تکثیر درون شیشه ای انار رقم میخوش (*Punica granatum* L.)

فرحناز معطری*[۱]، محمد هدایت[۲]، ساسان راستگو[۲] محمد مدرسی[۳]

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد علوم باغبانی، دانشگاه خلیج فارس، بوشهر. ۲- استادیار گروه علوم باغبانی، دانشگاه خلیج فارس، بوشهر. ۳- استادیار گروه اصلاح نباتات، دانشگاه خلیج فارس، بوشهر.

*نویسنده مسئول: farah.moattari@yahoo.com

چکیده

انار یکی از مهم‌ترین میوه‌های مناطق گرمسیری و نیمه گرمسیری جهان است. علاوه بر ارزش خوراکی، خواص دارویی و زینتی نیز دارد. در این پژوهش ریزنمونه جوانه جانبی را پس از گندزدایی در محیط کشت موراشیگی و اسکوگ که حاوی غلظت‌های مختلف بنزیل آدنین (۱ و ۲ میلی گرم در لیتر) و نفتالین استیک اسید (۰، ۰/۵ و ۱ میلی گرم در لیتر) بود قرار گرفتند. نتایج نشان داد که محیط کشت شامل ۲ میلی گرم در لیتر بنزیل آدنین و ۰/۵ میلی گرم در لیتر نفتالین استیک اسید بیشترین میزان پرآوری به تعداد ۵ و بیش‌ترین طول به میزان ۴/۵ سانتی متر بدست آمد. اما تفاوت معنی داری از نظر تعداد شاخساره بین این محیط کشت و محیط کشت شامل ۲ میلی‌گرم در لیتر BA و ۱ میلی‌گرم NAA وجود نداشت. هم‌چنین بیش‌ترین ریشه زایی شاخساره‌ها در محیط کشت MS حاوی ۱و ۲ میلی گرم در لیتر NAA حاصل شد.

کلمات کلیدی: انار رقم میخوش، پرآوری، تکثیر درون شیشه ای، تنظیم کننده‌های رشد

مقدمه

انار یکی از مهم‌ترین درختان مناطق نیمه گرمسیر جهان است که متعلق به تیره انارسانان (Punicaceae) و جنس Punica (تنها جنس این تیره) بوده و دارای دو گونه *P.granatum* و *P.protopunica* است (Soukhak *et al.*, 2011). انار را می‌توان بوسیله بذر، پیوند، پاجوش، خوابانیدن شاخه و قلمه افزایش داد. روش افزایش با قلمه رایج است و بدون تردید استفاده از قلمه چوب سخت و نیمه سخت یکی از ارزان ترین و اسانترین روش افزایش انار است. ولی این روش خیلی کارآمد نیست، زیرا حدود ۱۲ ماه لازم است تا یک قلمه به صورت بهینه ریشه دار شود(Anon, 1999 and Naik *et al.*, 1999). امروزه بررسی‌هایی هم در ارتباط با استفاده از فن‌آوری کشت درون شیشه‌ای برای افزایش انار انجام شده است. در این راستا افزایش درون شیشه‌ای انار روش مطمئن با بازده بالا جهت افزایش ارقام مهم انار شناخته می شود. بنابر این هدف این پژوهش بررسی ریزازدیادی یکی از رقم های بسیار خوب انار به نام رقم میخوش است.

مواد و روش ها

ریزنمونه‌ها از شاخساره‌های جوان تهیه و جهت کشت بافت به آزمایشگاه انتقال یافتند. نخستین مرحله به منظور گندزدایی اولیه، آن‌ها را به مدت ۱۰ دقیقه زیر آب جاری قرار داده شدند. و برای گندزدایی تکمیلی در زیر دستگاه جریان هوا به مدت ۱۰ دقیقه در محلول هیپوکلریت سدیم تجاری به غلظت ۱۰ درصد و سپس سه مرتبه به مدت ۱۰ دقیقه با آب استریل شست و شو داده شد. در نهایت پس از حذف زائدات و تقسیم به قطعات حاوی یک گره به طول حداکثر یک سانتی متر در محیط کشت پرآوری آماده شده قرار گرفته و پس از بستن درب به اتاق رشد انتقال یافتند. محیط کشت‌های پرآوری مورد استفاده حاوی محیط کشت MS کامل به همراه BA با غلظت‌های ۱ و ۲ میلی گرم در لیتر NAA با غلظت‌های ۰، ۰/۵ و ۱ میلی گرم در لیتر تهیه شدکه پس از تنظیم pH در دمای ۱۲۱ درجه سانتی گراد و فشار ۱/۲ اتمسفر و به مدت ۱۵ دقیقه در اتوکلاو، گندزدایی شدند. سپس زیر دستگاه

