیز استفاده کردند. ژن های القا ریشه روی پلاسمید Ri از هر سه استرین اگروباکتریوم رایزوژنز با ژنوم گیاه اختلاط پیدا کرده و باعث القا ریشه‌های مویین در ریزنمونه‌های اکالیپتوس شدند. بیشترین درصد ریشه‌زایی(۸۰٪) مربوط به استرین LB_{9402} و بعد از آن استرین $TR_{8,3}$ با درصد ریشه‌زایی ۷۶٪ بود. استرین R_{1601} درصد ریشه‌زایی شبیه به زمانی داشت که از هورمون اکسین ایندول بوتریک اسید استفاده کردند.

پراتاپ چاندران[2] و همکاران در سال ۲۰۰۰ القا ریشه‌های مویین با چهار استرین اگروباکتریوم رایزوژنز ($WR, WC, A_4, ATCC_{15834}$) روی پنج گونه گیاه شامل: سیب‌زمینی شیرین[3]، سیب‌زمینی

[1] sharmane Macrae
[2] Pratap Chandra
[3] Ipomea batatas

چینی[1]، اسطوخدوس[2]، شلغم مکزیکی[3]، بقولات[4] انجام دادند. گونه شلغم مکزیکی به چهار استرین باکتری مقاومت نشان داد مثل استرین WR که در هر پنج گونه گیاهی جهت القای ریشه‌های مویین اثری نداشت. ریشه‌های مویین از کوتیلدون‌ها، هیپوکوتیل، قلمه‌های ساقه و گیاهان درون شیشه ای گونه سیب‌زمینی شیرین القا شدند که برای این گیاه استرین‌های 15834 و A_4 استفاده شد. برای ارقام سیب‌زمینی چینی و اسطوخدوس از استرین‌های 15834 , A_4 و WC استفاده کردند. گونه بقولات به استرین‌های WR و WC مقاومت نشان داد. اما استرین‌های 15834 و A_4 تاثیر موفق‌آمیزی روی آن داشتند. در نهایت دریافتند ریشه‌های مویین القا شده به‌وسیله استرین 15834 روی گونه‌های سیب زمینی شیرین و اسطوخدوس و بقولات مرفولوژی متفاوتی دارند. در بین استرین‌ها، استرین 15834 روی گونه‌های مختلف گیاهی اثر بیشتری برای تولید ریشه‌های مویین دارد (Chandran et al., 2008). اگروباکتریوم رایزوژنز می‌تواند در بافت‌های مختلف روی نمو ریشه‌های مویین تاثیر بگذارد. از اگروباکتریوم رایزوژنز برای القا ریشه‌های مویین در درخت انگور استفاده کردند اما تعداد کمی از گونه‌ها و ژنوتیپ‌ها به القا پاسخ دادند. فاکتورهای زیادی مثل: استرین باکتری، ژنوتیپ گیاه و نوع بافت در پاسخ درخت مو به اگروباکتریوم رایزوژنز دخالت دارند. در این پژوهش از سه استرین باکتری (A_4 , 15834 و K_{599}) و چهار نوع بافت (میانگره، ساقه، دمبرگ و شاخه‌های جوان گرفته شده از گیاهان درون شیشه ای) و ۱۴ گونه انگور برای القای ریشه‌های مویین استفاده کردند. نتایج نشان داد هر دو استرین 15834 و A4 در القا ریشه‌های مویین در گونه‌های انگور موثر است و گونه‌های مختلف انگور و نوع بافت پاسخ متفاوتی به القا می‌دهند. از بین ۱۴ گونه ارزشیابی شده ۴ گونه (*V. vinifera, V. treleasii, V. labrusca, V. cinerea*) بیشترین پاسخ را به القا ریشه‌های مویین دادند. بافت میانگره و بافت‌های شامل دمبرگ و شاخه واکنش بالایی به القا ریشه‌های مویین داشتند. به هر حال شاخه‌های جوان گرفته شده از گیاهان درون شیشه ای بیشترین شایستگی را نسبت به میانگره و ساقه و دمبرگ برای القا ریشه‌های

[1] Solenostemon rotundifulius
[2] Vinga vexillata
[3] Pachyrrhizus erosus
[4] Canavalia

مویین داشتند. از بین ۶ گونه، شاخه‌های جوان گونه‌های *V. palmata* و *V. cinerae* بهترین پاسخ را به القا ریشه‌دهی نشان دادند (Jittaysothorn., 2011).

روجینی و همکاران در سال ۱۹۹۱ تاثیر استرین LB_{9402} را روی گونه‌های چوبی کیوی بررسی کردند. در این آزمایش ریزنمونه‌ها را از پایه‌های نر رقم Hayward بعد از گلدهی کلون‌ها تهیه کردند. ریزنمونه‌های این گیاه، پهنک برگ یا سه تا چهار جوانه برگی بود که وقتی با استرین اگروباکتریوم رایزوژنز تلقیح کردند یک افزایشی در تشکیل ریشه‌های مویین نشان دادند. تشکیل ریشه‌های ثانویه یکی از فاکتورهای محدود کننده در تکثیر رویشی گونه‌های چوبی است که با انجام این آزمایش نشان دادند یک رابطه بین استفاده از اگروباکتریوم رایزوژنز و تشکیل ریشه مرفوژنیک در درختان است.

لامبرت[1] و همکارش در سال ۱۹۹۲ پایه سیب رقم M26 را با استرین A_4 تلقیح کرده و شاهد تولید ریشه‌های مویین در گیاهان انتقال ژن شده بودند. دریافتند تاثیر هورمون‌ها روی تشکیل ارگان گیاهان ترانس ژن شده تغییر کرده و برای تشکیل ریشه‌ها سایتوکنین نیاز است.

در یک آزمایش تاثیر دو استرین (LB_{9402} AR_{15834}) را روی گیاه سنبل بررسی کردند. به همراه استرین‌های باکتری از هورمون اکسین (نفتالین استیک اسید) هم به میزان ۰/۵ پی‌پی‌ام جهت القا ریشه‌های مویین استفاده کردند. در نهایت نتیجه گرفتند که استرین LB_{9402} تاثیر بهتری نسبت به AR_{15834} روی تشکیل ریشه‌های مویین این گیاه دارد (*Zebarjadi et al.*, 2011).

تعدادی از گونه‌های گیاهی از جمله بسیاری از گیاهان دارویی به‌وسیله اگروباکتریوم رایزوژنز تراریخته شده که نتیجه‌اش ایجاد ریشه‌های مویین است. ریشه‌های مویین منبعی برای تولید ترکیبات با ارزش دارویی می‌باشد. ریشه‌های مویین که با استفاده از اگروباکتریوم رایزوژنز تولید می‌شوند دارای رشد سریع بوده و اغلب میزان رشد آنها سریعتر از کشت سلول‌های گیاهی است. بزرگترین مزیت کشت ریشه‌های مویین این است که اغلب در مقایسه با گیاهان مربوط، توان بالایی در تولید متابولیت‌های ثانویه دارند.

[1] Lambert Claude

اصلان جمالی و همکاران در سال ۱۳۹۱ تاثیر سه سویه A_4, 15834 و 2656 اگروباکتریوم رایزوژنز و مدت زمان تلقیح بر القای ریشه مویین در ریزنمونه‌های برگ و دمبرگ سنبل‌الطیب را بررسی کردند. ریزنمونه‌ها پس از تلقیح با اگروباکتریوم به مدت ۴۸ ساعت روی محیط کشت MS کشت شده و سپس به محیط MS حاوی ۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر سفوتاکسیم کشت گردیدند. نتایج نشان داد که هر سه سویه باکتری موفق به تولید ریشه مویین شدند. ولی بین سویه‌ها از نظر فراوانی القای ریشه مویین تفاوت معنی‌داری وجود داشت. سویه A_4 موثرترین سویه جهت تولید ریشه مویین در سنبل‌الطیب بود. هم چنین ریشه‌های مویین در ریزنمونه‌های تلقیح شده با سویه A_4 زودتر از دو سویه دیگر ظاهر شدند. درصد ریزنمونه‌های دارای ریشه مویین در ریزنمونه دمبرگ به‌طور معنی‌داری بیشتر از ریزنمونه برگ بود، هم چنین درصد ریشه‌زایی در مدت زمان ۱۵ دقیقه تلقیح به‌طور معنی‌داری بیشتر از ۱۰ دقیقه بود.

در یک آزمایش از استرین‌های مختلف اگروباکتریوم رایزوژنز برای انتقال ژن در ۴ گونه بنگ‌دانه (Hyoscyamu) استفاده شد. در این آزمایش برگ‌های هر یک از چهار گونه بنگ‌دانه (*H. arachnoideus pojark, H. kurdicus bornm, H. reticulates L., H. squarrosus griff*) را با پنج استرین اگروباکتریوم رایزوژنز جهت القا ریشه‌های مویین تلقیح کردند. استرین‌های مورد استفاده در این پژوهش LB_{9402} , 1724 , 2659 , 15834 , A_4 بود که بعد از تشکیل ریشه‌ها به این نتیجه رسیدند که بهترین استرین برای القا ریشه‌های مویین به‌ترتیب 15834, 2659، LB_{9402} و 1724 در برگ‌های هر یک از چهار گونه بود (*Akramian et al.*, 2008).

آرکانا گیری و همکاران در سال ۲۰۰۳ استرین‌های مختلف اگروباکتریوم رایزوژنز (A_4 , 15834, K599, LB_{9402}, 9365, 9340) را برای القا ریشه‌های مویین در روی ریزنمونه مریستم نوک شاخساره در گیاه مورد بررسی کردند. مشاهده کردند اضافه کردن استوسیروژن به محیط کشت و واکشت باکتری بسامد القا ریشه‌های مویین در مورد را افزایش می‌دهد. از استرین‌های مختلف اگروباکتریوم رایزوژنز برای القا ریشه‌های مویین استفاده کردند. رشد فعال ریشه‌های مویین ترانس‌ژن شده با استرین‌های مختلف با

حداکثر رشد بین ۱۴ و ۱۶ روز یک الگوی رشد مشابهی را نشان داد. ریشه‌های مویین ترانس‌ژن شده تفاوت معنی‌داری در مقدار آرتمیسین نشان دادند. ریشه مویین القا شده با استرین 9365 بالاترین مقدار آرتمیسین را داشت(۰.۲۳٪). میزان آرتمیسین در ریشه‌های مویین مختلف بستگی به رشد ریشه دارد (*Archana et al*., 2003).

اگروباکتریوم رایزوژنز روشی برای تشکیل ریشه‌های مویین در گیاه روناس می‌باشد. در این پژوهش دانه‌های گیاه روناس از چهار ناحیه مختلف در ترکیه جمع‌آوری کردند. گیاهان در گلخانه رشد کردند و کوتیلدون آنها با چهار استرین اگروباکتریوم رایزوژنز (9365 , R_{1000} , 2628 , 15834) تلقیح شدند. اگروباکتریوم رایزوژنز استرین 2628 فقط تشکیل کالوس را روی سطح کوتیلدون‌ها القا کرد در حالی که استرین‌های9365, 15834, و R_{1000} باعث تشکیل ریشه‌های مویین روی ریزنمونه‌های یکسان شدند. در گام بعد میزان ترکیبات آنتراکوییینی در ریشه‌های مویین تلقیح شده با اگروباکتریوم رایزوژنز را نسبت به ریشه‌های گیاه کشت شده در مزرعه مقایسه کردند و دریافتند که میزان این ترکیبات در ریشه‌های تلقیح شده با اگروباکتریوم رایزوژنز درصد بالایی نسبت به ریشه‌های تیمار نشده دارد. ریز نمونه کوتیلدون گیاهان تیمار نشده هیچ پاسخی به تشکیل ریشه مویین نداشت یا مقدار قابل توجهی تشکیل کالوس در هیچ یک از آزمایش‌ها نشان نداد (*Gulhan Ercan et al*., 1999).

در یک پژوهش جوانه‌های گیاه دارویی سرخارگل را با چند استرین اگروباکتریوم رایزوژنز برای تشکیل ریشه‌های مویین تلقیح کردند. تلقیح با استرین‌هایLMG63 و LMG150 فقط تشکیل کالوس را نشان داد. در حالی که تلقیح با استرین‌های R1601 و ATCC15834 نتیجه‌اش تشکیل ریشه‌های مویین بود به‌هرحال بهترین استرین جهت ایجاد ریشه‌های مویین در این گیاه استرین A4 بود (*Trypsteen et al*., 1991).

بوچو وانگ و همکاران در سال ۲۰۰۶ القا ریشه‌های مویین در گیاه سرخارگل با استفاده از سه استرین مختلف اگروباکتریوم رایزوژنز (A_4 , R_{1601}, R_{1000}) و سه ریزنمونه مختلف در یک پژوهش

انجام دادند. درصد انتقال ژن در برگ‌های سرخارگل با A_4 , R_{1601} و R_{1000} به‌ترتیب ۸۰٪ و ۶۰٪ و ۴۰٪ بود و در برگ همراه با شاخه به‌ترتیب ۱۰٪ و ۳۰٪ و ۴۵٪ بود. ترکیبات پلی‌ساکاریدی و فنولیکی در ریشه‌های مویین القا شده و ریشه‌های القا نشده پس از گذشت دو ماه از کشت اندازه‌گیری شدند. برای ریشه‌های القا شده میزان مواد فنولیکی و پلی‌ساکاریدی به‌ترتیب ۲۳۶ و ۱۸/۹ میلی‌گرم در گرم ماده خشک گیاه بود و میزان همین ترکیبات در ریشه‌های القا نشده ۱۶۱/۵ و ۳۳/۳ میلی‌گرم در گرم ماده خشک گیاه بود. تنوع در ریزنمونه و اگروباکتریوم رایزوژنز تاثیر زیادی روی القا ریشه‌های مویین دارد . در ریزنمونه‌های برگ و دمبرگ دریافتند که برگ بهتر از دمبرگ ریشه مویین تولید می‌کند (*wang et al*., 2006).

انتقال ژن در *Saussurea involucrate* به‌وسیله اگروباکتریوم رایزوژنز برای القا ریشه مویین و تولید سیرینژن: در این پژوهش چهار استرین باکتری (A_4, LB_{9402}, R_{1000}, R_{1601}) و سه نوع ریزنمونه، پهنک برگ، دمبرگ و ریشه استفاده شد. در ریزنمونه‌های القا شده با استرین‌های R_{1601}, R_{1000} و LB_{9402} بیش از ۱۰۰ رشته ریشه مویین به‌دست آمد در حالی که استرین A4 چنین اثری نداشت. بهترین درصد بازده انتقال ژن ۶۷٪ بود که با استفاده از استرین R_{1601} روی ریزنمونه ریشه به‌دست آمد. در یک لاین ریشه مویین جدا شده از این ترکیب، $HR_{1601\text{-}1}$، ماده سیرینژن تا حد ۴۳/۵-۱/۱۳ میلی‌گرم در گرم ماده خشگ تولید شد این مقدار تولیدی تقریبا ۵۰ برابر بیشتر از مقدار این ماده در گیاهان نوع وحشی بود. دو لاین دیگر، $HR_{1000\text{-}1}$ و $HRLB_{9402\text{-}1}$، از ریشه‌های القا شده با دو استرین R_{1000} و LB_{9402} جدا کردند که توانایی بالایی در تولید ماده سیرینژن داشتند (۳/۰۸-۳۲/۵ و ۱/۳۷-۳۹/۷ میلی‌گرم در گرم ماده خشک) (*Chun. Xiang fu et al*., 2005).

طیبه سلیمانی و همکاران در سال ۱۳۹۰ در یک پژوهش از ریزنمونه‌های برگی و گیاهچه‌های کامل باباآدم[1] برای القا ریشه‌های مویین با سوسپانسیون اگروباکتریوم رایزوژنز استفاده کرد. وقتی ریزنمونه‌های برگ و سوسپانسیون باکتری برای القا ریشه‌های مویین استفاده شد بافت گیاهی قهوه‌ای

[1] *Arctium lappa L.*

شد و ریشه مویین ایجاد نشد ولی وقتی از گیاهچه کامل برای آلوده‌کردن با اگروباکتریوم رایزوژنز استفاده شد، از حدود ۲۰۰ جایگاه زخمی در گیاهچه‌ها، در نه جایگاه ریشه‌های مویین ظاهر شدند. محل ظهور ریشه‌ها، طوقه، ریشه و گیاهچه‌ها بود. مورفولوژی ریشه‌ها با ریشه طبیعی گیاه متفاوت بوده و آن‌ها به‌صورت متراکم و از یک نقطه منفرد در محل زخم و یا نزدیک به آن ظاهر شدند. استرین اگروباکتریوم رایزوژنز در این پژوهش AR_{15834} بود.

عزیزی و همکاران در سال ۱۳۸۶ واکنش ریشه‌زایی برخی از گیاهان باغبانی در تلقیح با اگروباکتریوم رایزوژنز مطالعه کردند. به‌منظور تحریک ریشه‌زایی و تولید ریشه‌های تراریخته با استفاده از دو استرین اگروباکتریوم رایزوژنز (A_4 و GM_{19534}) و روی سه نوع شاخه (سرشاخه‌های فصل جاری، شاخه‌های یک تا دو ساله و شاخه‌های پنج تا شش ساله) برخی از گیاهان باغی صورت گرفت. در بخش اول آزمایشات (in vitro): ریزنمونه‌های زرشک بیدانه وگیاهچه‌های استریل اسطوخدوس تحت تلقیح باکتریایی قرار گرفتند. بخش دوم آزمایشات در گلخانه (in vivo) و با دو نوع تلقیح: اول تلقیح قلمه‌ها (زرشک بیدانه و فیکوس بنجامین) و دوم القا باکتریایی به روش خوابانیدن هوایی (زرشک بیدانه، رز، رزماری و فیکوس بنجامین) صورت گرفت. ریشه‌زایی گیاهچه‌های استریل اسطوخدوس در تلقیح با استرین GM_{19534} نسبت به استرین A_4 و شاهد، افزایش معنی‌داری نشان داد. در ساقه‌های خشبی (۱ تا ۲ ساله) رزماری تلقیح شده به روش خوابانیدن هوایی با استرین GM_{19534} نسبت به استرین A_4 و شاهد افزایش معنی‌داری داشت. ریشه‌زایی قلمه‌های جوان (۱ تا ۲ ساله) بنجامین و ساقه‌های خشبی (۱ تا ۲ ساله) رز که به روش خوابانیدن هوایی با استرین GM_{19534} تلقیح شدند، نسبت به استرین A_4 و شاهد افزایش معنی‌داری نشان داد (عزیزی و همکاران، ۱۳۸۶).

