# اثر تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی بر پرآوری درون شیشه‌ای دو گونه تمشک بومی ایران

**نسرین صابونی[1*]، اختر شکافنده[2]**

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد علوم باغبانی، دانشگاه شیراز، شیراز. ۲- دانشیار گروه علوم باغبانی، دانشگاه شیراز، شیراز.

* نویسنده مسئول: n_sabooni@yahoo.com

## چکیده

در این پژوهش، پرآوری شاخساره از قطعه های گرهی تمشک پرخار و تمشک کم‌خار مورد بررسی قرار گرفت .ریزنمونه ها پس از گندزدایی سطحی روی محیط کشت MS محتوی غلظت‌های متفاوت BA و NAA قرار گرفت. در هردو گونه بدون توجه به تغییر میزانNAA، با افزایش میزانBA تعداد شاخه‌های بیشتری در هر جوانه ایجاد شد. بهترین تیمار پرآوری در هر دو گونه ۰/۵ میلی‌گرم برلیتر NAA و ۴ میلی‌گرم بر لیتر BA بدست آمد؛ که البته اختلاف معنی‌داری با ۰/۵ میلی‌گرم برلیترNAA به همراه ۲میلی‌گرم برلیترBA نداشت.

**کلمات کلیدی**: پرآوری ، قطعه‌های گره، کشت درون شیشه‌ای، تمشک.

## مقدمه

تمشک‌ها از میوه‌های‌ریز هستند که تنوع بسیار بالایی داشته و به اقلیم‌های متنوعی سازگارند. گیاهان میوه‌ریز در مقایسه با گونه‌های درختی از اندازه کوچکتری برخوردارند (جلیلی مرندی، ۱۳۸۶).

تمشک‌ها از گیاهان میوه‌دار خانواده *وردسانان* و جنس *تمشک* می‌باشند. (Gu *et al*., 1993). تمشک‌ها با عدد کروموزومی۷ = n و تنوع کروموزومی از ۱۴ = 2n تا ۸۴ = 12n دارای سه گونه مهم تمشک قرمز و تمشک‌سیاه، که هر دو دیپلوئید هستند و سیاه‌توت که تنوع کروموزوم‌های آن زیاد بوده و عدد کروموزومی از 2n تا 12n می‌باشد؛ جوانه گل آنها مرکب است و گل‌آذین گرزن (تمشک قرمز) یا خوشه‌ای نامحدود(تمشک سیاه) دارند (Crandall, 1995). در مطالعه‌ای توسط جعفری و حمیداوغلی (۲۰۰۹) بر روی سیاه توت بدون‌خار جهت ریزافزایی از جوانه‌های جانبی استفاده شد. جهت پرآوری از محیط کشت MS (۱۹۶۲) جامد با تیمار هورمونی BA بکار رفت که بهترین نتیجه با ۲میلی گرم بر لیتر حاصل شد؛ بیشترین تعداد شاخه با میانگین ۳/۳۳و بلندترین طول شاخه با میانگین ۵/۸۷سانتی‌متر توسط ