مجله علوم و فنون باغبانی ایران جلد ۵ شماره ۲ صفحه های ۸۱ تا ۹۲ (۱۳۸۳)

مقاله کامل

بررسی افزایش درون شیشه‌ای دورگه طبیعی زردآلو × گوجه[۱]

INVESTIGATION ON *IN VITRO* PROPAGATION OF APRICOT × PLUM NATURAL HYBRID

رحیم ذوالفقاری نسب، محمود خسروشاهلی، وازگین گریگوریان و علیرضا مطلبی آذر[۲]

چکیده

این پژوهش با هدف افزایش دو رگه طبیعی زردآلو × گوجه در شرایط درون شیشه‌ای به منظور دستیابی به پایه‌های همگروهی[۳] و استفاده از پتانسیل مقاومت به سرمای آن در نواحی سردسیر شمال غرب کشوردر سال‌های ۱۳۸۱و ۱۳۸۲ در دانشکده کشاورزی دانشگاه تبریز انجام شد. در مرحله استقرار[٤]، ریز نمونه‌های تک جوانه‌ای[٥] در محیط کشت WPMو M1 نسبت به محیط MS، رشد مناسب و استقرار موفق‌تری از خود نشان دادند. در مرحله پرآوری[٦] از ریز نمونه‌های نوک شاخساره[۷] تولید شده از کشت‌های درون شیشه‌ای استفاده شد و بالاترین نسبت افزونگری[۸] شاخساره در محیط کشت WPM با ۱ میلی‌گرم در لیتر BAP به دست آمد. شاخساره‌های با طول به تقریب ۳ سانتی‌متر، در محیط کشت WPM و با استفاده از غلظت‌های مختلف دو نوع تنظیم کنندهٔ رشد IBA و NAA با موفقیت ریشه دار شدند و بالاترین درصد ریشه‌زایی با IBA و NAA به ترتیب در غلظت‌های ٦/٥ و ۲/۲ میلی‌گرم در لیتر به دست آمد. سازگار کردن[۹] شاخساره‌های ریشه‌دار شده به شرایط گلخانه‌ای با استفاده از سیستم مه افشانی[۱۰]، با موفقیت (٦٤/۳ ٪) انجام شد.

واژه‌های کلیدی: استقرار، پرآوری، دو رگه طبیعی زردآلو × گوجه، ریزنمونه، ریشه‌زایی، سازگاری. محیط کشت.

مقدمه

یکی از مشکل های اساسی در گسترش میوه‌کاری‌ها، به ویژه هسته‌دارها در مناطق سردسیر کشور از جمله در استان آذربایجان شرقی، حساسیت آن ها به سرمای زمستانه است. به طوری که بیشتر تنه درختان در اثر سرما آسیب دیده و در پایان درخت آسیب دیده از بین می‌رود. دورگه زردآلو × گوجه مورد نظر در این پژوهش که یک دورگه بین گونه‌ای طبیعی است تاکنون در شرایط سخت زمستان مقاومت خوبی به سرما نشان داده است و از این رو می‌توان از آن به عنوان پایه و نیز بخشی از تنه درخت پیوندی برای افزایش مقاومت درختان به سرما

۱- تاریخ دریافت: ۸۲/۱۱/۱۲ تاریخ پذیرش: ۸۳/٦/۲۵

۲- به ترتیب مربی دانشگاه آزاد اسلامی واحد خرمشهر, خرمشهر, دانشیار گروه زیست شناسی جانوری دانشگاه تبریز, تبریز, استاد و مربی گروه علوم باغبانی دانشکده کشاورزی دانشگاه تبریز, تبریز, جمهوری اسلامی ایران.

۳- Clonal ٤- Stablishment ٥- Single-node ٦- Proliferation ۷- Shoot tip

۸- Multiplication ۹- Acclimatization ۱۰- Mist system

Archive of SID

www.SID.ir

استفاده کرد. بنابراین انبوه‌سازی سریع و تولید پایه‌های همگروهی اهمیت زیادی دارد. با وجود استفاده از تیمارهای مختلف، توانایی ریشه‌زایی قلمه‌های حاصل از دورگه یاد شده پائین بوده و در همگروه سازی و تولید انبوه از این راه آسانی نمی‌باشد. از این رو برای افزایش توان ریشه‌زایی و تولید انبوه آن به عنوان پایه مناسب برای برخی ازدرختان میوه هسته دار، استفاده از ریز افزایشی[1] مطرح است.

استفاده از سیستم ریز افزایی برای انبوه‌سازی درختان میوه برتری بسیار زیادی نسبت به روش‌های افزایش سنتی دارد, از جمله تولید گیاهان عاری از ویروس، کوتاه کردن چرخه زایشی گیاه، امکان انجام آن در تمام طول سال، امتزاج پروتوپلاست و تولید گیاهان دورگه و چند رگه و تولید متابولیت‌های ثانویه (۵) و در سیستم‌های تولید تجاری درختان میوه معتدله و خشک میوه‌ها که از اواخر سال ۱۹۷۵ به کار گرفته شده‌است (۹, ۱٤). با وجود اهمیت بسیار زیاد پایه‌ها در توسعه کشت درختان میوه در سراسر جهان، تنها گزارش های اندکی در مورد افزایش درون شیشه‌ای موفق درختان میوه هسته دار وجود دارد (٤ ، ۱۰, ۱٦)، به این دلیل که ازدیاد درون شیشه‌ای گیاهان چوبی نسبت به گیاهان علفی دارای اشکال های بیشتری بوده و گیاهان چوبی (به ویژه درختان میوه هسته‌دار) از نظر باززایی درون شیشه‌ای شاخساره نابجا از ریز نمونه (به ویژه از ریزنمونه بالغ)، و همچنین از نظر ریشه‌زایی درون شیشه‌ای سرسخت[2] هستند (٤ ،۱۰ ،۱۳, ۱٤). از این رو استفاده از روش‌های کارآمد و گزینش محیط‌های کشت تخصصی‌تر برای انگیزش باززایی شاخساره از ریزنمونه‌ها (به ویژه از ریزنمونه‌های بالغ) برای توسعه سیستم ریزافزایی در درختان میوه هسته دار ضروری است.

بالا و ورتسی[3] در کشت درون شیشه‌ای موفق ارقام مختلف زردآلوی مجارستانی[4] در مرحله افزونگری، از نوک شاخساره‌های سال جاری و از BAP-riboside به جای BAP استفاده کردند، همچنین در مرحله ریشه‌زایی از غلظت‌های مختلف IBA وNAA استفاده کرده و بیان داشتند که ریشه‌زایی همه ارقام با موفقیت (بیش از ۹۰ ٪) انجام و ۷۵ تا ۹۵٪ شاخه‌های ریشه‌دار شده در رطوبت نسبی بالا به شرایط گلخانه سازگار شدند.