در یک پژوهش تاثیر دو استرین LB_{9402} و LBR_{56} را روی القا ریشه‌های مویین و در نتیجه افزایش بیوماس ریشه‌ها در گیاه *Glycyrrhiza glabra* L. بررسی کردند. فقط استرین LBR_{56} باعث

افزایش در بازدهی انتقال ژن نسبت به گونه وحشی نشان داد. این افزایش نتیجه تلقیح مستقیم با استرین LBR_{56} اگروباکتریوم رایزوژنز در شرایط این‌ویترو بود (*Gabriela et al.*, 2008).

فصل سوم:

مواد و روش ها

۳ مواد و روش‌ها

در این پژوهش از سه استرین مختلف اگروباکتریوم رایزوژنز و دو هورمون اکسین(نفتالین استیک اسید و ایندول بوتریک اسید) و ریزنمونه گیاهی قلمه‌های ساقه درخت سرخدار استفاده شد. استرین‌های باکتری شامل A_4 و LB_{9402} و $C_{58}C_2$ بود. هورمون نفتالین استیک اسید در غلظت‌های ۰، ۵۰۰ و ۲۵۰۰ پی‌پی‌ام و هورمون ایندول بوتریک اسید در غلظت‌های ۰، ۵۰۰، ۲۵۰۰ و ۵۰۰۰ پی‌پی‌ام استفاده شد.

۳-۱ سال و خصوصیات محل آزمایش

این آزمایش در آذرماه سال ۱۳۹۲ در دانشکده کشاورزی دانشگاه شاهرود در طول جغرافیایی ۵۸ دقیقه و ۵۴ درجه و عرض جغرافیایی ۳۶ درجه و ۲۵ دقیقه، ارتفاع از سطح دریا ۱۳۸۰ متر و آب و هوای سرد و خشک با میزان بارندگی سالانه ۱۸۰ میلی‌متر انجام شد.

۳-۲ طرح آزمایش

این پژوهش به‌صورت آزمایش فاکتوریل در غالب طرح کاملا تصادفی با سه تکرار انجام شد. فاکتور اول شاهد بدون باکتری و هورمون، فاکتور دوم سه استرین آگروباکتریوم (A_4, LB_{9402}, $C_{58}C_2$ و بدون باکتری)، فاکتور سوم هورمون ایندول بوتریک اسید در چهار سطح (۰، ۵۰۰، ۲۵۰۰ و ۵۰۰۰ پی‌پی‌ام) و فاکتور چهارم هورمون نفتالین استیک اسید در سه سطح (۰، ۵۰۰ و ۲۵۰۰ پی‌پی‌ام) بودند. قلمه‌ها به‌صورت ردیفی کشت گردید (هر ردیف یک تیمار بود که نوع تیمار هر ردیف را با زدن اتیکت مشخص شد). برای آنالیز داده‌ها از نرم‌افزار SAS 9.1 و Mstat-c استفاده شد. با آزمون LSD مقایسه میانگین‌ها در سطح ۵٪ را انجام شد.

۳-۳ مواد گیاهی(آماده سازی قلمه‌ها)

قلمه‌های ساقه از شاخه‌های جوان درخت همیشه سبز سرخدار، *Taxus bacata* در *فصل پاییز(آذر ماه)* تهیه گردید. این درخت در جنگل‌های علی‌آباد کتول واقع در گرگان با موقعیت جغرافیایی، طول جغرافیایی ۵۴ درجه و ۵۲ دقیقه و عرض جغرافیایی ۳۶ درجه و ۵۴ دقیقه، ارتفاع از

سطح دریا ۱۴۰ متر و آب و هوای معتدل و مرطوب با میزان بارندگی سالانه ۵۰۰-۶۰۰ میلی‌متر رشد می‌یابد. پس از تهیه قلمه‌های ساقه، به گلخانه دانشکده کشاورزی دانشگاه شاهرود انتقال داده شد. قلمه‌ها در اندازه‌های ۲۰ سانتی‌متر با قطر متوسط برش داده و تا زمان آماده شدن تیمارها، آن‌ها را در گلخانه در دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد با قرار دادن انتهای آن‌ها در آب نگهداری شد.

۳-۴ استرین‌های باکتری

اگروباکتریوم رایزوژنز را که شامل سه استرین(A_4, LB_{9402}, $C_{58}C_2$) بود از واحد تحقیقات جهاد دانشگاهی دانشگاه شهید بهشتی تهیه گردید. پلیت‌های حاوی باکتری روی یخ در یخدان کوچکی از تهران به شاهرود حمل شد سپس آن‌ها در یخچال با دمای ۵ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

برای کشت استرین‌های باکتری، محیط کشت LB(مایع) را آماده کردیم (۱۳ گرم پودر محیط LB را در یک لیتر آب مقطر اتوکلاو شده با استفاده از هیترهمزن حل کردیم). پس از آماده شدن محیط کشت باکتری دوباره اتوکلاو گردید. پلیت‌های حاوی باکتری، خلال دندان‌های اتوکلاو شده و محیط کشت LB اتوکلاو شده زیر هود قرار داده شد. برای کشت باکتری، نوک خلال دندان‌ها را آهسته روی تک‌تک پلیت‌های استرین‌های باکتری به‌صورت جداگانه کشیده و پس از آغشته شدن به باکتری، آن‌ها داخل محیط‌های LB جداگانه انداخته شد و درب ارلن‌های حاوی محیط کشت LB با فویل و پنبه پوشانده شد. بعد از کشت استرین‌ها، محیط کشت‌های حاوی باکتری جهت تکثیر به‌دستگاه شیکرانکوباتور که روی دمای ۲۸ درجه و تاریکی تنظیم شده بود انتقال گردید. بعد از گذشت دو روز، سوسپانسیون‌های حاوی باکتری‌ها از شیکرانکوباتور خارج و برای بررسی میزان تکثیر باکتری (سنجش OD) از دستگاه اسپکتروفتومتر استفاده شد. برداشتن نمونه از سوسپانسیون‌های حاوی باکتری‌ها برای اندازه‌گیری OD، زیر هود و تحت شرایط استریل انجام شد (OD_{600}=0/06 موردنظر بود). بعد از سنجش OD نمونه‌ها با دستگاه اسپکتروفتومتر، سوسپانسیون‌هایی که OD بالاتری نسبت به OD مورد نظر راداشت با آب مقطر استریل شده رقیق گردید تا به OD_{600}=0/06

برسد و اگرOD کمتر از حد مورد نظر بود آن‌ها را دوباره به‌دستگاه شیکرانکوباتور برگردانده تا تکثیر کرده و به OD لازم برسد.

۳-۵ هورمون‌های اکسین

محلول هورمون نفتالین استیک اسید را در غلظت‌های ۰، ۵۰۰ و ۲۵۰۰ پی‌پی‌ام و ایندول بوتریک اسید را در غلظت‌های ۰، ۵۰۰، ۲۵۰۰ و ۵۰۰۰ پی‌پی‌ام تهیه گردید. برای تهیه محلول هورمون ایندول بوتریک اسید در غلظت ۵۰۰۰ پی‌پی‌ام: ۲/۵ گرم از پودر هورمون برداشته و در ۵ سی‌سی اتانول۷۰٪ حل شد، سپس با آب مقطر استریل شده به حجم ۵۰۰ سی‌سی رسانده و برای حل شدن هورمون، محلول روی هیترهمزن با گرمای ضعیف قرار داده شد. بعد از این‌که غلظت ۵۰۰۰ پی‌پی‌ام آماده شد برای تهیه غلظت ۲۵۰۰ پی‌پی‌ام از محلول هورمون ۵۰۰۰ پی‌پی‌ام،۲۵۰ سی‌سی برداشته و دوباره با آب مقطر استریل شده به حجم ۵۰۰ سی‌سی رسانده و محلول آماده شده روی هیترهمزن برای حل شدن هورمون قرار داده شد. در نهایت برای تهیه غلظت ۵۰۰ پی‌پی‌ام از محلول هورمون ۲۵۰۰ پی‌پی‌ام، ۵۰ سی‌سی برداشته و با آب مقطر استریل شده به حجم ۵۰۰ سی‌سی رسانده شد، بدین ترتیب سه غلظت هورمون ایندول بوتریک اسید تهیه گردید. تهیه غلظت‌های هورمون نفتالین استیک اسید به همین منوال بوده است و دو غلطت ۵۰۰ و ۲۵۰۰ پی‌پی‌ام این هورمون نیز تهیه گردید.

۳-۶ تیمار کردن قلمه‌ها

بعد از تهیه سوسپانسیون حاوی باکتری و غلظت‌های مورد نیاز از هورمون‌های ایندول بوتریک اسید و نفتالین استیک اسید، قلمه‌های ساقه سرخدار با آن‌ها تیمار گردید.

۳-۷ نحوه تیمار کردن قلمه با غلظت‌های مختلف هورمون‌های اکسینی

انتهای قلمه‌ها در محلول هورمون قرار داه شد، که بسته به غلظت هورمون، زمان نگه داشتن ته قلمه در محلول فرق داشت. برای هورمون‌های ایندول بوتریک اسید و نفتالین استیک اسید با غلظت

۵۰۰ پی‌پی‌ام، باید ته قلمه را از روز قبل به مدت ۱۶ ساعت در محلول هورمون قرار داده شد. ولی برای غلظت‌های ۲۵۰۰ و ۵۰۰۰ پی‌پی‌ام برای چند ثانیه (۱۵ ثانیه) ته قلمه‌ها در محلول هورمون غوطه‌ور شده و بعد از آغشته شدن به هورمون از محلول خارج گردید. تعدادی از قلمه‌ها به‌عنوان شاهد به هورمون آغشته نشد.

۳-۸ نحوه آلوده کردن ریزنمونه‌ها توسط باکتری جهت القای ریشه مویین

بعد از تیمار قلمه‌ها با هورمون‌ها، انتهای قلمه‌های آغشته به هورمون و تعدادی از شاهدها به مدت ۱۵ دقیقه در سوسپانسیون حاوی باکتری شناور گردید. در این تیمار نیز مانند تیمار هورمونی تعدادی از ریزنمونه‌ها بدون تلقیح با باکتری به‌عنوان شاهد نگه داشته شد. بعد از تلقیح ته قلمه با باکتری، قلمه‌های آغشته به هورمون، قلمه‌های تلقیح شده با باکتری، قلمه‌های دارای هر دو تیمار و قلمه‌های شاهد (قلمه بدون هیچ تیمار ریشه‌زایی) در بستر کشت از قبل آماده شده که شامل ۵۰٪ پیت و ۵۰٪ پرلیت بود در عمق ۱۰ سانتی‌متر کشت گردید (شکل۳-۱).

۳-۹ شرایط نگهداری قلمه‌های سرخدار

قلمه‌ها در دمای متوسط ۲۵ درجه سانتی‌گراد در گلخانه کشت شدند. برای گرم کردن گلخانه از شوفاژ استفاده شد. برای تامین رطوبت مورد نیاز قلمه‌ها (رطوبت ۸۰٪) در طول دوره ریشه‌دهی میست به‌طور مرتب روزانه پنج بار و هر بار به مدت ۱۵ دقیقه آب را روی قلمه‌ها مه‌افشانی می‌کرد. در اوایل دوره برای تامین رطوبت مورد نیاز قلمه روی قلمه‌ها با پلاستیک گلخانه‌ای پوشانده شد. بعد از گرم شدن هوا در اوایل فروردین‌ماه پلاستیک از روی قلمه‌ها جمع گردید. قلمه‌ها به‌تدریج اواخر بهمن‌ماه شروع به تشکیل برگچه‌های جدید کردند.

۳-۱۰ نمونه‌برداری

از فروردین‌ماه سال ۱۳۹۲ به‌طور تصادفی قلمه‌ها را از بستر کشت خارج و بررسی گردید و مشاهده شد که قلمه‌ها کالوس‌دار شده‌اند. در اواخر فروردین‌ماه با بررسی کردن قلمه‌ها متوجه

ریشه‌دهی آن‌ها شده و از همین زمان تا نیمه اول شهریور با توجه به نوع و غلظت هورمون و استرین باکتری قلمه‌ها ریشه مویین تشکیل دادند، قلمه‌ها از بستر کشت خارج کرده و پس از شستشوی کامل ته قلمه‌ها تعداد ریشه، طول ریشه و درصد ریشه‌زایی را اندازه‌گیری گردید. اگر قلمه‌ها هنوز در مرحله کالوس مانده بودند دوباره به بستر کشت برمی‌گردانده تا به مرحله ریشه‌دهی برسند. در اواخر شهریورماه تمام قلمه‌های کشت شده از بستر کشت خارج و به‌صورت جداگانه در گلدان‌های پلاستیکی کوچک کشت گردید. محیط کشت قلمه‌ها در گلدان‌ها شامل شن و ماسه و در لایه سطحی پیت و پرلیت در نظر گرفته شد.

۳-۱۱ صفات مورد اندازه‌گیری

صفات مورد بررسی در این پژوهش: درصد ریشه‌زایی، طول ریشه، تعداد ریشه، درصد کالوس‌زایی کل، تعداد ریشه فرعی و میزان افزایش طول ریشه ایجاد شده بود. طول ریشه با خط‌کش بر حسب سانتی‌متر اندازه‌گیری شد. در صورت زیاد بودن تعداد ریشه‌ها، پنج ریشه از قلمه انتخاب کرده و میانگین آن‌ها را یادداشت گردید. برای اندازه‌گیری درصد کالوس‌زایی و درصد ریشه‌زایی، تعداد قلمه‌های کالوس‌دار شده و ریشه‌دار شده شمارش شده و نسبت به تعداد کل قلمه‌ها تناسب بسته شده و بر حسب درصد بیان گردید.

شکل ۳-۱ بستر کشت قلمه‌های سرخدار(تیمار استرین A_4 و غلظت‌های مختلف هورمون‌های NAA و IBA)

فصل چهارم

نتایج و بحث

٤ نتایج

جدول ۴-۱ تجزیه واریانس اثر تیمارهای مختلف استرین‌های اگروباکتریوم رایزوژنز و غلظت‌های مختلف هورمون‌های NAA و IBA

منابع تغییرات	درجه آزادی	صفات					
		درصد ریشه‌زایی	تعداد ریشه	متوسط طول ریشه (سانتی‌متر)	درصد کالوس‌زایی	بلندترین طول ریشه (سانتی‌متر)	ریشه فرعی
باکتری	۳	۲۲/۶۲*	۱۱/۷۹*	۱/۳۴*	۶۲/۷۷*	۰/۳۴n.s	۳/۰۹**
NAA	۲	۶/۱۵*	۹/۸۷*	۱/۴۲n.s	۱۵/۱۴*	۰/۹n.s	۲/۷۶n.s
IBA	۳	۲/۸۱*	۴/۵*	۳/۲۳*	۰/۳۲*	۴/۸۲*	۳/۴۸*
B*N	۶	۰/۷۵n.s	۲/۴۸**	۲/۶۷*	۱/۲۴n.s	۳/۱۳*	۱/۱۸n.s
B*I	۹	۰/۷۹*	۰/۸۱n.s	۱/۰۶**	۵/۴۱*	۱/۵۵n.s	۴/۲۰*
N*I	۶	۴/۰۹*	۲/۲۲**	۲/۴۱*	۶/۲۸*	۳/۰۶*	۱/۶۵n.s
B*N*I	۱۸	۱/۶۷**	۱/۲۶n.s	۰/۶۵n.s	۳/۰۴**	۰/۹۴n.s	۱/۰۸n.s
خطا		۲/۸۴۰	۱/۰۱۲	۰/۴۵۷	۰/۷۹۹	۰/۴۲۶	۳/۰۲۷
CV%		۲۳	۲۷	۲۸	۱۳	۲۷	۳۰

* و ** و n.s به‌ترتیب نشان‌دهنده معنی‌دار بودن در سطح ۵٪ و ۱٪ و غیرمعنی‌دار بودن میانگین‌ها می‌باشد

۴-۱ درصد کالوس‌زایی کل

طبق جدول تجزیه واریانس (جدول ۴-۱)، آنالیز آماری نشان داد که استرین‌های باکتری اگروباکتریوم رایزوژنز و هورمون‌های ایندول بوتریک اسید و نفتالین استیک اسید، اثر متقابل استرین باکتری و هورمون ایندول بوتریک اسید، اثر متقابل هورمون‌های نفتالین استیک اسید و ایندول بوتریک اسید در سطح پنج درصد و اثر سه‌گانه استرین باکتری و هورمون‌های نفتالین استیک اسید و ایندول بوتریک اسید در سطح یک درصد اثر معنی‌داری در درصد کالوس‌زایی کل قلمه‌های سرخدار داشتند. اثر متقابل استرین باکتری و هورمون نفتالین استیک اسید تأثیر معنی‌داری در افزایش درصد کالوس‌زایی نشان ندادند.

غلظت‌های مختلف هورمون نفتالین استیک اسید، ایندول بوتریک اسید و استرین‌های مختلف اگروباکتریوم رایزوژنز تفاوت های معنی‌داری در درصد کالوس‌زایی قلمه‌های سرخدار به‌وجود آوردند.

زمانی که از استرین‌های مختلف اگروباکتریوم رایزوژنز بدون حضور غلظت‌های مختلف هورمون‌های نفتالین استیک اسید و ایندول بوتریک اسید جهت القای ریشه مویین در قلمه‌های سرخدار استفاده شد بیشترین درصد کالوس‌زایی(۶۰/۳۷٪) در تیمار استرین A_4 و استرین LB_{9402}(۵۸/۷۳٪) نسبت به شاهد(۳۹/۲۳٪) و استرین $C_{58}C_2$(۲۷/۷۷٪) مشاهده گردید (شکل ۴-۲).

در تیمار غلظت‌های مختلف هورمون نفتالین استیک اسید، بیشترین درصد کالوس‌زایی(۵۱/۸۲٪) در غلظت ۲۵۰۰ پی‌پی‌ام از هورمون مذکور به‌دست آمده است که با غلظت ۵۰۰ پی‌پی‌ام اختلاف معنی‌داری نداشت (شکل ۴-۳). در تیمار هورمونی غلظت‌های مختلف هورمون ایندول بوتریک اسید بیشترین درصد کالوس‌زایی(۵۸/۹۹٪) مربوط به غلظت ۵۰۰۰ پی‌پی‌ام بوده است(شکل ۴-۴).

با نتیجه به‌دست آمده از اثرات متقابل استرین‌های مختلف اگروباکتریوم رایزوژنز و غلظت‌های مختلف هورمون نفتالین استیک اسید مشاهده گردید که بیشترین درصد کالوس‌زایی(۶۵/۳۷٪) زمانی بوده است که قلمه‌های سرخدار با استرین A_4 در حضور هورمون نفتالین استیک اسید با غلظت ۲۵۰۰ پی‌پی‌ام تلقیح شده اند.

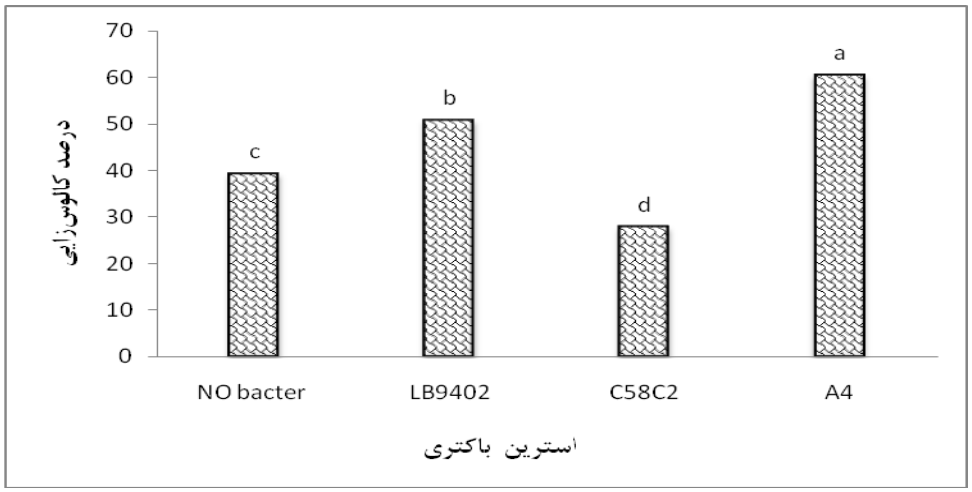
تیمار استرین LB_{9402} نیز در حضور غلظت ۲۵۰۰ پی‌پی‌ام هورمون نفتالین استیک اسید درصد کالوس‌زایی بالایی(۶۱/۴۵٪) را نشان داده است که نسبت به درصد کالوس‌زایی شاهد(۳۵/۴۱٪) تفاوت معنی‌داری را نشان می‌دهد(پیوست دو).

نتایج حاصل از اثر متقابل استرین‌های مختلف اگروباکتریوم رایزوژنز و غلظت‌های مختلف هورمون ایندول بوتریک اسید نشان داد که بیشترین درصد کالوس‌زایی(۷۰/۸۸) در تیمار استرین A_4 و غلظت ۵۰۰۰ پی‌پی‌ام ایندول بوتریک اسید بوده است که اختلاف معنی‌داری با غلظت ۲۵۰۰ پی‌پی‌ام نداشت. استرین LB_{9402} به همراه غلظت ۵۰۰۰ پی‌پی‌ام ایندول بوتریک اسید نیز به‌طور معنی‌داری درصد کالوس‌زایی بالاتری نسبت به شاهد و استرین $C_{58}C_2$ با غلظت‌های مختلف ایندول بوتریک اسید نشان داد(شکل ۴-۵ و شکل ۴-۱).

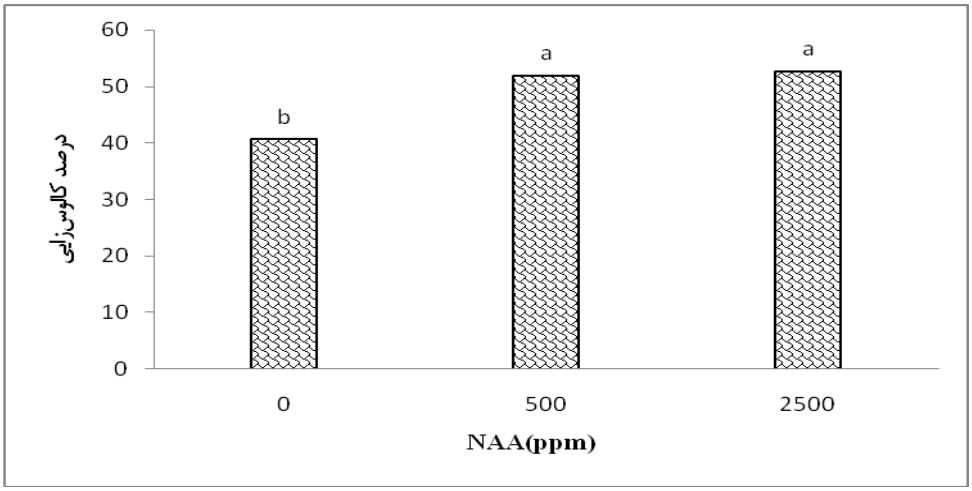
در تیمار غلظت‌های مختلف هورمون‌های نفتالین استیک اسید و ایندول بوتریک اسید، بیشترین درصد کالوس‌زایی(۶۵/۳۷٪) در غلظت‌های ۲۵۰۰ پی‌پی‌ام هورمون نفتالین استیک اسید و ۵۰۰۰ پی‌پی‌ام هورمون ایندول بوتریک اسید مشاهده شده است. که نسبت به شاهد ۳۴٪ افزایش درصد کالوس‌زایی را نشان دادند(شکل ۴-۶).

در اثرات سه‌گانه زمانی که استرین‌های مختلف اگروباکتریوم رایزوژنز و غلظت‌های مختلف هورمون‌های نفتالین استیک اسید و ایندول بوتریک اسید همزمان با هم استفاده کردیم بیشترین درصد کالوس‌زایی(۱۰۰٪) را در تیمار استرین A_4 با غلظت‌های ۲۵۰۰ پی‌پی‌ام از هورمون نفتالین استیک اسید و ۵۰۰۰ پی‌پی‌ام از هورمون ایندول بوتریک اسید و استرین LB_{9402} با غلظت‌های ۲۵۰۰ پی‌پی‌ام از هورمون نفتالین استیک اسید و ۵۰۰۰ پی‌پی‌ام از هورمون ایندول بوتریک اسید با میزان ۹۹/۷٪ به‌دست آوردیم(شکل ۴-۷).

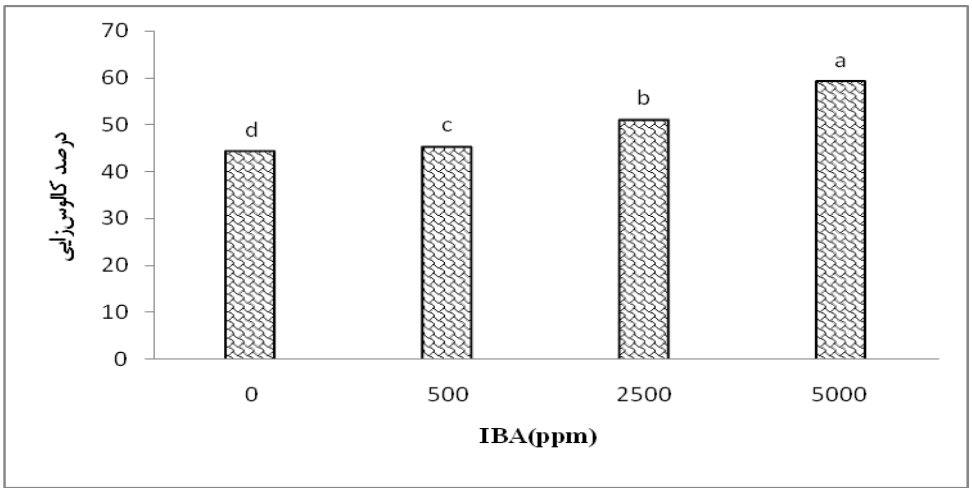
شکل ۴-۱ کالوس های قلمه‌های سرخدار در اثر متقابل تیمار با استرین A_4 و هورمون IBA در هفته چهارم کشت در بستر ریشه‌زایی



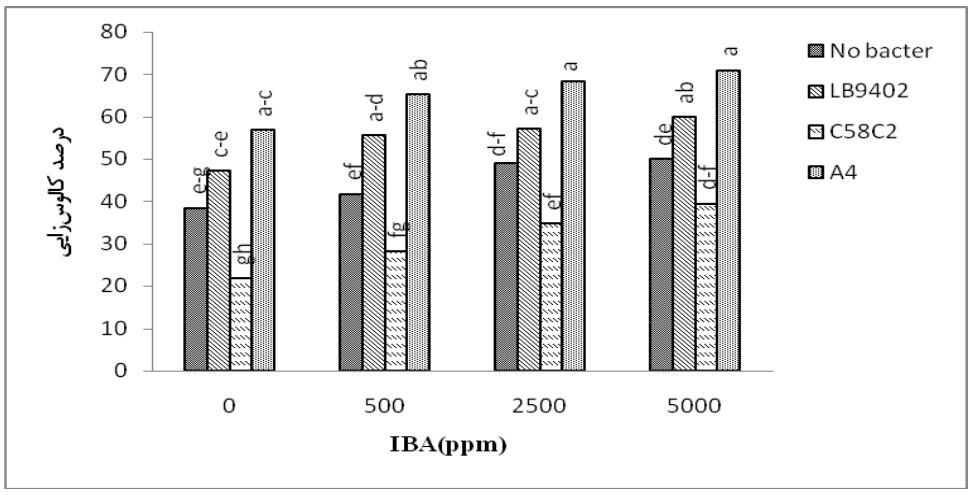
شکل ۴-۲ تاثیراسترین‌های باکتری اگروباکتریوم رایزوژنز بر درصد کالوس‌زایی قلمه‌های سرخدار



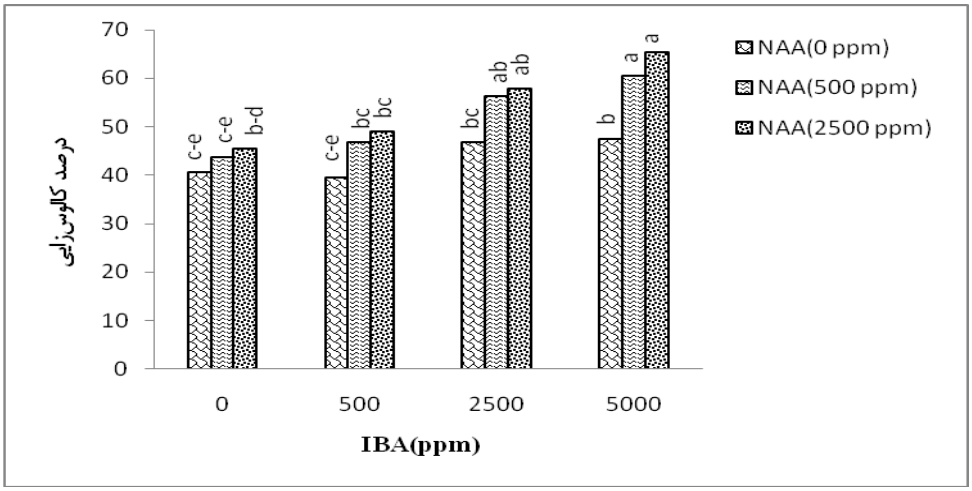
شکل ۴-۳ تاثیر غلظت‌های مختلف هورمون NAA (پی‌پی‌ام) بر درصد کالوس‌زایی قلمه‌های سرخدار



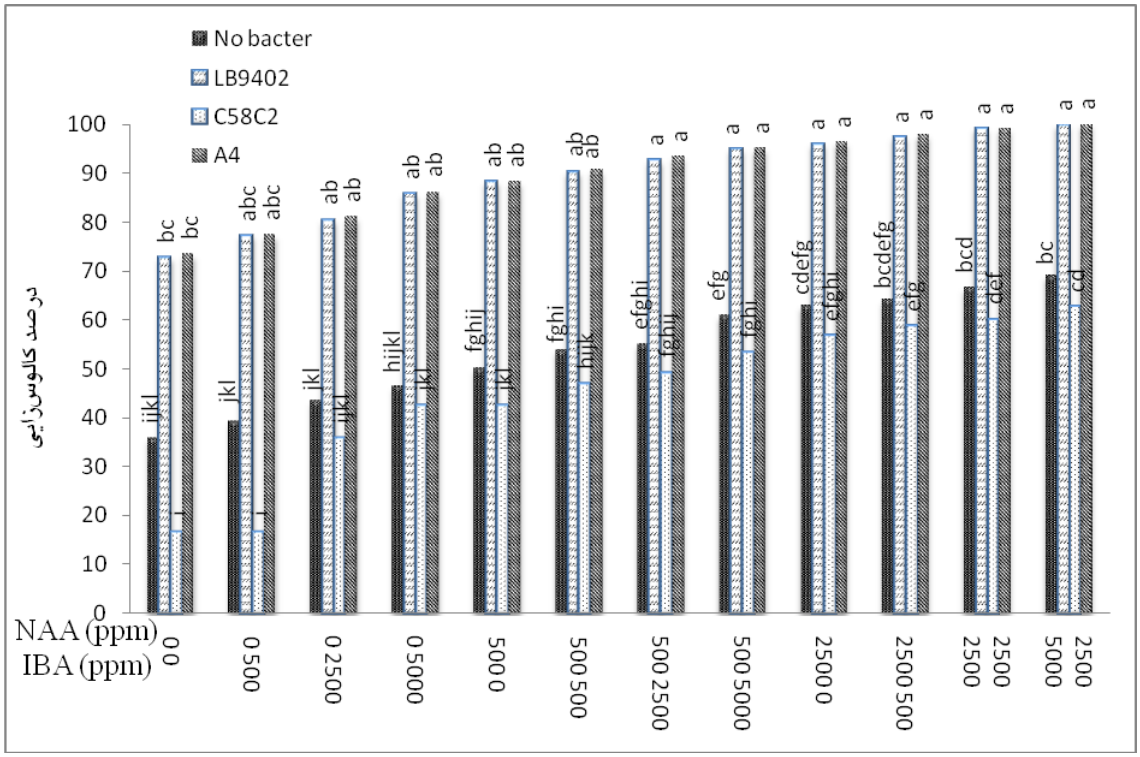
شکل ۴-۴ تاثیر غلظت‌های مختلف IBA (پی‌پی‌ام) بر درصد کالوس‌زایی قلمه‌های سرخدار



شکل ۴-۵ تاثیر استرین‌های باکتری اگروباکتریوم رایزوژنز و غلظت‌های مختلف IBA (پی‌پی‌ام) بر درصد کالوس‌زایی قلمه‌های سرخدار



شکل ۴-۶ تاثیر غلظت‌های مختلف هورمون‌های NAA و IBA (پی‌پی‌ام) بر درصد کالوس‌زایی قلمه‌های سرخدار



شکل ۴-۷ تاثیر استرین‌های باکتری اگروباکتریوم رایزوژنز و غلظت‌های مختلف هورمون‌های NAA و IBA (پی‌پی‌ام) بر درصد کالوس‌زایی قلمه‌های سرخدار

۴-۲ درصد ریشه‌زایی

نتایج جدول تجزیه واریانس نشان داد که استرین‌های باکتری، هورمون نفتالین استیک اسید، ایندول بوتریک اسید ، اثرات متقابل هورمون ایندول بوتریک اسید در نفتالین استیک اسید و اثرات متقابل استرین باکتری در هورمون ایندول بوتریک اسید در سطح پنج درصد و اثرات سه‌گانه باکتری در نفتالین استیک اسید و ایندول بوتریک اسید در سطح یک درصد در درصد ریشه‌زایی قلمه‌های سرخدار اثرات معنی‌داری دارند (جدول ۴-۱).

استرین‌های مختلف اگروباکتریوم رایزوژنز تفاوتهای معنی‌داری در درصد ریشه‌زایی به‌وجود آوردند. بیشترین درصد ریشه‌زایی قلمه‌ها(۵۲/۱۸٪) در تیمار استرین A_4 اگروباکتریوم رایزوژنز و در تیمار استرین LB_{9402} با درصد ۴۸/۰۵٪ به‌دست آمده است. کمترین درصد ریشه‌زایی(۲۱/۸۷٪) در تیمار با استرین $C_{58}C_2$ اگروباکتریوم رایزوژنز مشاهده شده است(شکل ۴-۸).

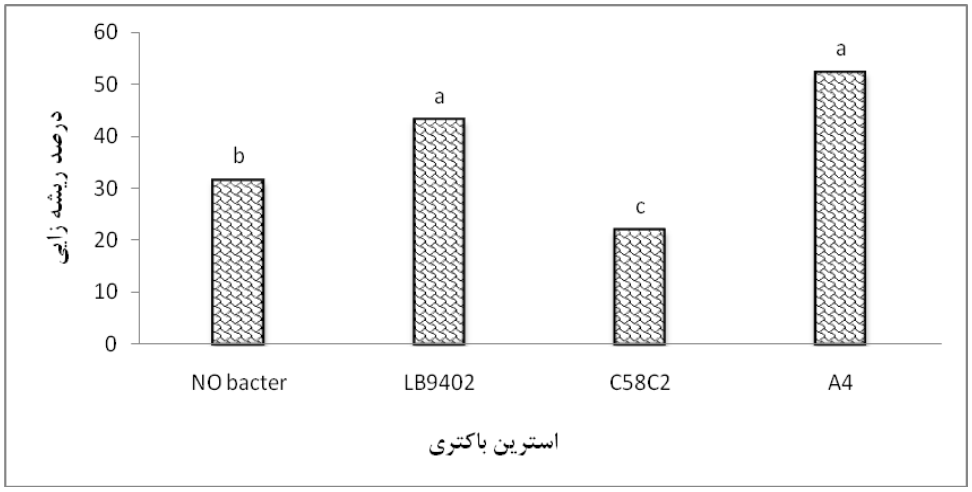
استرین A_4 باعث افزایش درصد ریشه‌زایی در قلمه‌های سرخدار نسبت به غلظت‌های مختلف هورمون نفتالین استیک اسید و هورمون ایندول بوتریک اسید و ۱۶/۱۸٪ افزایش نسبت به شاهد شده است. در تیمار با غلظت‌های مختلف نفتالین استیک اسید بیشترین درصد ریشه ایی(۴۲٪) در غلظت ۲۵۰۰ پی‌پی‌ام مشاهده شده است که یک افزایش ۱۲/۵٪ نسبت به شاهد را باعث شده است(شکل ۴-۹). در تیمار هورمونی با غلظت‌های مختلف ایندول بوتریک اسید بیشترین درصد ریشه‌زایی در غلظت ۵۰۰۰ پی‌پی‌ام(۴۵/۲۳٪) مشاهده شده است(شکل ۴-۱۰).