جریان هوای لامینار جهت جامد شدن قرار گرفتند. پس از گذشت ۴ هفته شاخساره‌های پرآوری شده به اندازه بیش از ۳ میلی‌متر را بریده و جهت ریشه‌زایی به محیط کشت MS حاوی ۱، ۲ و ۳ میلی‌گرم در لیتر NAA انتقال یافتند. بعد از ۳۰ روز تعداد و طول ریشه‌ها در هر شاخساره مورد ارزیابی قرار گرفت. گیاهچه‌های ریشه دار شده را از محیط‌های کشت خارج و با آب مقطر ولرم شست و شو داده و در گلدان حاوی ترکیبی از پرلایت و کوکوپیت استریل شسته شده با نسبت ۱:۱ انتقال داده شد. در روزهای نخست آبیاری با محیط کشت یک سوم غلظت MS فاقد آگار انجام شد و به تدریج این غلظت کاهش یافت. در ضمن در همین مدت درپوش پلاستیکی جهت خو گرفتن به شرایط نیز به تدریج برداشته شد. برای مرحله پرآوری آزمایش در قالب طرح کاملا تصادفی انجام گرفت و برای ریشه زایی طرح کاملا تصادفی با ۶ غلظت اکسین (NAA و IBA) بکار برده شد. صفات مورد ارزیابی شامل تعداد شاخساره، طول و تعداد ریشه بود. داده‌ها با استفاده از نرم افزار SAS 9.1 آنالیز شدند. مقایسه میانگین با استفاده از آزمون چند دامنه ای جدید دانکن مورد بررسی قرار گرفتند. هم‌چنین از نرم افزار اکسل برای ثبت داده‌ها و رسم نمودارها استفاده شد.

نتایج و بحث

نتایج مقایسه میانگین نشان می دهد که رقم میخوش در محیط کشت MS حاوی ۲ میلی گرم در لیتر BA به همراه ۰/۵ و ۱ میلی گرم در لیتر NAA بیش‌ترین تعداد شاخساره را تولید کردند که با سایر تیمارها اختلاف معنی داری نشان داد (جدول۱). در پژوهش های مشابه توسط آل واسل(۱۹۹۱) در رابطه با افزایش درون شیشه‌ای همگروه انار ال-بلاهی و پارمار و کانمار (۲۰۱۳) افزایش درون شیشه‌ای انار رقم قندهاری-کابلی نشان دادند که استفاده از تنظیم کننده رشد BA با غلظت ۲ میلی گرم در لیتر بهترین میزان در پرآوری را به همراه داشت. به نظر می رسد تنظیم کنند رشد بنزیل آدنین نقش مهم در جهت گیری تاخته ای به سمت افزایش جوانه و در نهایت پرآوری دارد. افزودن سایتوکینین‌ها به محیط کشت برای پرآوری شاخساره ضروری است (Nike, 2011).

جدول ۱: اثر غلظت های مختلف تنظیم کننده‌های رشد بنزیل آدنین و اسید نفتالین استیک در تعداد شاخساره رقم میخوش

BA(mg/l)	NAA(mg/l)		
	۰	۰/۵	۱
۱	۲/۶۶c	۳/۳۳c	۳/۰۰c
۲	۴/۶۶b	۵/۶۶a	۵/۰۰ab

اعداد با حروف مشترک دارای اختلاف معنی داری در سطح ۵ درصد با هم نمی‌باشند

نتایج مقایسه میانگین طول شاخساره نشان می دهد که رقم میخوش در محیط کشت MS حاوی ۲ میلی گرم در لیتر BA به همراه ۰/۵ میلی گرم در لیتر NAA بیش‌ترین طول شاخساره بدست آمد که با سایر تیمارها اختلاف معنی داری نشان داد (جدول۲). استفاده از تنظیم کننده های رشد در کشت بافت انار اهمیت اساسی دارد. در این پژوهش مشاهده شد که غلظت بالای سیتوکینین‌ها نسبت به اکسین ها تاثیر مطلوبتری در پرآوری دارد. کانوار و همکاران (۲۰۱۰) گزارشی به منظور شناسایی ترکیب مطلوبی از تنظیم کننده‌های رشد برای باززایی انار اعلام نمودند. باقری (۱۳۸۱) نشان داد که سایتوکینین‌ها باعث تسریع تقسیم سلولی، تشکیل اندام هوایی و ریخت زایی می‌شوند. هم‌چنین سایتوکینین‌ها به منظور غلبه بر چیرگی انتهایی در جوانه‌های جانبی مورد استفاده قرار می‌گیرند. در مجموع به نظر می رسد نسبت بالای سایتوکینین‌ها به اکسین‌ها می‌تواند در پرآوری انار تاثیر بیشتری داشته باشد.