روزاتی و همکاران[5] (۱۵) موفق به ریز افزایی آلوی ژاپنی[6] با استفاده از ریز نمونه‌های نوک شاخساره ۵ تا۷ میلی‌متری این گونه در محیط کشت موراشیگی و اسکوگ[7] شدند. نسبت افزونگری شاخساره با استفاده از یک میلی‌گرم در لیتر BAP، در هر ماه ۱:۱۰ تا ۱:۲۰ گزارش شد. بالاترین درصد ریشه‌زایی با استفاده از ۲ تا ٤ میلی‌گرم در لیتر IBA در ۲۱ درجه سانتی‌گراد بدست آمد. این پژوهشگران زمان مورد نیاز برای آغازش رشد ریشه، میزان رشد ریشه و درصد نهایی گیاهان ریشه‌دار شده را با دمای اتاقک رشد مرتبط دانستند.

در افزایش درون شیشه‌ای پایه‌های پاکوتاه گیلاس (٦)، ریزنمونه‌های نوک شاخساره تولید شده از گیاهان جداسازی شده، با استفاده از ۱/۵ میلی گرم در لیتر BAP در محیط کشت MS، پرآوری بهینه داشتند.

لاوری و همکاران[8] (۱۰) در بررسی آغازش شاخه نابجا از مریستم انتهایی بادام و گونه‌های دیگر جنس پرونوس[9] (زردآلو، آلو و هلو) نشان دادند که باززایی شاخساره نابجا، با ۳۰ روز تیمار تاریکی و با استفاده از محیط کشت LP، دارای به تقریب۲ میلی‌گرم در لیتر BAP ، ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر NAA و ۲۵۰ میلی‌گرم در لیتر

۱- Micropropagation ۲- Recalcitrant ۳- Balla and Vertesy ٤- Hungarian apricot
۵- Rosati *et al.* ٦- *Prunus salicina* cv.Calita ۷- Murashige and skoog (MS)
۸- Lauri *et al.* ۹- *Prunus*

Archive of SID

www.SID.ir

سفوتاکسین با موفقیت انجام شد. سپس شاخساره‌ها به محیط دارای جیبرلیک اسید[1] GA_3، ولی بدون اکسین منتقل شدند و هر ماه یکبار زیر کشت[2] شدند.

پرز- تورنرو و همکاران[3] (۱٤)، در بررسی محیط‌های کشت مختلف برای افزایی زردآلوی رقم کانینو[4]، بیان کردند که پرآوری بهینه وتولید شاخه‌های سالم و سبز هنگامی بدست آمد که غلظت نمک های پرمصرف در محیط کشت گیاهان چوبی (۷) به نیم کاهش یافت. همچنین غلظت‌های ۰/۵ تا ۰/٦ میلی‌گرم در لیتر BAP، شاخه‌های سالم و مناسب برای انتقال به محیط ریشه‌زایی را به وجود آوردند و شاخه‌های ریشه‌دار شده باموفقیت به شرایط گلخانه سازگار شدند. گزارش های دیگری نیز در مورد افزایش درون شیشه‌ای گونه‌های مختلف جنس پرونوس با استفاده از بافت‌های بالغ وجود دارد، از جمله این گزارش ها می توان به بررسی باززایی شاخساره نابجا از ریز نمونه های برگی زردآلو (۱۳)، گیلاس و آلبالو (۱۸)، کشت درون شیشه‌ای گیلاس رقم 'اینمیل جی ام' ۹[5] (۱۷)، بررسی نیازمندی های محیط‌های کشت مختلف برای ریز افزایی ارقام زردآلو (۱۲)، بادام (۵)، پایه‌های پاکوتاه گیلاس (٦) و کشت مریستم زردآلو (۱۱) اشاره نمود. با توجه به ویژگی مقاومت به سرمای دورگه زردآلو× گوجه و امکان استفاده از آن به عنوان پایه مناسب برای برخی از درختان میوه هسته دار در نواحی سردسیر شمال غرب کشور و همچنین به دلیل سخت ریشه زا بودن قلمه های دورگه مذکور، تعیین دستور کار مناسب برای تکثیر آن به روش ریزافزایی و در پایان امکان همگروه سازی سریع آن با این روش به عنوان هدف‌های اصلی در این پژوهش مد نظر قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

تهیه مواد گیاهی

مواد گیاهی مورد نیاز به صورت قلمه‌های ۱۰ تا ۱۵ سانتی‌متری از شاخه‌های جوان و در حال رشد فعال، ازناحیه میوه‌کاری ایستگاه تحقیقات کشاورزی خلعت‌پوشان وابسته به دانشکده کشاورزی دانشگاه تبریز تهیه شد. در آزمایشگاه برای راحتی انجام کار و کمک به گندزدایی موثر، شاخه‌های یاد شده به ریز قلمه‌های ۲ تا۳ جوانه ای تقسیم شده و پس از شستشو با مایع ظرفشویی، به مدت ۳ ساعت زیر آب جاری قرار داده شدند. گندزدایی مواد گیاهی با استفاده از نیترات نقره ۰/۰۵ ٪ به مدت ده دقیقه در زیر اتاقک جریان هوا[6] صورت گرفت و سپس برای برطرف کردن بقایای ماده گندزدایی کننده از سطح مواد گیاهی آبکشی آن ها با استفاده از آب مقطر گندزدایی شده در ۳ نوبت سه دقیقه ای انجام شد. پس از قطع قسمت های آسیب دیدهٔ ناشی از تیمارهای گندزدایی با استفاده از اسکالپل ضد عفونی شده، و همچنین آبگیری ریزنمونه ها به وسیله کاغذهای صافی ضدعفونی شده در داخل ظروف پتری، ریز نمونه‌ها به صورت تک جوانه‌ای در محیط‌های کشت قرار داده شدند.