طبق مقایسه میانگین برهمکنش تیمارهای استرین‌های مختلف اگروباکتریوم رایزوژنز و غلظت‌های مختلف نفتالین استیک اسید بیشترین درصد ریشه‌زایی در تیمارهای استرین A_4 به همراه غلظت ۲۵۰۰ پی‌پی‌ام نفتالین استیک اسید (۵۲/۷۷٪) به‌دست آمده است. تیمار استرین LB_{9402} در حضور غلظت ۲۵۰۰ پی‌پی‌ام نفتالین استیک اسید نیز درصد بالایی از ریشه‌زایی(۴۹/۲۲٪) را نشان داده است که این تیمارهای اثر متقابل نسبت به شاهد به‌ترتیب ۲۱٪ و ۱۸٪ افزایش درصد ریشه‌زایی نسبت به شاهد داشتند(پیوست یک).

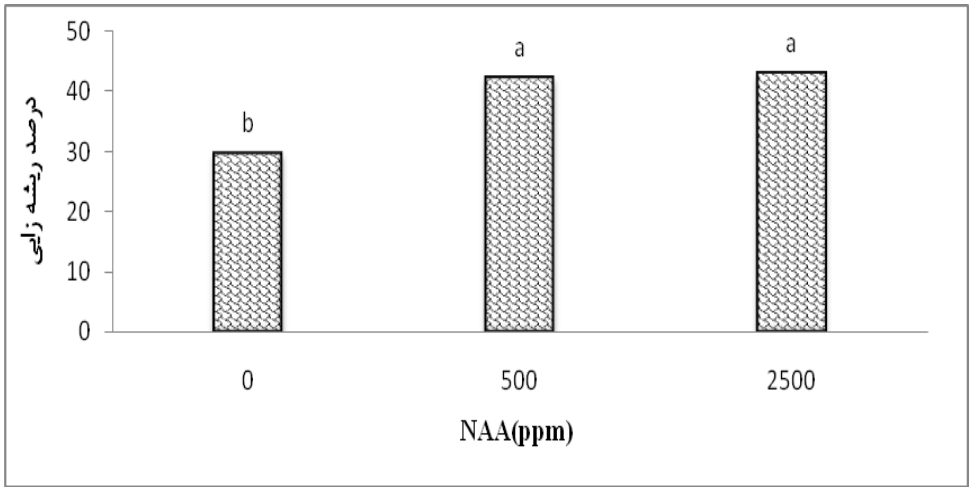
در تیمار استرین‌های مختلف اگروباکتریوم رایزوژنز و غلظت‌های مختلف هورمون ایندول بوتریک اسید بیشترین درصد ریشه‌زایی(۵۹/۱۶٪) در تیمار استرین A_4 در حضور غلظت ۵۰۰۰ پی‌پی‌ام هورمون مذکور به‌دست آمده است. تیمار استرین LB_{9402} به همراه غلظت ۵۰۰۰ پی‌پی‌ام هورمون ایندول بوتریک اسید نیز افزایش درصد ریشه‌زایی(۵۷/۲۹٪) نسبت به شاهد(۲۷٪) و استرین $C_{58}C_2$(۲۵٪) نشان داده است(شکل ۴-۱۱).

تیمار غلظت‌های مختلف نفتالین استیک اسید و ایندول بوتریک اسید بیشترین درصد ریشه‌زایی(۵۱/۰۴٪) را در غلظت‌های ۲۵۰۰ پی‌پی‌ام هورمون نفتالین استیک اسید و ۵۰۰۰ پی‌پی‌ام هورمون ایندول بوتریک اسید نشان داه است. که نسبت به شاهد(۲۶/۰۴٪) یک افزیش ۲۵٪ را نشان داد. غلظت ۵۰۰۰ پی‌پی‌ام از هورمون ایندول بوتریک اسید به همراه غلظت ۵۰۰ پی‌پی‌ام از هورمون نفتالین استیک اسید نیز درصد بالایی از ریشه‌زایی را نشان داد(۴۷/۹۱٪) که تفاوت قابل توجهی نسبت به غلظت بالاتر هورمون نفتالین استیک اسید در این تیمار نداشت(شکل ۴-۱۲).

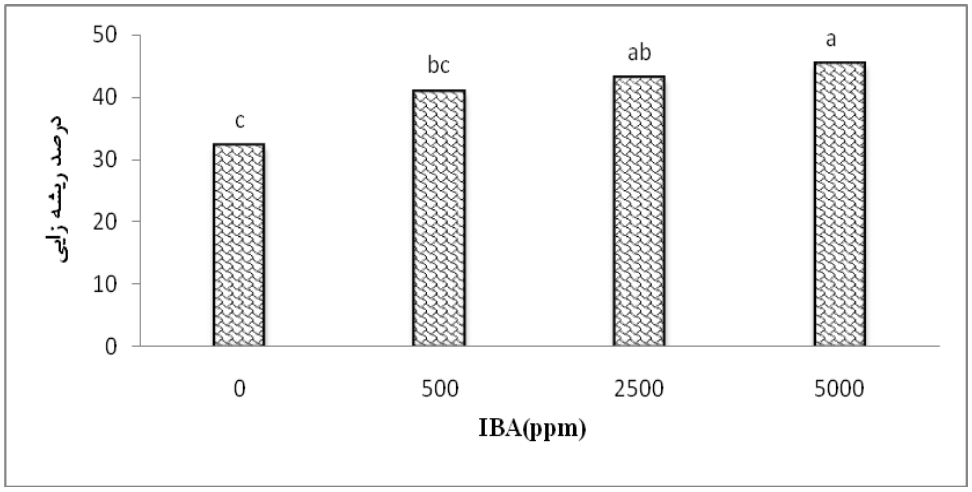
زمانی که استرین‌های مختلف اگروباکتریوم رایزوژنز و غلظت‌های مختلف هورمون‌های نفتالین استیک اسید و ایندول بوتریک اسید همزمان با هم استفاده شد نتایج به‌دست آمده نشان داد که بیشترین درصد ریشه‌زایی(۹۰/۶۶٪) را در تیمار استرین A_4 و غلظت ۲۵۰۰ پی‌پی‌ام نفتالین استیک اسید و ۵۰۰۰ پی‌پی‌ام ایندول بوتریک اسید و در تیمار استرین LB_{9402} در حضور غلظت‌های ۲۵۰۰ پی‌پی‌ام هورمون نفتالین استیک اسید و ۵۰۰۰ پی‌پی‌ام هورمون ایندول بوتریک اسید (۸۷/۵٪) شاهد بوده‌ایم که نسبت به شاهد(۲۵٪) تفاوت معنی‌داری را نشان دادند(شکل ۴-۱۳).



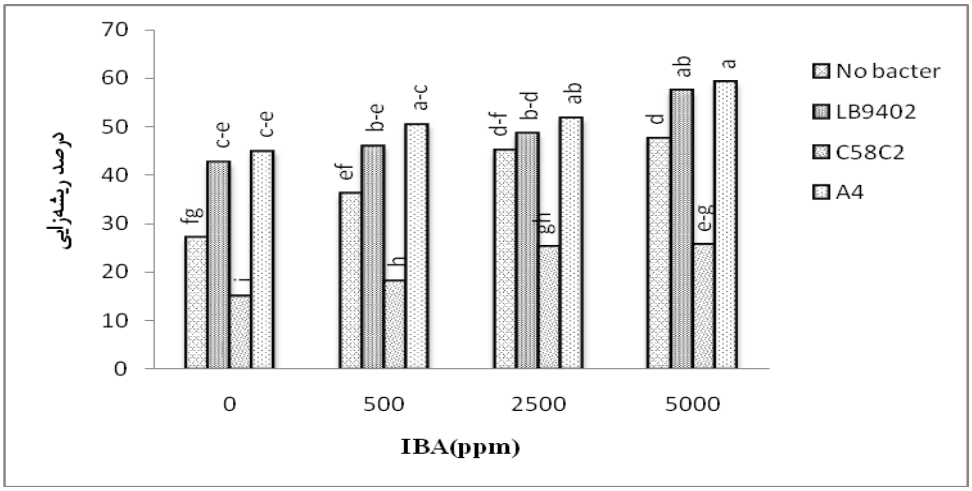
شکل ۴-۸ تاثیر استرین‌های باکتری اگروباکتریوم رایزوژنز بر میانگین درصد ریشه‌زایی قلمه‌های سرخدار



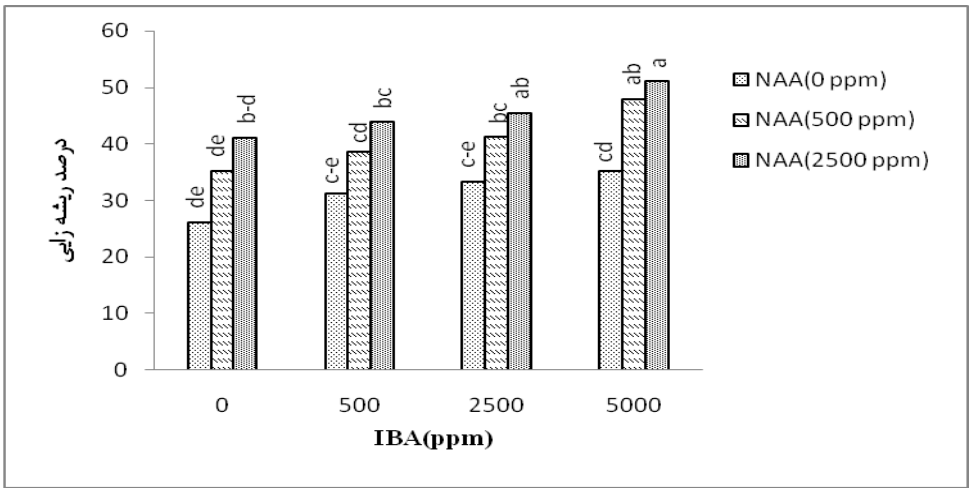
شکل ۴-۹ تاثیر غلظت‌های مختلف هورمون NAA (پی‌پی‌ام) بر میانگین درصد ریشه‌زایی قلمه‌های سرخدار



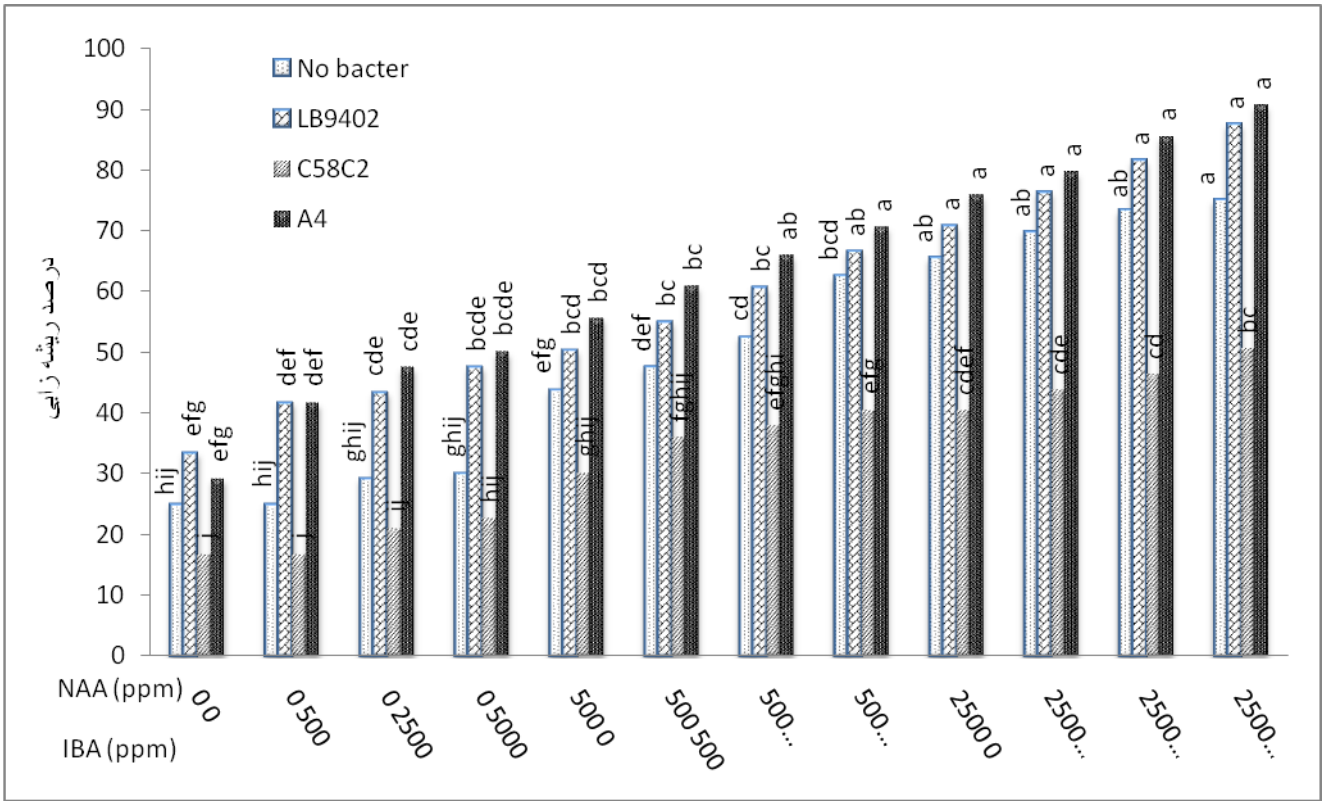
شکل ۴-۱۰ تاثیر غلظت‌های مختلف IBA (پی‌پی‌ام) بر میانگین درصد ریشه‌زایی قلمه‌های سرخدار



شکل ۴-۱۱ تاثیر استرین‌های باکتری اگروباکتریوم رایزوژنزو غلظت‌های مختلف IBA (پی‌پی‌ام) بر میانگین درصد ریشه‌زایی قلمه‌های سرخدار



شکل ۴-۱۲ تاثیر غلظت‌های مختلف هورمون‌های NAA و IBA (پی‌پی‌ام) بر میانگین درصد ریشه‌زایی قلمه‌های سرخدار



شکل ۴-۱۳ تاثیر استرین‌های باکتری اگروباکتریوم رایزوژنز و غلظت‌های مختلف هورمون‌های NAA و IBA (پی‌پی‌ام) بر درصد ریشه‌زایی قلمه‌های سرخدار

۴-۳ تعداد ریشه

طبق نتایج به‌دست آمده از جدول تجزیه واریانس مشاهده کردیم که استرین باکتری، هورمون‌های نفتالین استیک اسید و ایندول بوتریک اسید در سطح پنج درصد و اثر متقابل هورمون‌های نفتالین استیک اسید در ایندول بوتریک اسید و استرین باکتری در هورمون نفتالین استیک اسید در سطح یک درصد اثر معنی‌داری در افزایش تعداد ریشه‌های قلمه‌های سرخدار نشان دادند. تیمار اثر متقابل استرین باکتری در هورمون ایندول بوتریک اسید(پیوست یک) و اثر سه‌گانه استرین باکتری در هورمون‌های نفتالین استیک اسید و ایندول بوتریک اسید اثر معنی‌داری در افزایش تعداد ریشه قلمه‌ها نداشتند(جدول ۴-۱).

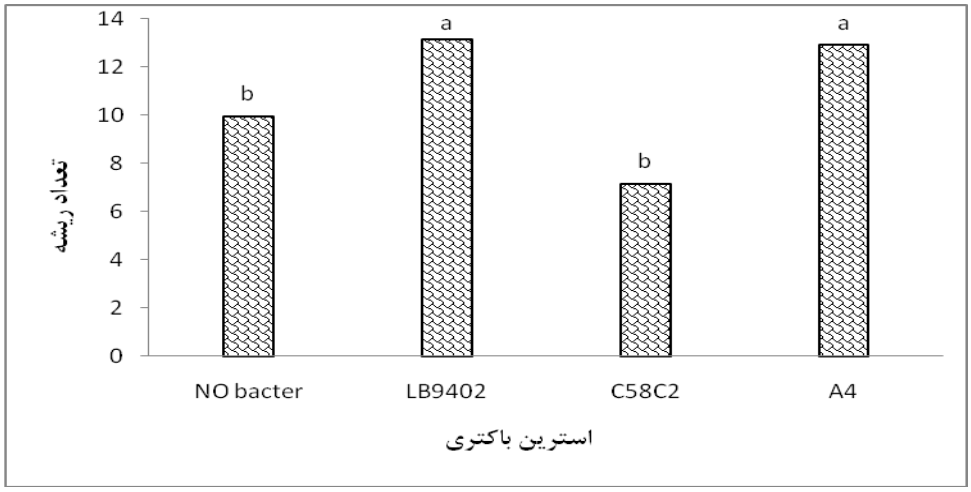
در تیمار تلقیح با استرین‌های مختلف اگروباکتریوم رایزوژنز بیشترین تعداد ریشه در استرین LB_{9402} و استرین A_4 به‌دست آمد(شکل ۴-۱۵). بیشترین تعداد ریشه (۲۰ عدد) در تیمار همزمان استرین A_4 و

غلظت ۲۵۰۰ پی‌پی‌ام هورمون نفتالین استیک اسید به‌دست آمده است (شکل ۴- ۱۸ و شکل ۴-۱۴). در تیمار غلظت‌های ۵۰۰۰ پی‌پی‌ام هورمون ایندول بوتریک اسید و ۲۵۰۰ پی‌پی‌ام هورمون نفتالین استیک اسید نیز افزایش در تعداد ریشه مویین مشاهده گردید (شکل ۴- ۱۹ و شکل ۴-۱۴).

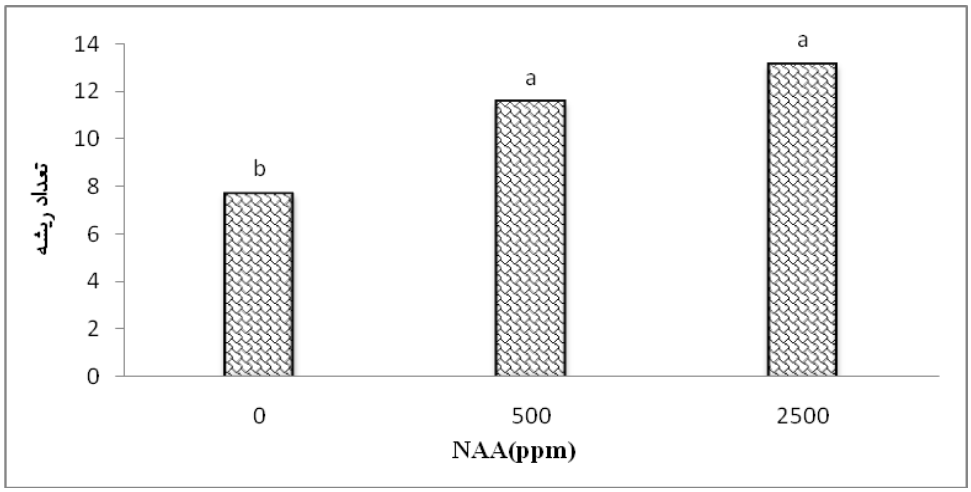
با توجه به اینکه استرین‌های اگروباکتریوم رایزوژونز باعث افزایش تعداد ریشه‌ها در قلمه‌های سرخدار نسبت به شاهد و تیمارهای هورمونی نفتالین استیک اسید و ایندول بوتریک اسید شدند لذا ریشه‌های حاصل از تیمار با استرین‌های اگروباکتریوم رایزوژنز دارای قطر کمتری بودند (شکل ۴-۱۴).