جدول ۲: اثر غلظت های مختلف تنظیم کننده‌های رشد بنزیل آدنین و اسید نفتالین استیک در طول شاخساره رقم میخوش

BA(mg/l)	NAA(mg/l)		
	۰	۰/۵	۱
۱	۱/۰۳e	۱/۳۶d	۱/۵۳d
۲	۲/۰۰c	۴/۱۰a	۳/۴b

اعداد با حروف مشترک دارای اختلاف معنی داری در سطح ۵ درصد با هم نمی‌باشند

نتایج نشان داد که شاخساره‌ها بهترین ریشه زایی را در محیط کشت MS حاوی ۱ و ۲ میلی گرم در لیتر NAA با تعداد ۳ به طول ۱/۴ سانتی‌متر داشتند. با این وجود با محیط کشت حاوی ۳ میلی گرم در لیتر NAA از نظر طول شاخساره تفاوت معنی داری وجود نداشت. اما با سایر تیمارها تفاوت معنی‌داری نشان داد (جدول۳). با توجه به این که در بسیاری از گزارش ها مشاهده شد که اسید نفتالین استیک و اسید ایندول بوتریک معمولی‌ترین اکسین‌های مورد استفاده برای القای ریشه زایی در شاخساره‌های باززایی شده درون شیشه‌ای انار هستند، گزارش این پژوهش نشان می دهد که اسید نفتالین استیک تاثیر بیشتری نسبت به اسید ایندول بوتریک در افزایش طول و تعداد ریشه داشت. به نظر می رسد در شرایط منطقه ای برای انار رقم میخوش ترکیب محیط کشت همرا با اسید نفتالین استیک تاثیر بیشتری داشته باشد.

جدول۳: اثر غلظت های مختلف تنظیم کننده‌های رشد اکسینی بر تعداد و طول ریشه رقم میخوش

تنظیم کننده‌های رشد	غلظت(mg/l)	تعداد ریشه	طول ریشه(cm)
NAA	۱	۳/۳۳a	۱/۴۶a
	۲	۳/۰۰a	۱/۳۳a
	۳	۲/۰۰b	۱/۲۰۰a
IBA	۱	۱/۶۶bc	۰/۵۰b
	۲	۱/۳۳bc	۰/۷۰b
	۳	۱/۰۰c	۰/۵۰b

اعداد با حروف مشترک در هر ستون دارای اختلاف معنی داری در سطح ۵ درصد با هم نمی‌باشند

منابع

۱. باقری، ه. و آزادی، پ. ۱۳۸۱. کشت بافت گیاهی، تکنیک‌ها و آزمایش‌ها. مشهد. انتشارات جهاد دانشگاهی.۲۷-۳۸

2. Al- Wasel, A.S.A. 1999. In vitro clonal propagation of Al- Belehi pomegranate (*punica granatum* L.). Agricultural. Sciences.11:3-14.
3. Anon, M. 1982. The wealth of india: A Dictionary of Indian Raw Materials and Industrial Products. 8:317-324
4. Kanwar. K., Joseph Deepika, R. 2010. Comparison of in vitro regeneration pathways in punica granatum L. Plant Cell Tissue and Organ Culture . 100:199-207
5. Naik, S.K., Pattnaik, S. and Chand, P.K. 1999. In vitro propagation of pomegranate (*Punicagranatum* L. cv. Ganesh) through axillary shoot proliferation from nodal segments of mature tree. *ScientiaHorticulturae* 79: 175–183.
6. Nike, S.K. and Chand, P.K. 2011. Tissue culture mediate biotechnological intervention in pomegranate: a interview. Plant Cell Reports. 30: 707-721
7. Parmar, N., Kanmar. K. 2013. Direct Organogenensis in *Punica granatum* L. cv. Kandhari Kabuli from Hypocotyl Explants. *The National Academy of Sciensis India*. 83(4): 569-574
8. Soukhak, F., Khalighi,A and Ghaemmaghami,S.A. 2011. Study of Direct Adventitious Shoot Regenaration in Pomegranate (*Punica granatum* cv .Malas Saveh) through Cotyledonary Explants. *International Journal of Agricultural Science and Research*. 2(3): 19-26

In vitro propagation of pomegrant cv. Meikhosh (*Punica granatum* L.)

F. moattari*[1], M. hedayat[2], S. rastgoo[2], M. modarresi[3]

1-M. Sc of Horticultural Science, Persian Gulf University Bushehr. 2- Assistant Professor, Dep. of Horticulture Science, Persian Gulf University Bushehr. 3- Assistant Professor, Dep. of Breeding Science, Persian Gulf University Bushehr.
*Corresponding author: farah.moattari@yahoo.com

Abstract
Pomegranate is an economically important fruit tree of the tropical and subtropical regions of the world that is cultivated for its delicious fruits. In additions the tree is also valued for its pharmestical properties and ornamental usage. In this investigation lateral bud of meikhosh pomegranate cultivars were placed on MS medium supplemented with various concentrations of BA and NAA for proliferation. The best concentration of BA and NAA was 2 mgl^{-1} and 0/5 mgl^{-1}resulting in the highest number shoot (5) and length(4/5cm) but there was not significant different in number of shoot between MS medium supplemented with BA (2 mgl^{-1})+ NAA(0/5 mgl^{-1}) and BA (2 mgl^{-1})+ NAA(1 mgl^{-1}) MS supplemented with 1 and 2 mgl-^{1} NAA was more effective for rooting of shoots.

Key word: Pomegranate cv meikhosh, proliferation, *In vitro* propagation, plant growth regulator