مرحله استقرار

به منظور انتخاب محیط کشت بهینه برای استقرار و رشد ریزنمونه‌های تک جوانه، از محیط‌های کشت WPM (۷)، MS[7] (۷) و M1 (۱۲)، هر کدام با ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP، برای شاخه‌زایی استفاده شد. محیط‌های کشت پس از توزیع در ظروف شیشه ای مک کارتی و لوله های آزمایش، با تحمل دمای ۱۲۱ درجه سانتیگراد و فشار ۱/۲ اتمسفر به مدت ۲۰ دقیقه گندزدایی شدند. pH محیط های کشت پیش از گندزدایی کردن با استفاده از محلول‌های ۰/۱ نرمال سود (NaOH) و اسید کلریدریک (HCl) روی ۵/۷ تنظیم و به ازای هر لیتر

۱- Gibberellic acid (GA_3) ۲- Subculture ۳- Perez –Tornero *et al.*

٤- *Prunus armeniaca* cv. Caninno ۵- 'Inmil GM_9' ٦- Laminar air flow ۷- Murashige and Skoog

Archive of SID

www.SID.ir

محیط کشت ۷/۵ گرم آگار و ۳۰ گرم سوکروز افزوده شد. این آزمایش در قالب طرح به طور کامل تصادفی با ۱۰ تکرار انجام شد. هر واحد آزمایشی شامل ۵ شیشه مک کارتی بوده و در هر شیشه یک ریزنمونه کشت گردید. درصد ریزنمونه‌های رشد کرده و قهوه‌ای شده و وضعیت کلی رشد ریزنمونه‌ها مورد ارزیابی قرار گرفت.

کشت ذخیره

کشت ذخیره[1] برای استفاده در مراحل بعدی، با استفاده از محیط کشت WPM، دارای ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP انجام شد. زیر کشت ها با فاصله زمانی ۲۰ تا ۲۵ روز انجام شدند.

مرحله پرآوری

در این مرحله تعیین نسبت افزونگری بهینه و ارزیابی غلظت‌های مختلف BAP (۰، ۰/٦، ۰/۸ و ۱ میلی گرم در لیتر) از نظر پرآوری تعداد شاخساره در دو محیط کشت WPM و M1 مورد توجه قرار گرفت. ریز نمونه‌های نوک شاخساره (با طول تقریبی۰/۷ سانتی‌متر و ۲ تا ۳ برگ) از کشت های ذخیره تهیه شده و مورد استفاده قرار گرفتند. این آزمایش در قالب طرح به طور کامل تصادفی با ٤ تکرار انجام شد. هر واحد آزمایشی شامل ٦ شیشه مک کارتی بوده و در هر شیشه حاوی ۲۵ میلی لیتر محیط کشت، یک ریزنمونه کشت شد. تعداد شاخه حاصل از هر ریزنمونه (شاخساره‌های با طول بیش از ۰/۵ سانتی‌متر) شمارش شدند و وضعیت ظاهری شاخساره‌های تولید شده از نظر وجود ناهنجاری‌های احتمالی در شرایط درون شیشه‌ای، به عنوان اساس مقایسه بین تیمارها در نظر گرفته شد.

مرحله ریشه‌زایی

در این مرحله تاثیر غلظت‌های مختلف IBA (۰، ۱/۵، ٤ و ٦/۵ میلی گرم در لیتر) و NAA (۰، ۰/٤، ۱ و ۲/۲ میلی‌گرم در لیتر) روی ریشه‌زایی شاخساره‌ها بررسی شد. ابتدا شاخساره‌های ۲ تا ۳ سانتی‌متری انگیزش ریشه‌زایی[2]، به مدت ۱۰ روز تحت تاثیر تیمارهای مختلف دو تنظیم کننده رشد NAA و IBA قرار گرفتند و سپس برای رشد بهتر ریشه‌ها، به محیط کشت WPM، با نصف غلظت نمک های ماکرو و بدون اکسین منتقل شدند. این آزمایش در قالب طرح به طور کامل تصادفی در ٤ تکرار انجام شد. هر واحد آزمایشی شامل ۵ لوله آزمایش ۲۵*۲/۵ سانتی متری بوده و در هر لوله آزمایش یک شاخه به عنوان ریزقلمه کشت شد. شمارش تعداد شاخه‌های ریشه‌دار شده پس از یک هفته و شمارش تعداد ریشه در هر ریز نمونه و اندازه‌گیری طول ریشه‌ها و طول ساقه گیاهچه‌ها، ۳ هفته پس از انتقال به محیط بدون اکسین صورت گرفت.

شرایط رشد

در همه مراحل این پژوهش کشت‌ها در دمای 24 ± 1 درجه سانتی‌گراد و فتوپریود ۱٦ ساعته که با استفاده از لامپ‌های فلورسنت در اتاقک کشت تأمین می‌شد, قرار گرفتند. شدت نور برابر با ۳۵ تا ٤۰ میکرومول بر متر مترب بر ثانیه[3] بود.

۱- Stock culture ۲- Root Induction ۳- $35 - 40\,\mu\ molm^{-2}s^{-1}$

Archive of SID

www.SID.ir

مرحله سازگاری

در این مرحله گیاهچه‌های ریشه‌دار شده از لوله آزمایش خارج شده و پس از شستن آگار از روی ریشه‌ها، در ظروف یک بار مصرف حاوی پرلیت، به مدت چهار هفته در شرایط مه افشان قرار داده شدند. در طول ٤ هفته رطوبت نسبی محیط داخل مه افشان به تدریج از ۸۰ ٪ به ٤٥ ٪ کاهش داده شد و پس از پایان هفته چهارم گیاهچه‌ها به تقریب به شرایط معمولی آزمایشگاه سازگار شدند. این گیاهچه‌ها به مدت ٤ هفته دیگر نیز در شرایط معمولی آزمایشگاه نگهداری شدند و سپس به گلدان‌های بزرگ دارای آمیخته خاکی ($\frac{1}{3}$ شن + $\frac{1}{3}$ ماده آلی + $\frac{1}{3}$ خاک مزرعه) منتقل و در باغ میوه کاری ایستگاه تحقیقات کشاورزی منطقه خلعت‌پوشان نگهداری شدند. از شروع مرحله سازگاری تا مرحله انتقال به گلدان‌های بزرگ دارای آمیخته خاکی، گیاهچه‌ها هر روز با محلول هوگلند و اشنایدر[1] (۸) آبیاری شدند.

نتایج

مرحله استقرار

نتایج به دست آمده از مرحله استقرار نشان داد که بین سه محیط کشت WPM، MS و M1 از نظر درصد ریزنمونه‌های رشد یافته و قهوه ای شده در سطح احتمال ۱٪ اختلاف معنی‌دار وجود دارد. بالاترین میانگین درصد ریزنمونه‌های رشد یافته و کمترین میانگین درصد ریزنمونه‌های قهوه‌ای شده در محیط‌های کشت WPM و M1 مشاهده شد که به ترتیب در محیط کشت WPM برابر با ۷۷ و ۲۳ ٪و درمحیط کشت M1 برابر با ۷٤/٥ و ۲۲/٥ ٪ بود. محیط کشت MS نسبت به دو محیط کشت دیگر از نظر میانگین درصد ریز نمونه‌های رشد یافته در سطح پایین و از نظر میانگین درصد ریزنمونه‌های قهوه‌ای شده در سطح بالاتری قرار داشت (شکل ۱). وضعیت کلی رشد شاخساره‌ها نیز مورد ارزیابی قرار گرفت و مشخص شد که شاخساره‌ها در محیط کشت WPM و M1 دارای رشد مطلوب و وضعیت ظاهری مناسب (سالم و سبز رنگ) بودند و هیچ گونه نشانه کمبود و یا عارضه‌ای در آن ها مشاهده نشد (شکل ٦- الف)، ولی در محیط MS رنگ پریدگی برگ‌ها، علائم روخمشی[2] و بافت مردگی شدن انتهای برگ ها ثبت گردید (شکل ٦- ب).

مرحله پرآوری

نتایج به دست آمده از مرحله پرآوری نشان داد که بین دو محیط کشت WPM و M1 از نظر میانگین تعداد شاخساره تولید شده اختلاف معنی‌داری وجود ندارد، ولی بین غلظت‌های مختلف BAP در هر دو محیط کشت WPM و M1 (شکل ۲)، از نظر تعداد شاخساره تولید شده در سطح احتمال ۱٪ اختلاف معنی وجود دارد. با افزایش غلظت BAP در هر دو محیط کشت، تعداد شاخساره روند افزایشی داشت و بالاترین تعداد شاخساره در هر دو محیط کشت در غلظت ۱ میلی‌گرم در لیتر به دست آمد شد (شکل ٦- ج).

۱- Hogland & Snyder ۲- Epinasty

Archive of SID

www.SID.ir

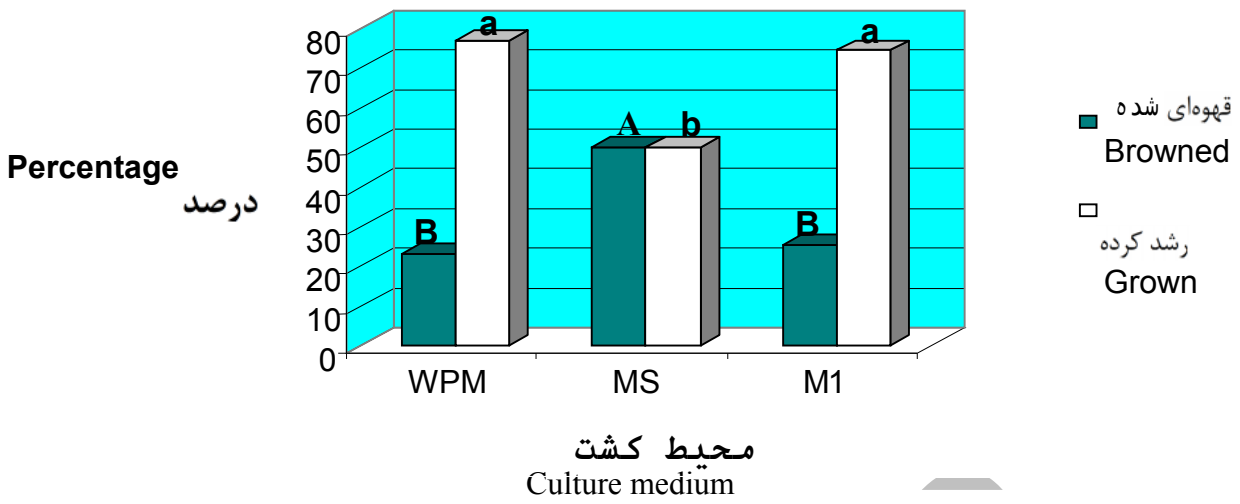

Fig. 1. Effects of different media on stablishment of single-node explants of apricot × plum hybrid. Means with the same capital or small letters are not significantly different at 1% level of probability using DMRT.

شکل ۱- اثر محیط‌های کشت مختلف بر استقرار ریزنمونه‌های تک جوانه‌ای دورگه زردآلو × گوجه. میانگین‌هایی که دارای حروف یکسان بزرگ ویا کوچک هستند در سطح ۱٪ آزمون دانکن تفاوت‌معنی‌داری نداشته‌اند.

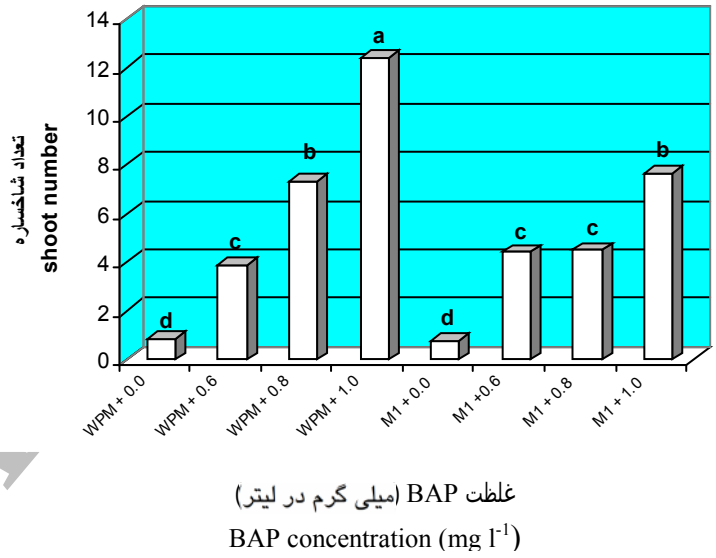

Fig. 2 . Effects of different concentrations of BAP on shoot number of apricot × plum hybrid explants on M1 and WPM media. Means with the same letters are not significantly different at 1% level of probability using DMRT.

شکل ۲- اثر غلظت‌های مختلف BAP بر تعداد شاخساره تولید شده از ریزنمونه های دورگه زردآلو × گوجه روی محیط کشت M1 ومحیط کشت WPM . میانگین‌هایی که دارای حروف یکسان هستند در سطح ۱٪ آزمون دانکن تفاوت معنی داری نداشته اند.

مرحله ریشه‌زایی

Archive of SID

www.SID.ir

نتاج به دست آمده از مرحله ریشه‌زایی نشان داد که بین دو نوع تنظیم کننده رشد IBA و NAA از نظر میانگین درصد ریزقلمه‌های ریشه‌دار شده اختلاف معنی‌داری وجود ندارد ولی بین غلظت‌های مختلف IBA و NAA از نظر درصد ریزنمونه‌های ریشه‌دار شده در سطح احتمال ۱٪ اختلاف معنی‌دار وجود دارد (شکل۳). در هر دو تنظیم کننده رشد کمترین درصد ریشه‌زایی در تیمار شاهد مشاهده شد و با افزایش غلظت، میانگین تعداد ریزنمونه‌های ریشه‌دار شده نیز افزایش یافت و بالاترین درصد ریشه‌زایی در غلظت نهایی NAA مشاهده گردید در حالی که غلظت های مختلف IBA با یکدیگر اختلاف معنی داری نداشتند. شکل (٦- د) مرحله رشد ریشه‌ها در محیط WPM با نصف غلظت نمک های ماکرو را نشان می‌دهد.

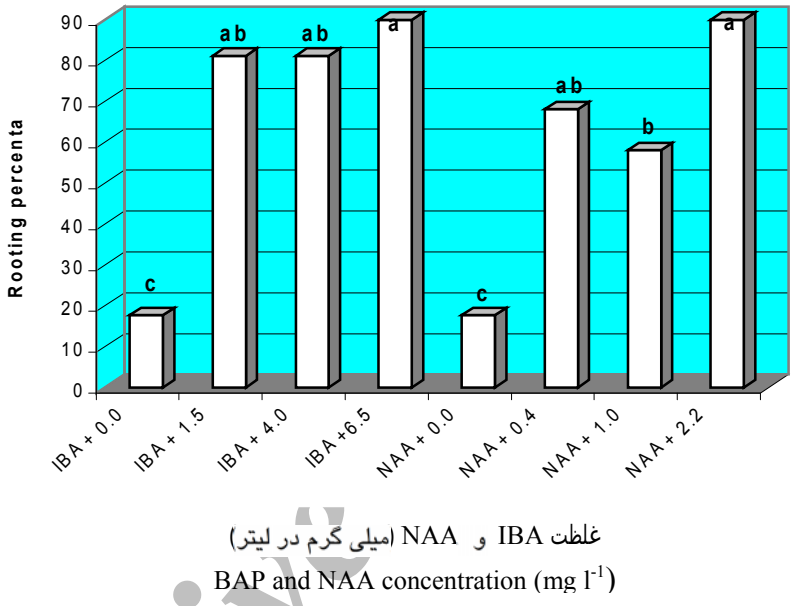

Fig. 3. Effects of different concentrations of NAA and IBA on rooting percentage of apricot × plum hybrid microcuttings. Means with the same letters are not significanty different at 1% level of probability uising DMRT.

شکل ۳ – اثر غلظت‌های مختلف IBA و NAA بر درصد ریشه‌زایی ریزقلمه های دو رگه زردآلو × گوجه. میانگین‌هایی که دارای حروف یکسان هستند در سطح ۱٪ آزمون دانکن با یکدیگر تفاوت معنی‌داری نداشته‌اند.

در مرحله ریشه‌زایی، میانگین تعداد ریشه تولید شده در هر ریزنمونه، طول ریشه و طول ساقه گیاهچه‌ها نیز مورد ارزیابی قرار گرفت و نتایج به دست آمده نشان داد که، در مجموع بین IBA و NAA از نظر میانگین تعداد ریشه در هر ریزنمونه در سطح احتمال ۱٪ اختلاف معنی‌دار وجود دارد ولی از نظر میانگین طول ریشه و طول ساقه اختلاف معنی‌داری وجود ندارد. با وجود این، بین غلظت‌های مختلف هر دو تنظیم کننده رشد IBA و NAA (جدول ۱), از نظر میانگین تعداد ریشه در هر ریزنمونه و میانگین طول ریشه و ساقه، در سطح احتمال ۱٪ اختلاف معنی‌دار وجود دارد. با افزایش غلظت IBA میانگین تعداد ریشه و ساقه افزایش یافت، ولی میانگین طول ریشه کاهش پیدا کرد. در مورد NAA نیز به تقریب روند مشابهی دیده شد. تفاوت غلظت‌های مختلف IBA و NAA از نظر میانگین تعداد ریشه در هر ریزنمونه و طول ریشه و ساقه، با تیمار شاهد در سطح احتمال ۱٪ معنی‌دار گردید.

جدول ۱– اثر غلظت های مختلف IBA و NAA روی تعداد ریشه، طول ریشه و طول ساقه در ریز قلمه های دورگه زردآلو × گوجه.

Archive

www.SID.ir

Table. 1. Effects of different concentrations of IBA and NAA on root number, root length and shoot length of apricot × plum hybrid microcuttings.

Treatment تیمار	Root number تعداد ریشه	Root length (mm) طول ریشه (میلی‌متر)	Shoot length (mm) طول شاخه (میلی‌متر)
Control	0.20d†	15.00d	2.50d
IBA 1.5 mg L^{-1}	5.13c	71.83a	5.04c
IBA 4.0 mg L^{-1}	9.35 b	57.11b	5.23bc
IBA 6.5 mg L^{-1}	12.69a	36.78c	5.38b
Control	0.13d	17.33d	2.50d
NAA 0.4 mg L^{-1}	3.60c	59.37b	6.22a
NAA 1.0 mg L^{-1}	4.21c	41.25c	6.11a
NAA 2.2 mg L^{-1}	8.35b	52.67b	5.00c

† Means with the same letters are not significant at 1% level of probability using DMRT.

† میانگین‌هایی که دارای حروف یکسان هستند در سطح ۱٪ آزمون دانکن با یکدیگر تفاوت معنی‌داری نداشته‌اند.

مرحله سازگاری

گیاهچه‌های ریشه‌دار شده و سالم با استفاده از سیستم مه افشان و یک برنامه تغذیه‌ای مناسب، در بستر پرلیت به طور موفقیت‌آمیزی به شرایط محیط بیرون سازگار شده (شکل ٦- هـ) سپس به گلدان‌های حاوی آمیخته خاکی ($\frac{1}{3}$ شن + $\frac{1}{3}$ ماده آلی + $\frac{1}{3}$ خاک مزرعه) منتقل شده و در باغ میوه‌کاری ایستگاه تحقیقات کشاورزی منطقه خلعت‌پوشان نگهداری شدند. موفقیت سازگاری با این روش به تقریب ٦٤/٣٪ بود. بررسی ارتباط بین گیاهچه‌های سازگار شده و تعداد ریشه در هر گیاهچه نشان داد که حدود ٨٩/٣٪ از گیاهچه‌های سازگار شده بیشتر از ٥ عدد ریشه داشتند.