در تیمار غلظت‌های مختلف هورمون نفتالین استیک اسید بیشترین تعداد ریشه در غلظت ۲۵۰۰ پی‌پی‌ام(شکل ۴-۱۶) و در تیمار غلظت‌های مختلف هورمون ایندول بوتریک اسید در غلظت ۵۰۰۰ پی‌پی‌ام مشاهده گردید (شکل ۴-۱۷).

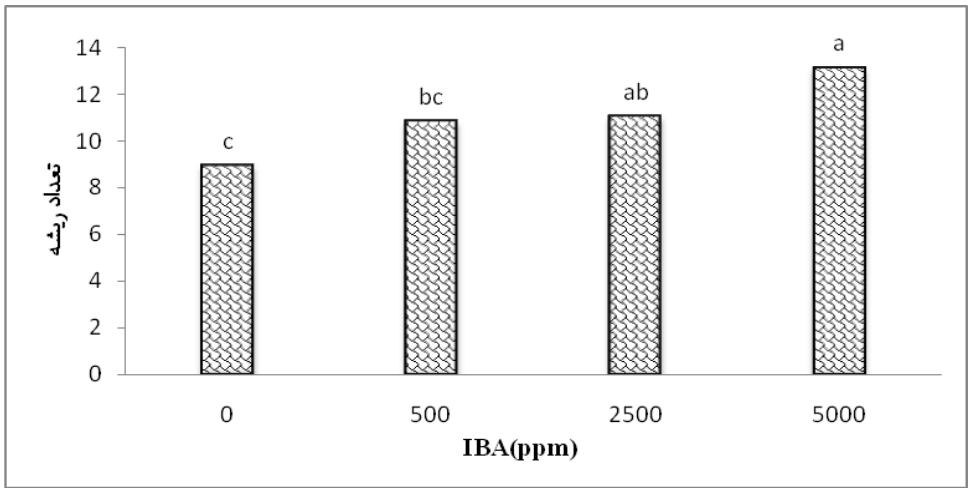
شکل ۴-۱۴ قلمه‌های تیمار شده با استرین باکتری(سمت راست)، قلمه‌های تیمار شده با هورمون‌های NAA و IBA (سمت چپ)



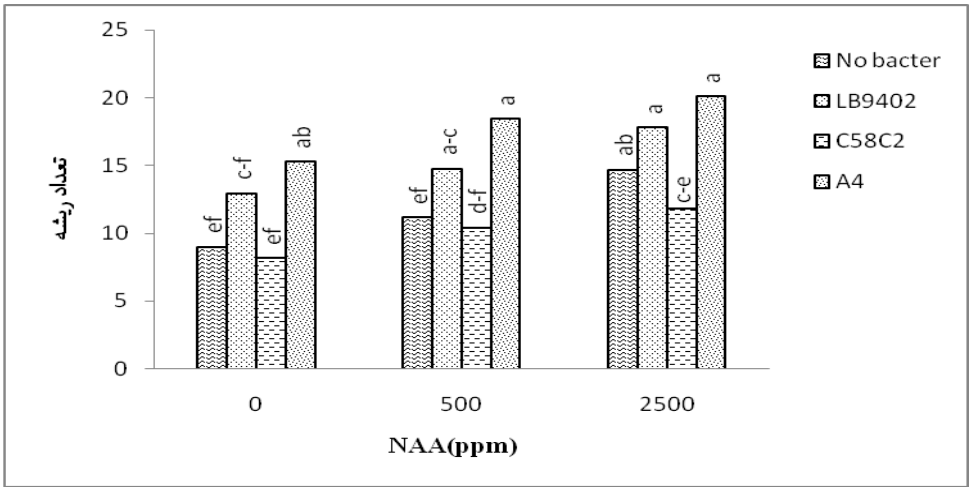
شکل ۴-۱۵ تاثیر استرین‌های باکتری اگروباکتریوم رایزوژنز بر تعداد ریشه قلمه‌های سرخدار



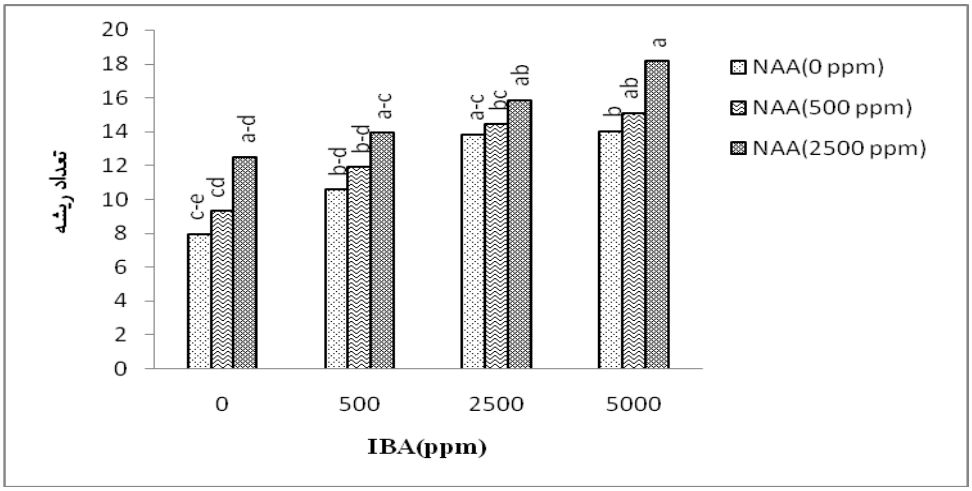
شکل ۴-۱۶ تاثیر غلظت‌های مختلف هورمون NAA (پی‌پی‌ام) بر تعداد ریشه قلمه‌های سرخدار



شکل ۴-۱۷ تاثیر غلظت‌های مختلف هورمون IBA (پی‌پی‌ام) بر تعداد ریشه قلمه‌های سرخدار



شکل ۴-۱۸ تاثیر استرین‌های باکتری اگروباکتریوم رایزوژنز و غلظت‌های مختلف هورمون NAA (پی‌پی‌ام) بر تعداد ریشه قلمه‌های سرخدار



شکل ۴-۱۹ تاثیر غلظت‌های مختلف هورمون‌های NAA و IBA (پی‌پی‌ام) بر تعداد ریشه قلمه‌های سرخدار

۴-۴ متوسط طول ریشه

جدول تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که تیمار هورمونی ایندول بوتریک اسید، استرین باکتری، اثر متقابل هورمون‌های نفتالین استیک اسید در ایندول بوتریک اسید و اثر متقابل استرین باکتری و هورمون نفتالین استیک اسید در سطح پنج درصد و اثر متقابل استرین باکتری و هورمون ایندول بوتریک اسید در سطح یک درصد اثر معنی‌داری روی افزایش متوسط طول ریشه‌ها داشتند(جدول۴-۱).

در بررسی اثرات ساده تیمار استرین‌های مختلف اگروباکتریوم رایزوژنز مشاهده شد بیشترین متوسط طول ریشه(۶/۳۳ سانتی‌متر) در تیمار استرین LB_{9402} به‌دست آمده است که با تیمار استرین A_4 تفاوت معنی‌داری ندارد(شکل ۴-۲۱).

با افزایش غلظت کاربردی هورمون نفتالین استیک اسید طول ریشه نیز افزایش نشان داد ولی این افزایش از لحاظ آماری معنی‌دار نبود(شکل ۴-۲۲). در تیمار غلظت‌های مختلف هورمون ایندول بوتریک اسید بیشترین متوسط طول ریشه(۶/۴۵ سانتی‌متر) مربوط به غلظت ۵۰۰۰ پی‌پی‌ام بوده است(شکل ۴-۲۳).

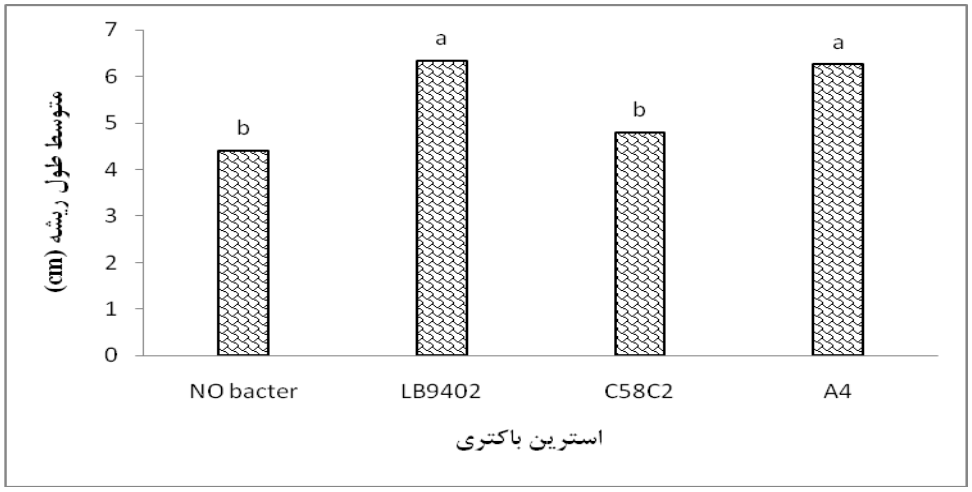
با بررسی آنالیز داده‌های اثرات متقابل استرین‌های مختلف اگروباکتریوم رایزوژنز با غلظت‌های مختلف هورمون نفتالین استیک اسید مشاهده گردید که تیمار اثر متقابل استرین LB_{9402} و غلظت ۲۵۰۰ پی‌پی‌ام هورمون مذکور اثر معنی‌داری روی افزایش متوسط طول ریشه دارند. در تیمار اثر متقابل استرین A_4 و غلظت ۲۵۰۰ پی‌پی‌ام هورمون نفتالین استیک اسید بیشترین متوسط طول ریشه ۸/۹۲ سانتی‌متر مشاهده گردید(شکل ۴-۲۴).

در اثرات متقابل استرین‌های مختلف اگروباکتریوم رایزوژنز با غلظت‌های مختلف هورمون ایندول بوتریک اسید تیمار استرین LB_{9402} به همراه غلظت ۵۰۰۰ پی‌پی‌ام هورمون مذکور اثر معنی‌داری روی افزایش متوسط طول ریشه داشت که متوسط طول ریشه ۸/۵۸ سانتی‌متری را نشان داد. در این اثر دوگانه استرین A4 بیشترین متوسط طول ریشه(۹/۷۷سانتی‌متر) را نشان داد (شکل ۴-۲۵).

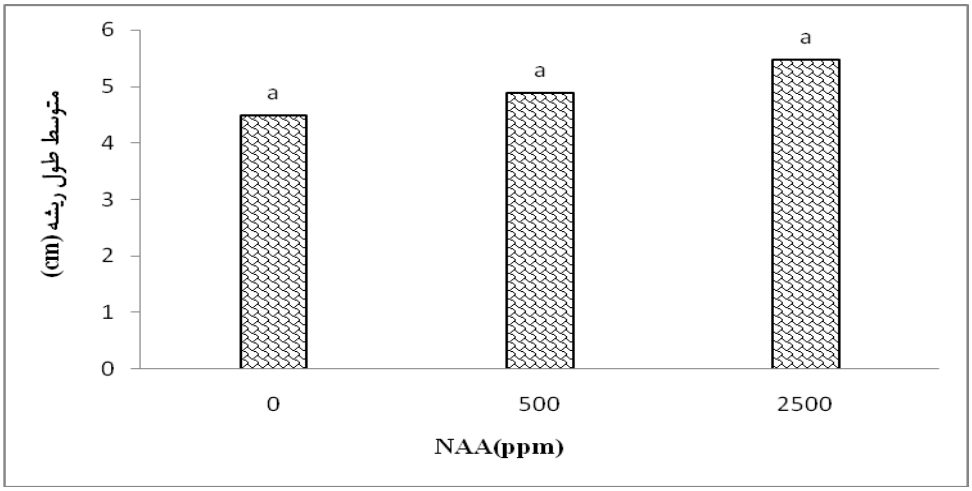
تیمار غلظت‌های مختلف هورمون نفتالین استیک اسید همزمان با غلظت‌های مختلف ایندول بوتریک اسید بیشترین متوسط طول ریشه(۱۲/۸ سانتی‌متر) را در غلظت‌های توام ۲۵۰۰پی‌پی‌ام از هورمون نفتالین استیک اسید و ۵۰۰۰ پی‌پی‌ام از هورمون ایندول بوتریک اسید نشان دادند (شکل ۴-۲۶ و شکل ۴-۲۰).

طبق مقایسه میانگین برهمکنش تیمارهای استرین‌های مختلف اگروباکتریوم رایزوژنز و غلظت‌های مختلف هورمون‌های نفتالین استیک اسید و ایندول بوتریک اسید هیچ اثر معنی‌داری در افزایش متوسط طول ریشه مشاهده نشد.

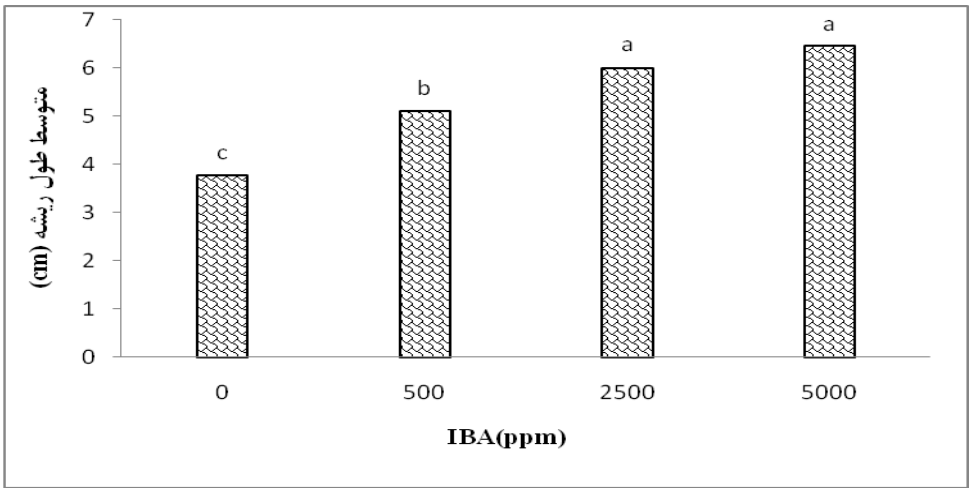
شکل ۴-۲۰ متوسط طول ریشه قلمه‌های تیمار شده یا استرین باکتری (سمت راست)، قلمه‌های تیمار شده با هورمون‌های NAA و IBA (سمت چپ)



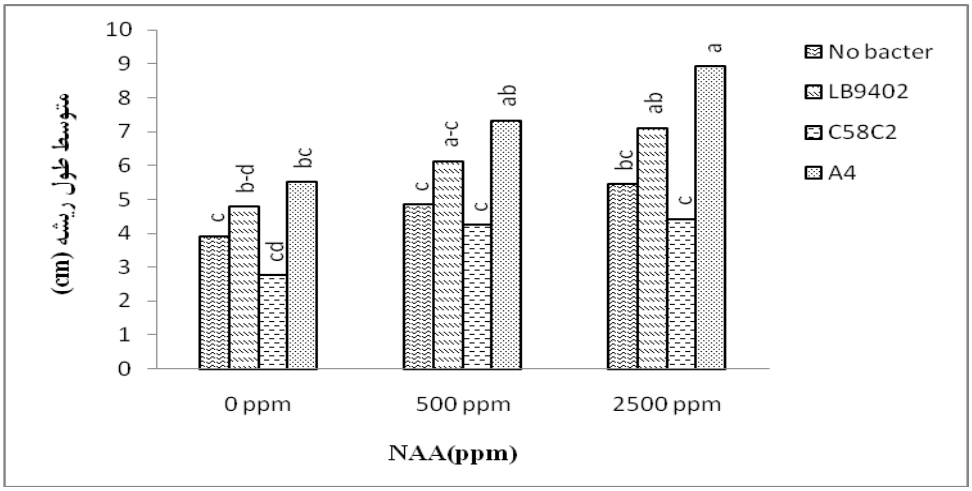
شکل ۴-۲۱ تاثیر استرین‌های باکتری اگروباکتریوم رایزوژنز بر متوسط طول ریشه قلمه‌های سرخدار



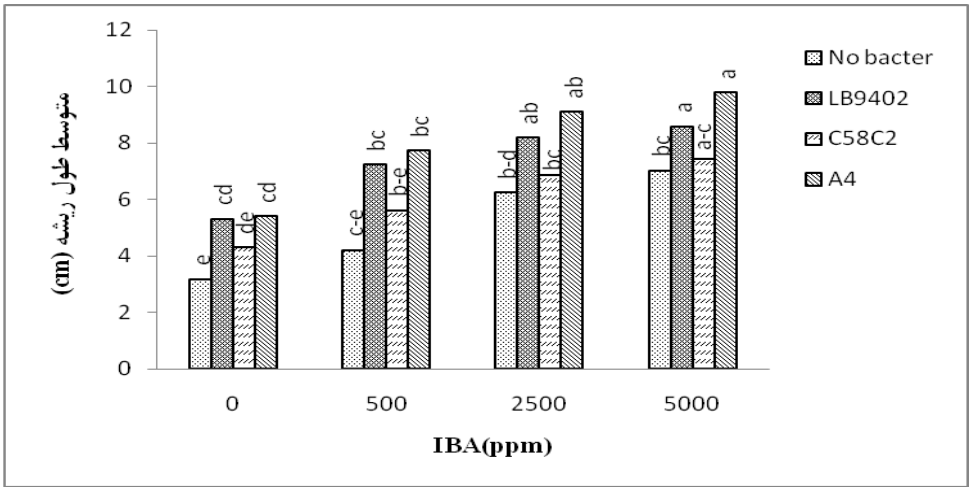
شکل ۴-۲۲ تاثیر غلظت‌های مختلف هورمون NAA (پی‌پی‌ام) بر متوسط طول ریشه قلمه‌های سرخدار



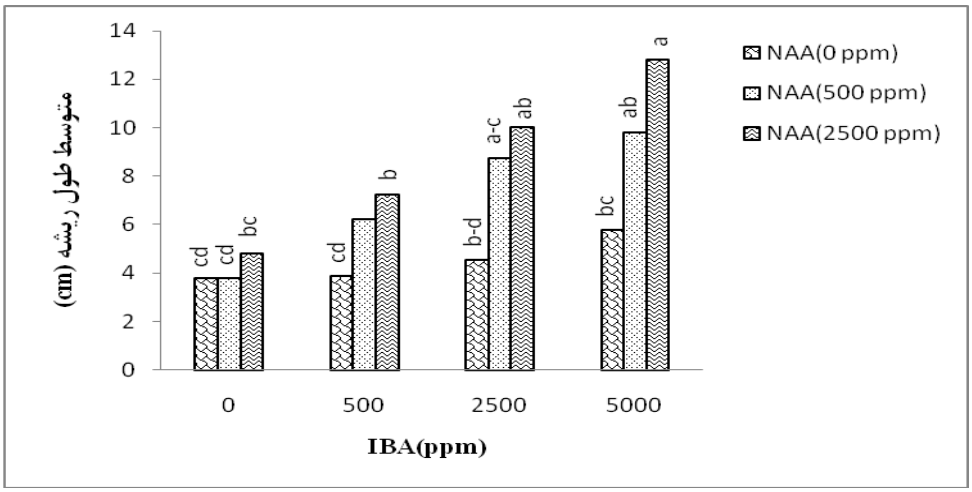
شکل ۴-۲۳ تاثیر غلظت‌های مختلف هورمون IBA (پی‌پی‌ام) بر متوسط طول ریشه قلمه‌های سرخدار



شکل ۴-۲۴ تاثیر استرین‌های باکتری اگروباکتریوم رایزوژنزو غلظت‌های مختلف هورمون NAA (پی‌پی‌ام) بر متوسط طول ریشه قلمه‌های سرخدار



شکل ۴-۲۵ تاثیر استرین‌های باکتری اگروباکتریوم رایزوژنز و غلظت‌های مختلف هورمون IBA (پی‌پی‌ام) بر متوسط طول ریشه قلمه‌های سرخدار



شکل ۴-۲۶ تاثیر غلظت‌های مختلف هورمون‌های NAA و IBA (پی‌پی‌ام) بر متوسط طول ریشه قلمه‌های سرخدار

۴-۵ بلندترین طول ریشه

طبق آنالیز آماری داده‌ها تیمار هورمونی ایندول بوتریک اسید و اثر متقابل استرین باکتری و هورمون نفتالین استیک اسید و اثر متقابل هورمون‌های نفتالین استیک اسید و ایندول بوتریک اسید در سطح یک درصد افزایش معنی‌داری در افزایش طول ریشه‌های قلمه‌ها نشان دادند (جدول ۴-۱).

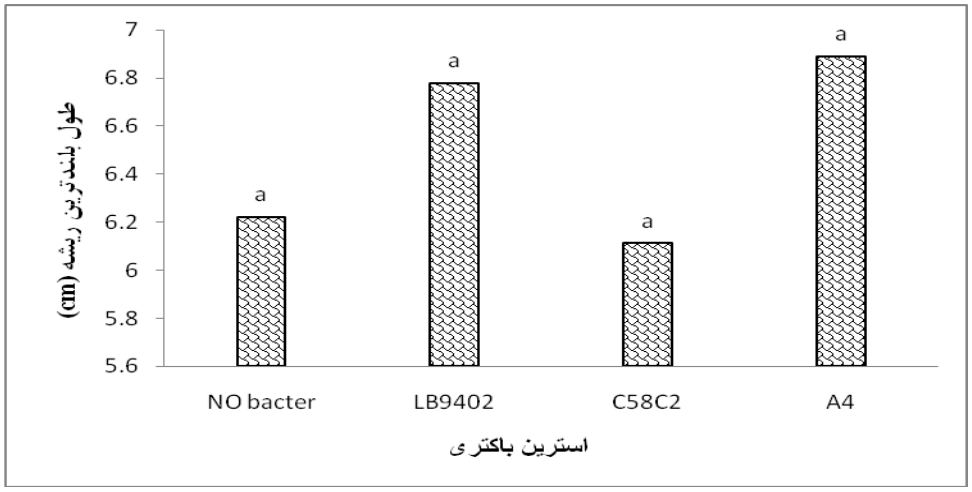
در تیمارهای اثرات ساده تیمارهای استرین‌های مختلف اگروباکتریوم رایزوژنز (شکل ۴-۲۹) و غلظت‌های مختلف هورمون نفتالین استیک اسید اثر معنی‌داری در افزایش طول ریشه‌ها نداشت (شکل ۴- ۳۰). لذا تیمار غلظت‌های مختلف هورمون ایندول بوتریک اسید اثر معنی‌داری را روی

افزایش طول ریشه نشان دادند که بیشترین افزایش ارتفاع ریشه در این تیمار هورمونی در غلظت ۵۰۰۰ پی‌پی‌ام مشاهده شد (شکل ۴-۳۱). با بررسی اثرات متقابل در تیمار استرین‌های مختلف اگروباکتریوم رایزوژنز و غلظت‌های مختلف هورمون نفتالین استیک اسید بلندترین طول ریشه(۱۰/۰۸ سانتی‌متر) مربوط به تیمار استرین A_4 با غلظت ۲۵۰۰ پی‌پی‌ام هورمون مذکور به‌دست آمد (شکل ۴-۳۲).

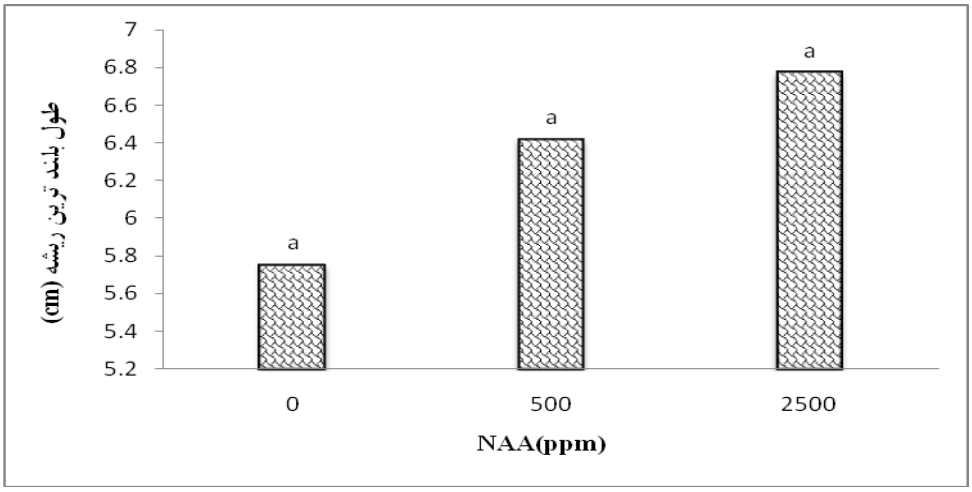
در تیمار استرین‌های مختلف اگروباکتریوم رایزوژنز و غلظت‌های مختلف هورمون ایندول بوتریک اسید بلندترین طول ریشه(۹/۹۴ سانتی‌متر) در تیمار استرین A_4 همراه با غلظت ۵۰۰۰ پی‌پی‌ام این هورمون مشاهده شد. تیمار متقابل استرین LB_{9402} در غلظت ۵۰۰۰ پی‌پی‌ام هورمون ایندول بوتریک اسید نیز باعث افزایش در طول ریشه ها شد(۹/۱۱٪) که با تیمار استرین A_4 در هورمون مذکور تفاوت معنی‌داری نداشت(پیوست یک و شکل ۴-۲۷). تیمار غلظت‌های مختلف هورمون‌های نفتالین استیک اسید و ایندول بوتریک اسید بلندترین طول ریشه(۱۳/۵ سانتی‌متر) را در تیمار هورمونی نفتالین استیک اسید با غلظت ۲۵۰۰ پی‌پی‌ام و ایندول بوتریک اسید با غلظت ۵۰۰۰ پی‌پی‌ام نشان دادند (شکل ۴-۳۳ و شکل ۴-۲۸). نتایج به‌دست آمده از اثرات سه‌گانه استرین‌های مختلف اگروباکتریوم رایزوژنز و غلظت‌های مختلف هورمون‌های نفتالین استیک اسید و ایندول بوتریک اسید نشان داد که برهمکنش این تیمارها اثر معنی‌داری روی افزایش ارتفاع ریشه نشان ندادند (جدول ۴-۱).

شکل ۴-۲۷ طول ریشه‌های تیمار شده با استرین باکتری (LB_{9402}) و هورمون IBA

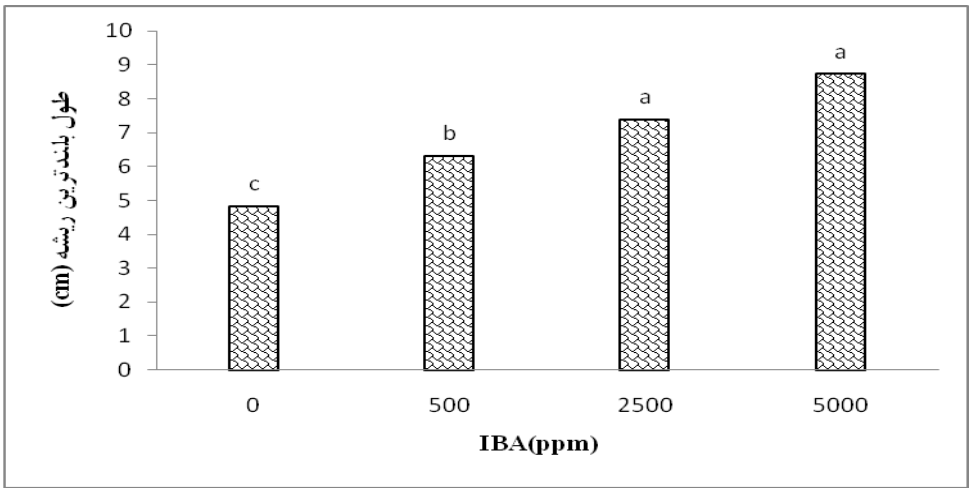
شکل ۴-۲۸ طول ریشه‌های تیمار شده با هورمون‌های NAA و IBA



شکل ۴-۲۹ تاثیر استرین‌های باکتری اگروباکتریوم رایزوژنز بر افزایش طول ریشه قلمه‌های سرخدار

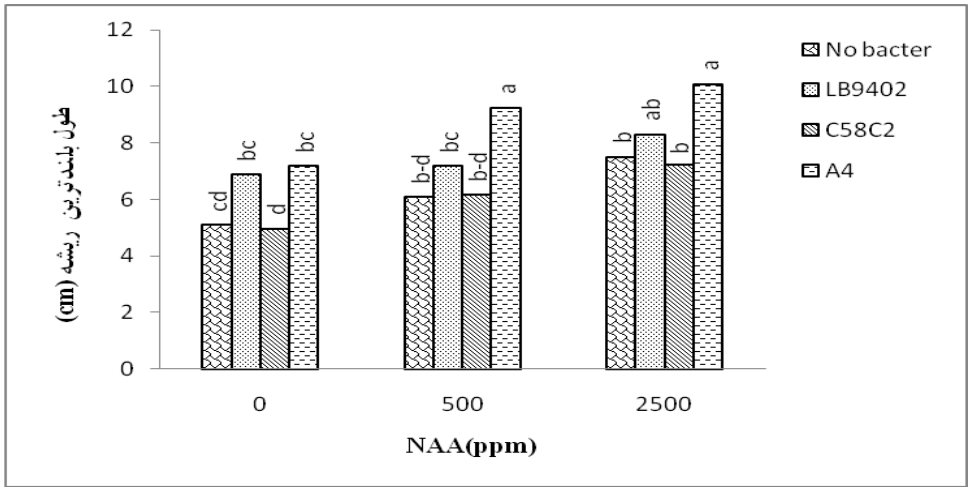


شکل ۴-۳۰ تاثیر غلظت‌های مختلف هورمون NAA (پی‌پی‌ام) بر افزایش طول ریشه قلمه‌های سرخدار

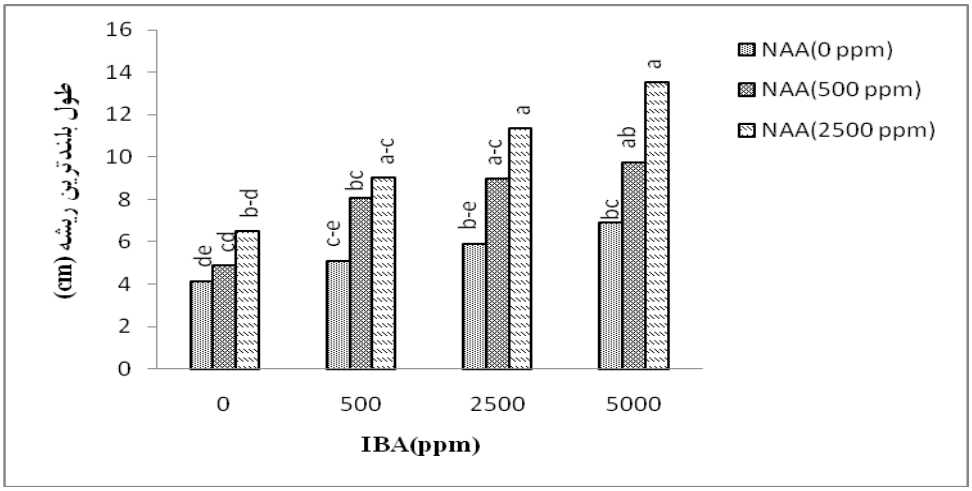


شکل ۴-۳۱ تاثیر غلظت‌های مختلف هورمون IBA (پی‌پی‌ام) بر افزایش طول ریشه قلمه‌های سرخدار

.



شکل ۴-۳۲ تاثیر استرین‌های باکتری اگروباکتریوم رایزوژنزو غلظت‌های مختلف هورمون NAA (پی‌پی‌ام) بر افزایش طول ریشه قلمه‌های سرخدار



شکل ۴-۳۳ تاثیر غلظت‌های مختلف هورمون‌های NAA و IBA (پی‌پی‌ام) بر افزایش طول ریشه قلمه‌های سرخدار

۴-۶ تعداد ریشه فرعی

نتایج تجزیه واریانس به‌دست آمده از آزمایش نشان داد که تیمار استرین اگروباکتریوم رایزوژنز در سطح یک درصد و هورمون ایندول بوتریک اسید و اثر متقابل استرین باکتری و هورمون ایندول بوتریک اسید در سطح پنج درصد اثر معنی‌داری روی تعداد ریشه فرعی قلمه‌های سرخدار نشان دادند(جدول ۴-۱).

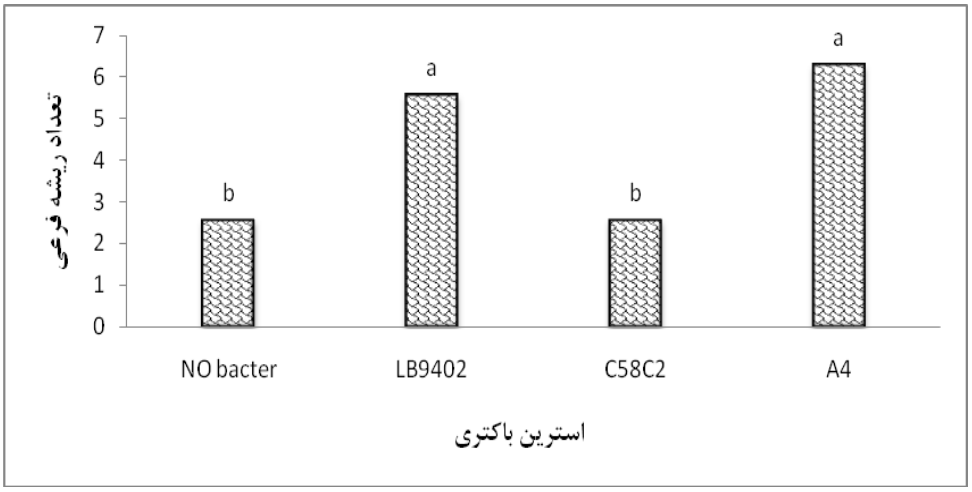
استرین A_4 نسبت به دو استرین دیگر اگروباکتریوم رایزوژنز($C_{58}C_2$, LB_{9402}) تاثیر بیشتری روی تعداد ریشه فرعی قلمه‌ها داشت(شکل ۴-۳۵).

در تیمار اثرات ساده غلظت‌های مختلف هورمون نفتالین استیک اسید تاثیر معنی‌داری در افزایش ریشه‌های فرعی مشاهده نشد. تیمار غلظت‌های مختلف هورمون ایندول بوتریک اسید تاثیر معنی‌داری روی افزایش تعداد ریشه فرعی نشان داد لذا بیشترین تعداد ریشه فرعی در غلظت ۵۰۰۰ پی‌پی‌ام به‌دست آمد (شکل ۴-۳۶ و شکل۴- ۳۴).

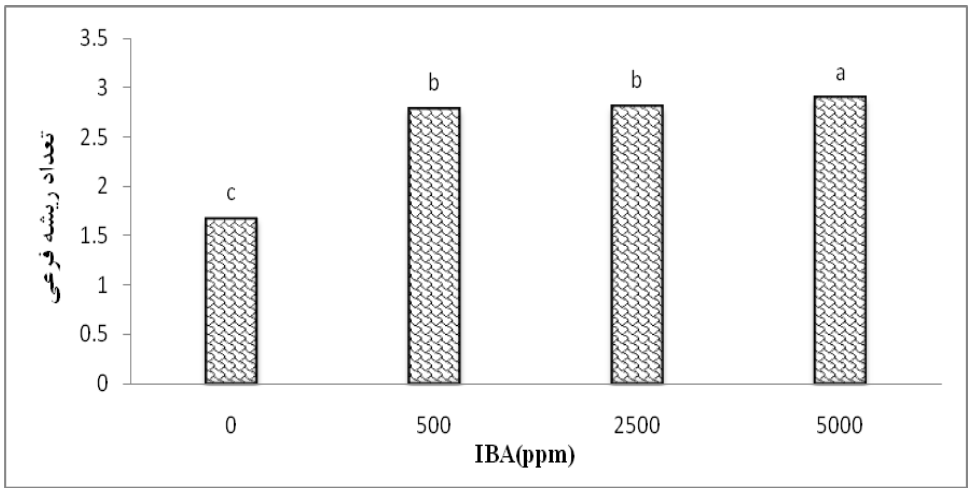
با بررسی اثرات متقابل تیمار استرین‌های مختلف اگروباکتریوم رایزوژنز در حضور غلظت‌های مختلف هورمون ایندول بوتریک اسید اثر معنی‌داری را روی افزایش تعداد ریشه فرعی قلمه‌ها نشان دادند که تیمار استرین A_4 و غلظت ۵۰۰۰ پی‌پی‌ام هورمون ایندول بوتریک اسید بیشترین تاثیر را باعث شد(شکل ۴-۳۷).