بحث

هدف از مرحله استقرار دستیابی به درصد بالایی از کشت‌های سترون و تثبیت واحد گیاهی جدا شده در محیط کشت است (١, ٢). آن چه که می‌تواند به عنوان یک معیار کلی در موفقیت تیمارهای گندزدایی در نظر گرفته شود درصد ریزنمونه‌های استقرار یافته در محیط کشت است که عبارتست از درصد ریزنمونه‌های بدون آلودگی که آغازش رشد نیز در آن ها مشاهده شده است. منابع مختلف درصد ریزنمونه‌های استقرار یافته را با نوع محیط کشت، نوع و غلظت تنظیم کننده رشد، نوع ریز نمونه و ژنوتیپ گیاه مرتبط می‌دانند (٥، ٩، ١٤, ١٦)، و به همین دلیل در ریزافزایی پایه‌های مختلف درختان میوه از محیط‌های کشت متفاوتی استفاده شده است. انواع مختلف ناهنجاری‌های رشد، نظیر کلروز برگ ها، بافت مرده شدن انتهای برگ‌ها، آبکی شدن و قهوه‌ای شدن بافت‌ها، تولید اتیلن و ایجاد روخمشی (٩، ١١، ١٣, ١٤) به نحوی با نوع محیط کشت در ارتباط هستند. در این پژوهش مشخص شد که نوع محیط کشت تاثیر بسزایی بر سلامت گیاهچه‌ها و در نتیجه استقرار موفق ریزنمونه‌ها دارد، به طوری که کلروزه شدن برگ ها و ایجاد روخمشی و همچنین بافت مرده شدن انتهای برگ ها از جمله نارسایی‌های رشد بودند که در محیط MS مشاهده شدند و این نتایج با یافته‌های پرز- تورنرو و همکاران[١] (١٤) که محیط کشت WPM را برای ریزافزایی ارقام مختلف زردآلو مناسب تشخیص دادند همخوانی دارد. عواملی مثل رشد سریع گیاهچه‌ها در محیط MS به دلیل مقادیر بالای نیترات و تماس نوک برگ ها با دیوارهٔ ظروف کشت، تجمع رطوبت به صورت قطره در انتهای برخی از برگ ها، زیرکشت کردن با فواصل طولانی و در نتیجه

١- Perez-Tornero *et al.*

Archive of SID

www.SID.ir

کمبود برخی از عناصر غذایی می‌تواند از جمله عوامل کلروز و بافت مرده شدن انتهای برگ ها باشد. تنش حاصل از این عوامل باعث فعال شدن چرخهٔ تولید اتیلن در گیاه شده و در مراحل پیشرفته‌تر سبب ایجاد حالت روخمشی در برگ ها خواهد شد. کلسیم عنصری است که نقش بسیار مهمی در ساختار دیوارهٔ یاخته ای دارد، ولی دارای تحرک بسیار کمی در داخل بافت گیاهی بوده و بازده و حرکت آن در داخل گیاه تابع تعرق گیاه است و در شرایط درون‌شیشه‌ای زمانی که میزان رطوبت بالا باشد تعرق گیاه و در نتیجه جذب کلسیم کاهش پیدا کرده و قهوه‌ای شدن و مرده شدن بافت ها در نتیجه تجزیه و تخریب یاخته‌ها رخ می‌دهد (۱۶, ۱۷). بافت مرده شدن مریستم انتهایی بیشتر در طول مرحلهٔ ریشه‌زایی هنگامی که شاخساره به محیط بدون سایتوکینین انتقال می‌یابد و هنوز هیچ ریشه‌ای تشکیل نشده است رخ می دهد، که این کمبود باعث توقف تقیسم یاخته ای و رشد مریستم انتهایی و نکروزه شدن آن می‌شود (۱۰، ۱۲ ,۱٤). در این پژوهش هیچ گونه نشانه ای از بافت مرده شدن جوانهٔ انتهایی مشاهده نشد. در این پژوهش نیز از محیط‌های WPM و M1 نتایج بسیار مناسبی حاصل شد. قهوه‌ای شدن بافت مشکلی است که بیشتر در فرآیند کشت بافت مشاهده می‌شود و بیشتر در گونه‌هایی دیده می‌شود که دارای مقادیر بالای تانن و یا دیگر هیدروکسی فنول‌ها باشند. قهوه‌ای شدن در بافت‌های پیر بیشتر از بافت‌های جوان و در گیاهان چوبی بیشتر از گیاهان علفی است (۱ , ۲). در این پژوهش هیچ گونه نشانه ای از وجود مواد فنولی در بافت‌ها مشاهده نشد، ولی استفاده از نیترات نقره به عنوان ماده گندزدایی کننده می‌تواند دلیل قهوه‌ای شدن بافت ریزنمونه‌ها باشد، زیرا نشان داده شده است که استفاده از کلرید جیوه و نیترات نقره، به دلیل خاصیت ترکیب‌پذیری بالای آن ها با پروتئین‌ها می‌تواند باعث بافت مردگی و در نتیجه قهوه‌ای شدن بافت شود.

رزاتی و همکاران (۱۵) در ریز افزایی آلوی ژاپنی و پرز– تورنرو و همکاران (۱٤) در ریزافزایی زردآلوی رقم کانینو نشان دادند که با افزایش غلظت BAP، شدت افزونگری بسیار بالا، و طول شاخساره‌ها حداقل بود. در این پژوهش نیز با افزایش غلظت BAP، تعداد شاخساره تولید شده از هر ریز نمونه در هر دو محیط WPM و M1 افزایش یافت. به طوری که بالاترین میانگین تعداد شاخساره (۱۲/٤۱) در غلظت ۱ میلی‌گرم در لیتر در محیط WPM به دست آمد، ولی طول شاخساره‌ها به شدت کاهش پیدا کرد، به طوری که برای دستیابی به شاخساره‌های با طول مناسب، لازم بود ۲ تا ۳ بار زیرکشت در طول مرحله پرآوری انجام شود.

انگیزش ریشه‌زایی در شرایط درون شیشه‌ای یکی از مهمترین مراحل ریزافزایی است، ولی به ویژه ریشه‌زایی گیاهان چوبی بالغ اغلب به سختی صورت می گیرد (۳, ٦). در این پژوهش دو نوع تنظیم کننده رشد مورد استفاده از نظر درصد ریشه‌زایی تفاوت معنی‌داری نداشتند، که این نتایج با یافته‌های پرز–تورنرو و همکاران (۱٤) همخوانی دارد. همچنین دو نوع تنظیم کننده رشدIBA و NAA از نظر میانگین تعداد ریشه در هر ریزنمونه نیز تفاوت معنی‌داری نداشتند، ولی با این وجود، بالاترین میانگین تعداد ریشه (۱۲/٦۹) در غلظت ٦/٥ میلی‌گرم در لیتر IBA به دست آمد.

با افزایش غلظت IBA و NAA میانگین تعداد ریشه در هر ریزنمونه افزایش یافت و در این مورد تجزیه رگرسیون نیز نشان داد که بین غلظت‌های مختلف IBA و میانگین تعداد ریشه رابطه خطی و معنی‌دار در سطح احتمال ۱٪ وجود دارد (شکل ٤). بررسی روند تغییرات تعداد ریشه در غلظت‌های مختلف NAA نیز نشان داد که بین غلظت‌های مختلف این تنظیم کننده رشد و میانگین تعداد ریشه در هر ریزنمونه رابطه درجه ۳ و معنی‌دار در سطح احتمال ۱٪ وجود دارد و چنین استنباط می‌شود که با افزایش غلظت NAA ابتدا میانگین تعداد ریشه افزایش یافته و پس از یک روند ثابت دوباره افزایش پیدا می کند (شکل ٥). بررسی نتایج مربوط به تاثیر غلظت‌های مختلف IBA بر میانگین تعداد ریشه در هر ریزنمونه، میانگین طول ریشه و میانگین طول شاخه نشان داد که با

Archive of SID

www.SID.ir

افزایش میانگین تعداد ریشه، میانگین طول ریشه کاهش یافته، ولی میانگین طول شاخه افزایش پیدا کرد. در توضیح این مطلب می‌توان چنین بیان کرد که هر چه تعداد ریشه در هر ریزنمونه زیاد باشد از میانگین طول ریشه کاسته می‌شود و افزایش تعداد ریشه در هر ریزنمونه می‌تواند با تأثیر بر جذب بیشتر آب و مواد غذایی از محیط کشت، طول ساقه گیاهچه‌ها را افزایش دهد. این مطلب در مورد تنظیم کننده رشد NAA قابل توجیه نبود.

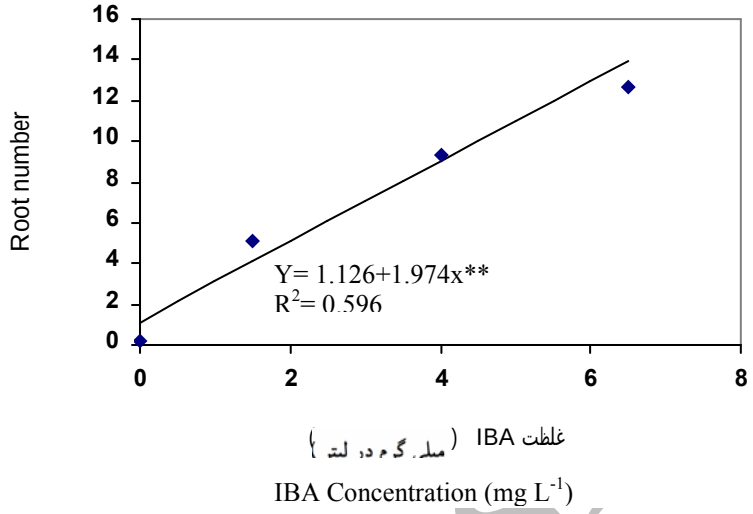

Fig. 4. Linear regression of relationship between root number on microcuttings of apricot × plum hybrid in different concentrations of IBA.

شکل ٤- رگرسیون خطی رابطه بین تعداد ریشه روی ریزقلمه‌های دو رگه زردآلو × گوجه در غلظت های مختلف IBA.

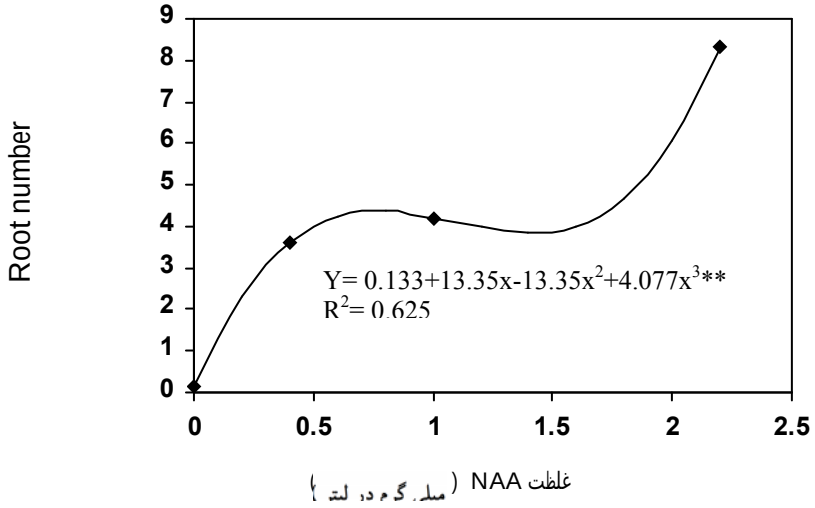

Fig. 5. Regression curve of root number on microcuttings of apricot × plum hybrid in different concentrations of NAA.

شکل ٥- منحنی رگرسیونی تعداد ریشه روی ریزقلمه‌های دورگه زردآلو × گوجه در غلظت‌های مختلف NAA.

www.SID.ir

موفقیت ریزافزایی به توانایی انتقال گیاهچه‌ها به بستر گلدان و سازگار کردن موفق آنها به شرایط محیط بیرون بستگی دارد. چانونتاپیپات و همکاران[1] (۵) در سازگاری ارقام بادام، بدون اشاره به نسبت ترکیب پیت خزه و ورمی کولایت بیان کردند که ۹۲ ٪ موفقیت در سازگار کردن گیاهچه‌ها به شرایط خارج شیشه حاصل شده است. سازگاری موفق گیاهچه‌های زردآلو نیز با انتقال آنها به گلدان‌های دارای آمیخته پیت و پرلایت به نسبت ۱:۱ و کاهش تدریجی رطوبت به دست آمد (۱٤).

در سازگاری گیاهچه‌های دو رگه زردآلو × گوجه که با ٦٤/۳٪ موفقیت انجام شد، مشخص شد که ۸۹/۳ ٪ گیاهچه‌های سازگار شده به محیط بیرون بیش از ۵ عدد ریشه داشتند و این مطلب نشان دهنده آن است که تعداد ریشه زیادتر می‌تواند تاثیر بسزایی در سازگاری موفق گیاهچه‌ها داشته باشد.

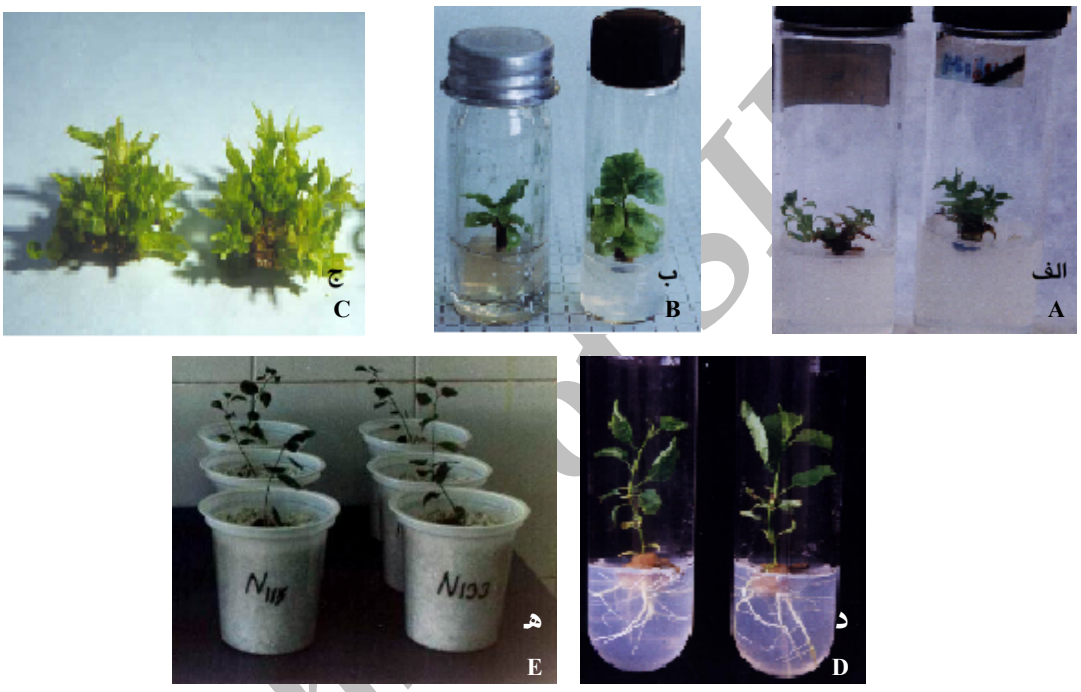

Fig. 6. Different stages of apricot × plum natural hybrid micropropagation: A and B) Stablishment stage on M1 and MS media respectively, C) Multiplication stage on WPM, D) Rooting stage on modified WPM medium and E) Acclimatized plantlets, using mist system.

شکل ٦- مراحل مختلف ریزافزایی دورگه زردآلو × گوجه: الف وب) به ترتیب مرحله استقرار در محیط کشت M1 و MS؛ ج) مرحله افزونگری در محیط WPM؛ د) مرحله رشد ریشه‌ها در محیط WPM تغییر یافته؛ هـ) گیاهچه‌های سازگار شده با استفاده از سیستم مه افشان.

سپاسگزاری

بدینوسیله از معاونت پژوهشی دانشگاه تبریز برای تأمین هزینه‌های مربوط به این پژوهش تشکر و قدردانی می‌شود.

۱- Chanontapipat *et al.*

Archive of SID

www.SID.ir

منابع REFERENCES

۱. احسان‌پور، ع. ا. و ف. امینی. ۱۳۸۰. کشت سلول و بافت گیاهی. چاپ اول. انتشارات جهاد دانشگاهی اصفهان.

۲. خوشخوی، مرتضی. ۱۳۷۳. فنون کشت بافت برای گیاهان باغبانی . چاپ اول. انتشارات دانشگاه شیراز.

3. Ainsley, Ph.J., G.G. Collins and M. Sedgley. 2001. *In vitro* rooting of almond (*Prunus dulcis* Mill.). *In vitro* Cell. Dev. Biol. Plant. 37:778-785.
4. Balla, I. and J. Vertesy. 2001. *In vitro* culture of Hungarian apricot (*Prunus armeniaca* L.) varieties. Acta Hort. 560:395-398.
5. Channuntapipat, Ch., M. Sedgley and G. Collins. 2003. Micropropagation of almond cultivars 'Non pareil' and 'Ne Plus Ultra' and the hybrid rootstock Titan × Nemagard. Sci. Hort. 98:473-484.
6. Erbenova, M., F. Paprstein and J. Sedlak. 2001. *In vitro* propagation of dwarfed rootstocks for sweet cherry. Acta Hort. 560:477-480.
7. Hartmann, H.T., D.E. Kester, F.T. Davies and R.L. Geneve.1997. Plant Propagagion, Principle and Practices.Prentice-Hall Inc, Englewood Cliffs, NJ, U.S.A.770 p.
8. Jones, J.B. 2001. Hydroponics: A Guide for the Soiless Grower. St. Lucie press. 230 p.
9. Hatchinsun, F.J. and H.R. Zimmerman. 1987. Tissue culture of temperate fruit and nut trees. In: J. Janick,(ed.). Horticultural Reviews. Vol. 9. Van Nostrand Reinhild Company Inc. 37-349 p.
10. Lauri, P., E. Caboni and C. Damiano. 2001. *In vitro* adventitious shoot regeneration from vegetative apices of almond and other *Prunus* species. Acta Hort. 560:403-406.
11. Perez-Tornero, O., L. Burgos and J. Egea. 1999. Introduction and establishment of apricot *in vitro* through regeneration of shoots from meristem tips. *In vitro* Cell. Dev. Biol. Plant. 35:249-253.
12. Perez-Tornero, O. and L. Burgos. 2000. Different media requirements for micropropagation of apricot cultivars. Plant Cell. Tiss. Org. Cult. 63:133-141.
13. Perez-Tornero, O., J. Egea, A. Vanoostende and L. Burgos. 2000. Assessment of factors affecting adventitious shoot regeneration from *in vitro* cultured leaves of apricot. Plant. Sci. 158:61-70.
14. Perez-Tornero, O., J.M. Lopez, J. Egea and L. Burgos. 2000. Effect of basal media and growth regulators on the *in vitro* propagation of apricot (*Prunus armeniaca* L.) cv. Cannino. J. Hort. Sci. Biotech. 75:283-286.
15. Rosati, P., G. Marino and Ch. Swierczewski. 1980. *In vitro* propagation of Japanese plum (*Prunus salicina* Lindl. cv. Calita) . J. Amer. Soc. Hort. Sci. 105:126-129.
16. Ruzic, D., M. Saric, R. Cerovic and L. Culafic. 2000. Relationship between the concentration of macroelements their uptake and multiplication of cherry rootstock Gisela 5 *in vitro*. Plant Cell. Tiss. Org. Cult. 63:9-14.
17. Ruzic, D., M. Saric, R. Cerovic and L. Culafic. 2001. Change in macroelement content of the media and in sweet cherry Inmil GM 9 shoots during *in vitro* culture. J. Hort. Sci. Biotech. 78:295-299.
18. Tang, H., Z. Ren, G. Reustle and G. Krczal. 2002. Plant regeneration from leaves of sweet and sour cherry cultivars. Sci. Hort. 93:235-244.

Archive of SID

www.SID.ir