تیمار اثر متقابل هورمون‌های ایندول بوتریک اسید در نفتالین استیک اثر معنی‌داری روی تعداد ریشه فرعی قلمه‌های سرخدار نشان نداد.

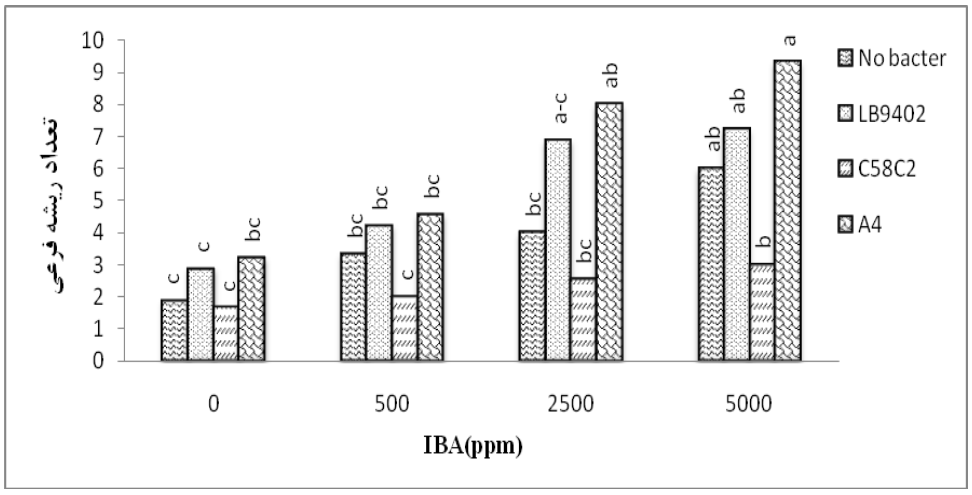
شکل ۴-۳۴ ریشه‌های فرعی ساقه های تیمار شده با هورمون‌های IBA (شکل راست) و ساقه های تیمار شده با باکتری (شکل چپ)



شکل ۴-۳۵ تاثیراسترین‌های باکتری اگروباکتریوم رایزوژنز بر تعداد ریشه فرعی قلمه‌های سرخدار



شکل ۴-۳۶ تاثیرغلظت‌های مختلف هورمون IBA (پی‌پی‌ام) بر تعداد ریشه فرعی قلمه‌های سرخدار



شکل ۴-۳۷ تاثیر استرین‌های باکتری اگروباکتریوم رایزوژنزو غلظت‌های مختلف IBA (پی‌پی‌ام) بر تعداد ریشه فرعی قلمه‌های سرخدار

۴-۷ بحث

سرخدار یکی از گونه های ارزشمند جنگلی است که در فضای سبز شهری، جنبه های دارویی و ... کاربرد دارد. یکی از مشکلات اصلی در تکثیر درختان سرخدار سختی ریشه دار کردن قلمه‌های این گیاه است.نتایج این پژوهش نشان می دهد که استفاده از هورمون‌های ریشه‌زایی (ایندول بوتریک اسید و نفتالین استیک اسید) و استرین‌های اگروباکتریوم رایزوژنز تاثیر معنی‌داری روی درصد ریشه‌زایی، درصد کالوس‌زایی، تعداد و متوسط طول ریشه‌های قلمه‌های سرخدار دارند. استفاده از هورمون ایندول بوتریک اسید با غلظت ۵۰۰۰ پی‌پی‌ام و سپس هورمون نفتالین استیک اسید در غلظت ۲۵۰۰ پی‌پی‌ام بهترین تاثیر را روی صفات مذکور داشتند. محققان دیگر نیز اثرات مفید استفاده از هورمون‌های اکسینی به ویژه ایندول بوتریک اسید در بهبود ریشه‌زایی قلمه‌های سرخدار نشان داده اند (*Anjum et al*., 2011; *chee*, 1995؛ عصاره و همکاران, ۱۳۸۱؛ مدانلو و همکاران ، ۱۳۷۸). نتایج نشان داد که در هنگامی که فقط از هورمون‌ها برای ریشه‌زایی استفاده شود متوسط درصد ریشه‌زایی بیش از ۵۰ درصد نمی باشد و اگروباکتریوم رایزوژنز باعث افزایش قابل ملاحظه ای در موفقیت قلمه‌های سرخدار می‌شود با این وجود نوع استرین مورد استفاده در این موفقیت بسیار مهم است به‌طوری که در این پژوهش مشخص شد استرین‌های A_4 و LB_{9402} عملکرد بهتری داشتند ولی استرین $C_{58}C_2$ حتی باعث کاهش معنی‌دار درصد ریشه‌زایی شد. علت را در این دانست که استرین‌های باکتری به‌صورت تخصصی عمل می‌کنند و گاهی از نمونه‌های گیاهی موادی ضد باکتری ترشح می‌شود که در این پژوهش استرین $C_{58}C_2$ نسبت به این مواد حساس بوده و واکنش نشان داده است. بهترین نتیجه زمانی به‌دست آمد که از ترکیب هورمون‌های ریشه‌زایی (ایندول بوتریک اسید و نفتالین استیک اسید) و استرین مناسب باکتری (A_4 وLB_{9402}) استفاده شد. مینگ شانلی و همکاران(۲۰۰۳) نیز در بررسی تاثیر دو استرین LB_{9402} و A_4 را به همراه هورمون ایندول بوتریک اسید روی ریشه‌دهی ریزنمونه‌های کاج، نتیجه گرفتند که این تیمارهای ریشه‌دهی، کمک بزرگی به تکثیر کاج رادیاتا می‌کند و بیشترین درصد ریشه‌زایی در این پژوهش در تیمار برهمکنش

استرین LB_{9402} و هورمون ایندول بوتریک اسید به‌دست آوردند. در پژهشی دیگر تاثیر استرین‌های A_4 و K_{599} و 15834 را روی انگور بررسی کردند و به این نتیجه رسیدند که استرین A_4 تاثیر زیادی در القا ریشه‌های مویین در انگور دارد (*Jittaysothorn.*, 2011). اسیتکین[1] و همکاران (۲۰۰۲) تأثیر هورمون ایندول بوتریک اسید و سه نژاد اگروباکتریوم (A_{18},A_{16},A_1) را روی تشکیل ریشه‌های نابجا در قلمه‌های چوب نرم و چوب نیمه سخت آلبالو بررسی کردند و نتیجه گرفتند که در صورت عدم استفاده از ایندول بوتریک اسید و نژادهای اگروباکتریوم، قلمه‌ها ریشه نمی‌دهند ولی وقتی قلمه‌ها را با ۲۵۰ میلی‌گرم ایندول بوتریک اسید و نژاد A_{16} تیمار کردند درصد بالایی ریشه‌دهی در هر دو نوع قلمه دیده شد به نظر می‌رسد که استرین‌های اگروباکتریوم رایزوژنز در ریشه‌زایی قلمه‌ها نقش ویژه‌ای داشته است، تیمارهایی که باکتری در آن ها وجود داشت، دارای درصد ریشه‌زایی بالایی(۵۰٪) بودند.

اگروباکتریوم رایزوژنز دارای پتانسیلی برای القا ریشه‌های نابجا در مکان تلقیح ریزنمونه‌ها دارد که این ریشه‌ها به ریشه‌های مویین معروف هستند. این پتانسیل مربوط به وارد شدن و اختلاط قسمتی از T-DNA پلاسمید القا ریشه(Ri) باکتری در ژنوم گیاه می‌باشد. این مکان‌ها با ORF10, 11, 12, 15[2] از TL.DNA مطابقت دارند که به مکان‌های ریشه(rol A, B, C, D) فرستاده می‌شوند (*Falasca et al.*, 2000).

انتقال T .DNA از اگروباکتریوم به ژنوم گیاهی فرآیند پیچیده‌ای است که تحت تاثیر عوامل مختلفی نظیرسویه باکتری، دوره ی پیش کشتی، نوع ریزنمونه گیاهی، دما و دوره ی هم‌کشتی می باشد. بدیهی است که نه تمامی سویه‌های اگروباکتریوم قابلیت بیماری‌زایی دارند و نه تمامی گیاهان آماده‌ی پذیرش ژن بیگانه و باززایی هستند. دلیل این پدیده چندان مشخص نیست و فقط می‌توان گفت که چنین حالتی در قالب اثرات متقابل گیاه – پاتوژن قابل بحث است که یک واریته گیاهی پاسخ‌های متفاوتی را به نژادهای مختلف یک گونه بیماری‌زا می‌دهد. بنابراین، بهبود بیماری‌زایی باکتری و

[1] Esitken
[2] Open reading frames

آمادگی سلول گیاهی، در افزایش احتمال انتقال T.DNA به سلول گیاهی نقش به‌سزایی دارد. (*Chen et al*., 2008; *Kim et al*., 2004; *Barik et al*., 2005; *Baron et al*., 2001; *De Busk et al*., 1998)

القاء ریشه‌های نابجا با هورمون‌های ریشه‌زایی و نژادهای مختلف اگروباکتریوم رایزوژنز به صورت جداگانه یا ترکیب با هم روشی جدید است که برای تشکیل ریشه‌های نابجا در گیاهان سخت ریشه‌زا استفاده می‌شود. کاربرد خارجی هورمون‌های ریشه‌زا باعث افزایش غلظت هورمون‌های ریشه‌زای درون‌زا در گیاه می‌شود، و وقتی از استرین‌های اگروباکتریوم رایزوژنز استفاده می‌شود، نوعی انتقال ژن در گیاه رخ می‌دهد که باعث تحریک گیاه به ریشه‌دهی می‌شود (*Esitken et al*., 2002 ; *Rugini et al*., 1991; *Mireille et al*., 2006).

یکی از نکته‌های قابل توجه این است که در این پژوهش استفاده از استرین‌های اگروباکتریوم رایزوژنز علاوه بر افزایش درصد ریشه‌زایی باعث تسریع در فرآیند ریشه‌دهی قلمه‌ها نیز گردید، در حالی که تیمارهای دیگر زمان بیشتری را جهت ریشه‌دهی نیاز داشتند. ریشه‌های تیمارهای باکتری به مراتب قطر کمتری نسبت به ریشه‌های تیمار های هورمون ایندول بوتریک اسید و نفتالین استیک اسید داشتند .

در این پژوهش در تیمارهایی که استرین‌های باکتری همزمان با هورمون‌های ایندول بوتریک اسید و نفتالین استیک اسید استفاده شد افزایش غلظت هورمون‌های مذکور تفاوت معنی‌داری را با غلظت‌های پایین هورمون‌ها نشان ندادند، لذا زمانی که هورمون‌های مذکور را همزمان با هم ولی بدون حضور باکتری استفاده کردیم با افزایش غلظت ایندول بوتریک اسید و نفتالین استیک اسید درصد ریشه‌زایی و دیگر صفات مذکور افزایش داشتند. در پژوهش‌های دیگر بهترین غلظت برای ریشه‌زایی قلمه‌های سخت ریشه‌زا غلظت‌های بالای ۱۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر پیشنهاد شده است (*Singh*, 2011). در حالی که بهترین ریشه‌زایی قلمه در این پژوهش در غلظت ۵۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر برای ایندول بوتریک اسید، و ۲۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر برای نفتالین استیک اسید، در کاربرد تنهایی این هورمون‌ها به‌دست آمد.

۴-۸ نتیجه‌گیری کلی

استفاده از استرین باکتری،ایندول بوتریک اسید و نفتالین استیک اسید باعث افزایش در کالوس‌زایی، ریشه‌زایی، تعداد ریشه و طول ریشه می‌شود. با توجه به نتایج به‌دست آمده در این پژوهش بهترین غلظت برای هورمون‌های ایندول بوتریک اسید و نفتالین استیک اسید در زمان حضور باکتری غلظت ۵۰۰ پی‌پی‌ام را پیشنهاد می‌شود زیرا در استفاده همزمان باکتری و هورمون‌های مذکور تفاوت معنی‌داری در درصد کالوس‌زایی و ریشه‌زایی با افزایش غلظت هورومون‌ها مشاهده نگردید. در کاربرد تنهایی این هورمون‌ها غلظت‌های بالاتر را توصیه می‌شود.

کاربرد استرین‌های مختلف اگروباکتریوم رایزوژنز و غلظت‌های مختلف هورمون‌های نفتالین استیک اسید و ایندول بوتریک اسید اثر معنی‌داری روی تعداد ریشه قلمه‌ها نسبت به شاهد نشان دادند لذا با استفاده همزمان استرین‌های اگروباکتریوم رایزوژنز و هورمون نفتالین استیک اسید تعداد ریشه‌ها به‌طور معنی‌داری افزایش یافت این نتیجه در تیمار اثر متقابل هورمون‌های نفتالین استیک اسید و ایندول بوتریک اسید نیز مشاهده گردید. در حالی که اثر متقابل استرین‌های اگروباکتریوم رایزوژنز و هورمون ایندول بوتریک اسید و اثرات سه‌گانه استرین اگروباکتریوم رایزوژنز و هورمون‌های نفتالین استیک اسید و ایندول بوتریک اسید اثر معنی‌داری روی تعداد ریشه قلمه‌ها نداشتند.

تیمار هورمونی ایندول بوتریک اسید تاثیر معنی‌داری روی افزایش متوسط طول ریشه و افزایش ارتفاع ریشه‌های قلمه نشان داد. استفاده از این هورمون همزمان با استرین‌های اگروباکتریوم رایزوژنز یا غلظت‌های مختلف نفتالین استیک اسید باعث افزایش متوسط طول ریشه و بلندی ارتفاع ریشه‌ها نسبت به شاهد و کاربرد تنهایی آن شد.

با توجه به اینکه تیمار استرین‌های اگروباکتریوم رایزوژنز و تیمار هورمونی نفتالین استیک اسید اثر معنی‌داری روی افزایش متوسط طول ریشه و بلندی ارتفاع ریشه نداشتند ولی زمانی که همزمان با هم استفاده کردیم باعث افزایش در متوسط طول ریشه شد.

تمام تیمارها اثر معنی‌داری روی درصد کالوس‌زایی کل نشان داد. لذا زمانی که تیمارها را همزمان با هم استفاده کردیم افزایشی معنی‌دار در درصد کالوس‌زایی کل مشاهده گردید که بیشترین درصد کالوس‌زایی کل(۱۰۰٪) در تیمار اثرات سه‌گانه استرین اگروباکتریوم رایزوژنز و هورمون‌های نفتالین استیک اسید و ایندول بوتریک اسید به‌دست آمد.

تعداد ریشه‌های فرعی در سه تیمار استرین‌های اگروباکتریوم رایزوژنز و هورمون‌های نفتالین استیک اسیدو ایندول بوتریک اسید نسبت به شاهد افزایش معنی‌داری داشتند. در اثرات متقابل تیمار استرین‌های اگروباکتریوم رایزوژنز به همراه هورمون ایندول بوتریک اسید باعث افزایش بیشتری در تعداد ریشه‌های فرعی قلمه‌های سرخدار شدند.

شکل ۴-۳۸ ظهور برگچه های جدید روی قلمه‌های سرخدار پس از ۴۰ روز

شکل ۴-۳۹ ریشه‌های رشد کرده قلمه‌ها در بستر شن(سمت چپ) و ظهور برگچه‌های جدید یک ماه پس از ریشه‌دار شدن قلمه‌ها(سمت راست)

در این پژوهش خطاهای ایجاد شده می‌تواند به‌علت شرایط آب‌وهوایی شاهرود باشد از آن‌جایی که سرخدار گیاه مناطق مرطوب با رطوبت بالای ۸۰ درصد می‌باشد لذا آب و هوای خشک شهرستان شاهرود خود مانعی برای ریشه‌دهی قلمه‌های سرخدار می‌باشد. رطوبت گلخانه دانشکده دانشگاه صنعتی شاهرود در حالت معمول بدون استفاده از سیستم میست ۴۵ درصد بود که با استفاده از سیستم میست در طول ریشه‌دهی قلمه‌های سرخدار سعی کردیم که رطوبت را بالا برده و شرایطی مرطوب را برای قلمه‌ها فراهم کنیم.

۹-۴ پیشنهادات

- انجام این آزمایش در مناطق دیگر به خصوص مناطق شمالی کشور که دارای درصد رطوبت بالاتری می‌باشد.
- پژوهش های تکمیلی در استفاده از استرین‌های دیگر اگروباکتریوم رایزوژنز و حتی باکتری‌های دیگر(مثل باکتری باسیلوس) که در القای ریشه‌های مویین در قلمه‌های سخت‌ریشه‌زا موثر هستند.
- استفاده از غلظت‌های دیگر هورمون‌های ریشه‌زای اکسین(نفتالین استیک اسید ,ایندول بوتریک اسید و...) و دیگر محرک‌های ریشه‌زایی در قلمه‌ها.
- آزمایش در دیگر بسترهای کشت شامل مواد دیگر(شن و ماسه . . .).
- قلمه‌گیری در زمان‌های مختلف (از آنجا که درخت سرخدار یک گونه همیشه سبز می‌باشد).
- استفاده از هورمون اگروباکتریوم رایزوژنز جهت بررسی تاثیر آن بر روی میزان ماده موثره(تاکسول) این گیاه دارویی.
- بررسی سرعت تکثیر سرخدار با استفاده از روش کشت بافت

فصل پنجم

منابع

۵ منابع

بیابانی، ع. و ا.، شکافنده.(۱۳۹۰). ریشه زایی‌سرشاخه‌های انارقم رباب[۱] با استفاده از ایندول بوتیریک اسید و [۲]نفتالن استیک اسید در شرایط کنترل شده . مجله علوم و فنون باغبانی ایران جلد ۱۲ شماره ۳ صفحه های ۳۰۶تا ۲۹۳ (۱۳۹۰).

ثابتی، ح.(۱۳۸۷). جنگل‌ها درختان و درختچه‌های ایران. جلد اول، چاپ پنجم، دانشگاه یزد، یزد

جمالی، ا.، ن.، زارع، م.، شکرپور، ر.، اصغری زکریا و ا.، امانی،(۱۳۹۱). القای ریشه‌های مویین در گیاه دارویی سنبل الطیب با استفاده از سویه‌های مختلف اگروباکتریوم رایزوژنز. ویژه نامه دوازدهمین کنگره ژنتیک ایران.

لسانی، م.، و ح.، حبیبی، (۱۳۶۴). مجله منابع طبیعی ایران شماره ۳۹.

سلیمانی، ط.، م.، کیانفر، خ.، پیری و ط.، حسنلو، (۱۳۹۰). پایان نامه ارشد، القای ریشه‌های مویین در گیاه دارویی بابا آدم(*Articum Lappa L.*)، دانشکده کشاورزی، دانشگاه همدان

عالمی، ا.، ع.، اسلامی و ش.، شتایی، (۱۳۹۲). بررسی قابلیت توسعه گونه درحال انقراض سرخداردراستان گلستان با استفاده ازسامانه اطلاعات جغرافیایی(پژوهش موردی :ذخیره گاه پونه آرام استان گلستان)، فصلنامۀعلمی - پژوهشی تحقیقات جنگل وصنوبرایران جلد۲۱ شمارۀ ۴،صفحۀ۶۸۹-۶۷۸.

عزیزی، م.، م. آقابزرگی.، م.، فارسی.، ع. تهرانی‌فر.، ج.، ذوالعلی و م.، قبولی.، (۱۳۸۶). مطالعه واکنش ریشه‌زایی برخی از گیاهان باغبانی در تلقیح با *Agrobacterium rhizogenes* ، مجله علوم و صنایع کشاورزی، شماره۲،جلد۲۱. دانشگاه فردوسی مشهد

عصاره، م.، ن.، نیکوش، م.، قربانلی و قمری زارع، ع.، (۱۳۸۱). بررسی ساختار تشریحی ریشه‌زایی و نیز علل سخت و دیر ریشه‌دهی در قلمه‌های سرخدار، منابع طبیعی شماره ۷۴.

کبیر نتاج، س.، ج.، ذوالعلی، ن.، قربانعلی و ا.، شکری، (۱۳۹۱). پایان نامه ارشد، بهینه سازی شرایط القا و تثبیت کشت ریشه‌های مویین گیاه کاسنی حاصل از تلقیح اگروباکتریوم رایزوژنز، پژهشکده ژنتیک و زیست فناوری کشاورزی طبرستان، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری

مدانلو، س.، ح.، جلیلوند و م.، نصرت، (۱۳۸۳). تحریک ریشه‌زایی گونه سرخدار(*Taxus bacata L.*) بر اساس محل قلمه گیری از شاخه با تیمارهای هورمونی K ایندول بوتریک اسید . فصلنامه علمی- پژوهشی تحقیقات جنگل و صنوبر ایران، جلد ۱۶ شماره ۲ ، صفحه ۱۸۵-۱۷۶

مصدق، ا.، (۱۳۸۳). درخت سرخدار، محیط شناسی،شماره ۲۸:۸۴-۷۳

Abou Rayya M.S., N.E. Kassem and E.A.M., Ali. (2010). Rooting Induction of Soft Wood and Almond Micro-cutting Using *Agrobacterium Rhizogenes*. Research Journal of Agriculture and Biological Sciences, 6(1): 40-44.

Akramian M., S.M., Fakhr Tabatabaei and M. Mirmasoumi, (2008), Virulence of Different Strains of *Agrobacterium rhizogenes* on Genetic Transformation of Four Hyoscyamus Species, American-Eurasian J. Agric. & Environ. Sci, 3(5): 759-763.

Anjum, Q., L. K. Sharma, S. A. Ganie, M. Maqbool Rather and Hilal Ah., (2011), Effect of Auxins on Macropropagation of *Taxus baccata* Linn, Through Stem Cuttings Rather. Indian Forester 137, 12:1382-1385.

Archana G., S.T., Ravindra, V., Dhingra and M., Lakshmi Narasu ., (2003). Influence of different strains of *Agrobacterium rhizogenes* on induction of hairy roots and artemisinin production in Artemisia annua. Centre for Biotechnology, Jawaharlal Nehru Technological university.

Barik DP, Mohapatra U, Chand PK., (2005). Transgenic grasspea (*Lathyrus sativus* L.): factors influencing Agrobacterium-mediated transformation and regeneration. Plant Cell Reports 24: 523-531.

Baron C, Domke N, Beinhofer M, Hapfelmeier S., (2001). Elevated temperature differentially affects virulence, VirB protein accumulation, and T-pilus formation in different *Agrobacterium tumefaciens* and *Agrobacterium vitis* strains. Journal of Bacteriology 183: 6852-6861.

Bassil N.V., M., Wiliam, L W., Proebsting and A., Lightfoot (1991). Propagation of Hazelnut stem cutting using agrobacterium rhizogenes. Hortscience 26(8):1058-1060.

Chandra R P. and V P., Potty, (2000). Induction of hairy roots through the mediation of four strains of Agrobactrium rhizogenes on five host plants. Indian journal of biotechnology vol 7, (2000), pp 122-128.

Chee P.,(1995). Stimulation of adventitious rooting of taxus species by Thiamin, plant cell Reports volume 14 , Numbers 12: 753-757.

Chen L, Zhang B, Z Xu (2008). Salt tolerance conferred byoverexpression of Arabidopsis vacuolar Na(+)/H(+) antiporter geneAtNHX1 in common buckwheat *(Fagopyrum esculentum*).Transgenic Research 17: 121-132.

Chun-Xiang Fu a, De-Xiu Zhao a, Xiao-Feng Xue b, Zhi-Ping Jin a, Feng Shan Ma,(2005). Transformation of Saussurea involucrata by *Agrobacterium rhizogenes*: Hairy root induction and syringin production., Short communication

Cristian A., J., Leple, J. muzzin and L., Jouanin, (1991). An alternative approach for gene transfer in trees using wild-type agrobacterium strains. Plant molecular biology(1991) 17: 441-452.

De Buck S, Jacobs A, Van Montagu M, Depicker A (1998). *Agrobacterium tumefaciens* transformation and cotransformation frequencies of Arabidopsis thaliana root explants and tobacco protoplasts. Mol Plant Microbe Interact 11: 449-457.

Esitken A., E., Sezari, I., Sevik and F., Sahin, (2002). Effect of IBA and different strains of *agrobacterium Agrobacterium rhizogenes* on adventives root formation from soft wood and semi-hard wood wild sour cherry cutting. Turk J Agric For 27 :37-42

Falasca G., M., Reverberi, P., Lauri, E., caboni, A., De stradis and M., Maddalena Altamura, (2000). How Agrobactrium rhizogenes triggers de novo root formation in a recalcitrant woody plant: an integrated histological ultrastructural and molecular analysis.Research new phytol.(2000), 145, 77-93

Gülhan Ercan A., K., Melih TASKIN, K., Turgut and S., Yuce, (1999). *Agrobacterium rhizogenes*-mediated Hairy root Formation in Some *Rubia tinctorum* L. Populations Grown in Turkey Tr. J. of Botany 23 (1999) 373-377.

Holloway L., M. J., Krasowski, R. F., Smith and S. I., Cameron, (2008). Enhancing the rooting of Canada yew stem cuttings with IBA treatments. Propagation of Ornamental Plants, 8 (1), 23 – 27.

Kim KH, Lee YH, Kim D, Park YH, Lee JY, Hwang YS, Kim YH (2004). Agrobacterium mediated genetic transformation of *Perilla frutescens*. Plant Cell Reports 23: 386-390.

Mingshan Li., W., David and M., Leung, (2003), Root induction in radiata pine using *Agrobacterium rhizogene*s, Electronic Journal of Biotechnology ISSN: 0717-3458. 251-258.

Munoz-Gutierrez L., J., Jesu s Vargas-Hernandez and J., Lopez-Upton ., (2009). Effect of cutting age and substrate temperature on rooting of *Taxus globosa*. new forests(2009). 38:187-196.

Nishigughi R. and A., OKA, (1986). Structure of the Hairy-root-inducing Plasmid and Identification of its Replicator Region,Bull. Inst. Chem. Res., kyoto Univ.,(1986). . Vol. 64, No. 3.

Rugini E., A., pellegrineschi, M., mencuccini and D., Marioti, (1991). Increase of rooting ability in the woody species Kiwi by transformation with *Agrobactrium rhizogenes* rol genes, Plant cell Reports(1991) 10: 291-295.

Scagel C.f., K., Reddy and J.M., Armstrong,(2003). Mycorrhizal fungi in rooting substrate influences the quantity and quality of roots on stem cuttings of Hick,s Yew,Research Reports.

Shyamal K.N., S., Lok Man and H.C., Rikhari, (1996). Chemical induction of adventitious root formation in *Taxus baccata* cuttings, Plant growth regulation 19: 117-122.

Singh, S. P., (2011). Effect of phyto-hormones on propagation of Hihalayan Yew (*Taxus Baccata baccata* L.) Through stem cuttings, Bulletin of Arunachal Forest Research 22 (1&2): 64-67, Technological University, Mahaveer Marg, Hyderabad 500 028, Volume 137.

Staden, J. (1993). *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation to improve rooting ability of eucalypts. Tree Physiology 12,41 l-4 18, 1993 Heron Publishing-Victoria, Canada.

Steen G., P., Bjarne, M., Stummann, P., Olesen, K.W., Henningsen, (2006). Structure and function of root-inducing (Ri) plasmids and their relation to tumor-inducing (Ti) plasmids. Physiologia Plantarum, Volume 77, Issue 3, pages 427–435.

Trypsteen M., M., Van lijsebettens, R., Van severen and M., Van montagu, (1991). Agrobacterium rhizogenes-mediated transformation of *Echinacea purpurea*., Plant cell Reports(1991) 10: 85-89.

Vilas P., F., White, J., Furner, A., Mitchell, P., Francois and P., Gordon., (1988). Reversion of Aberrant Plants Transformed with *Agrobacterium rhizogenes* Is Associated with the Transcriptional Inactivation of the TL-DNA Genes'. Plant Physiol. (1988) 86, 584-590. Volume 137.

Vlad m., I., Vlad, I., Mester, D., Grigore, S., Bartha and I., Smit, (2009) The Substratum Influence on Cutting's Rooting of *Taxus baccata*. Bulletin UASVM Horticulture, 66(1) 2009.

Wang B., g., zhang, l., zhua and l., chena, (2006). Genetic transformation of *Echinacea purpurea* with *agrobactrium rhizogenes* and bioactive ingredient analysis in transformed cultures. Colloids and surfaces B: biointerfaces 53(2006): 101-104.

White F., B H., Taylor, G A., Huffman, M P., Gordon and E W., Nester, (1985). Molecular and Genetic analysis of the transferred DNA regions of the root-inducing plasmid of Agrobactrium rhizogenes . journal of Bacterilogy p. 33-44.

Yeates L.D., R.F., Smith, S.L., Eameronand and J., Letourneau, (2005). Recommended procedures for rooting ground hemlok (*Taxus Canadensis)* cutting, Natural Resources CanadaCanadian Forest Service - Atlantic Forestry CentreP.O. Box 4000, Fredericton, New Brunswick,CANADA.

Zaspel I. and D. Ewald, (2000). Promotion of root development and root growth of forest plants by rhizobacteria.federal research centre for forestry and forest pruducts, Institute for forest genetics and forest tree Breeding, Eberswalder chaussee 3, D-15377 waldsieversdorf, Germany.

Zebarjadi, R., Sh., Najafi, H.R., Ghasempour and J., Motamedi, (2011). Establishment of a practical tissue culture for producing hairy roots of *Valeriana officinalis* L. via *Agrobacterium rhizogenes*. Journal of Medicinal Plants Research Vol. 5(20), pp. 4984-4992.

پیوست‌ها

پیوست۱: اثر استرین‌های مختلف اگروباکتریوم رایزوژنز و غلظت‌های مختلف هورمون ایندول بوتریک اسید بر درصد ریشه‌زایی ، کالوس‌زایی، تعداد ریشه، متوسط طول ریشه و بلندترین طول ریشه در قلمه‌های سرخدار.

Table1: Effect of various strains of *Agrobactrium rhizogenes* and different concentrations of ایندول بوتریک اسید on rooting and callus percent, root number, root length and increase of root length in Yew cutting.

اندازه بلندترین طول ریشه† Highest root length (cm)	متوسط طول ریشه Average of root length (cm)	تعداد ریشه† Root number	درصدریشه‌زایی Rooting %	درصدکالوس‌زایی Callus%	استرین آگروباکتریوم رایزوژنز Agrobacterium rizhogenes strains	هورمون ایندول بوتریک اسید (ppm)
3.77	3.16e	7	27.08fg	37.27e-g	No bacter	0
5.83	5.30c-e	11	43.05c-e	47.22c-e	LB9402	
4.37	4.28de	6	15i	21.94gh	C58C2	
5.44	5.39b-d	11	46.18c-e	56.94a-c	A4	
5.22	4.207b-e	9	36.11ef	40.66d-f	No bacter	500
7.88	7.24a-e	13	46b-e	55.55a-d	LB9604	
5.74	5.61c-f	7	18.05h	28.05fg	C58C2	
7.83	7.72bc	12	50.38a-c	65.27ab	A4	
6.44	6.23a-e	10	45d-f	48.94ef	No bacter	2500
8.83	8.205a-c	15	48.5b-d	57.16a-c	LB9604	
7	6.86a-e	8	25gh	34.66d-f	C58C2	
9.20	9.12ab	13	51.66ab	68.38a	A4	
7.55	7.01ab	13	47.5d	51.05d-f	No bacter	5000
9.11	8.58a	16	57.29ab	60bc	LB9604	
7.77	7.44a-e	9	29.44e-g	45.44cd	C58C2	
9.94	9.77a	16	59.16a	70.88a	A4	

†: اعداد فاقد حروف اختلاف معنی‌داری ندارند.

†: Non letters numbers are not significantly different

پیوست۲: اثر استرین‌های مختلف اگروباکتریوم رایزوژنز و غلظت‌های مختلف هورمون نفتالین استیک اسید بر درصد ریشه‌زایی ، کالوس‌زایی، تعداد ریشه، متوسط طول ریشه و بلندترین طول ریشه در قلمه‌های سرخدار.

Table1: Effect of various strains of *Agrobactrium rhizogenes* and different concentrations of نفتالین استیک اسید on rooting and callus percent, root number, root length and increase of root length in Yew cutting.

اندازه بلندترین طول ریشه Highest root length (cm)	متوسط طول ریشه Average of root length (cm)	تعداد ریشه Root number	درصدریشه‌زایی† Rooting %	درصدکالوس‌زایی† Callus%	استرین آگروباکتریوم رایزوژنز Agrobacterium rizhogenes strins	هورمون نفتالین استیک اسید (ppm)
5.08cd	3.91c	9ef	26.04	35.41	No bacter	0
6.87b-d	4.79a-c	13c-f	36.45	48.95	LB9402	
4.95d	2.75c	8e-f	16.66	22.91	C58C2	
7.18b-d	5.50bc	15ab	39.58	51.48	A4	
6.08a-d	4.83c	11ef	29.16	48.95	No bacter	500
7.16a-c	6.12ab	15a-d	44.79	60.41	LB9604	
6.16a-d	4.23a-c	10d-f	17.708	36.45	C58C2	
9.25ab	7.32ab	18a	47.91	61.45	A4	
7.5a-c	5.45a-c	15a-c	39.06	53.33	No bacter	2500
8.29ab	7.09a	18a	49.22	63.83	LB9604	
7.20a-c	4.41a-c	12d	31.25	40.95	C58C2	
10.08a	8.92a	20a	52.77	65.37	A4	

†: اعداد فاقد حروف اختلاف معنی‌داری ندارند.

†: Non letters numbers are not significantly different.

پیوست۳: اثر متقابل غلظت‌های مختلف هورمون‌های نفتالین استیک اسید و ایندول بوتریک اسیدبر درصد ریشه‌زایی ، کالوس‌زایی، تعداد ریشه، متوسط طول ریشه و بلندترین طول ریشه در قلمه‌های سرخدار.

Table1: Effect of different concentrations of نفتالین استیک اسید and ایندول بوتریک اسید on rooting and callus percent, root number, root length and increase of root length in Yew cutting

ایندول بوتریک اسید هورمون(ppm)	هورمون نفتالین استیک اسید(ppm)	درصدکالوس‌زایی Callus%	درصد ریشه‌زایی Rooting %	تعداد ریشه Root number	متوسط طول ریشه Average of root length (cm)	اندازه بلندترین طول ریشه Highest root length (cm)
0	0	39c-e	26.04de	8c-e	3.78cd	4.12de
	500	43.75c-e	38.54de	9cd	3.86cd	4.87cd
	2500	45.41b-d	44.12b-d	13a-d	4.81c	6.5b-d
500	0	40.62c-e	31.25c-e	11a-d	3.87cd	5.08c-e
	500	46.87bc	41.25cd	12b-d	6.21bc	8.08b-d
	2500	48.95b-c	46.87bc	14a-c	7.25a-d	8.75a-c
2500	0	46.87bc	33.208c-e	14a-c	4.53b-d	5.87b-e
	500	56.25ab	42.18bc	14b-c	8.75ab	8.95bc
	2500	57.75b	45.41ab	16ab	10.03a-c	11.33ab
5000	0	47.5b	35.25cd	14b	5.77b-d	6.91a-d
	500	60.41a	47.91ab	15ab	9.79ab	10ab
	2500	65.37a	51.04a	18a	12.8a	13.5a

†: اعداد فاقد حروف اختلاف معنی‌داری ندارند.

†: Non letters numbers are not significantly different.

Abstract

A greenhous experiment was conducted to evaluate the effects of strains agrobacterium rhizogenes and some ouxins(IBA andNAA) on adventitious root formation in stem cutting of Taxus bacata L. fifteen to twenty centimeter long stem cutting treated with different hormones and strains agrobacterium rhizogenes. Were transplanted in substrate containing ½ peat and ½ perlite and were kept in a greenhouse at 18-25 c· day/night temperatures. The treatments were using strains A4, LB9402, C58C2 with OD=0.6 and hormones IBA, NAA in differents concentrations 0, 500, 2500 and 0, 500, 2500 , 5000 ppm respectively and comparing them to control. The results indicated that positive effect of A4, LB9402 and IBA , NAA treatments on percentation Root formation, callus formation, root number,root medium length, increase root length and lateral. root number. Strains A4 , LB9402 in present IBA and NAA alone and IBA , NAA in combination together were significantly effect on Root formation, callus formation, root number,root medium length, increase root length and lateral root number. The results showed that using strains A4, LB9402 in present both hormones IBA , NAA in different concentrations 5000 and 2500 ppm respectively resulted the highest percentation root formation(90/66% , 87/5% respectively) and callus formation.

Key words: *Taxus bacata*, *Agrobactrium rhizogenes*, IBA, NAA, Rooting of cutting

University of Shahrood

Faculty Agriculture

The effects of auxins and A*grobacterium rizhogenes* on rooting of YeW cuttings (*Taxus baccata*)

Elham Farahi Ghasreabonasr

Supervisors:
Dr. Mahdi Rezaei
Dr. Hassan Khoshghalb

September 2014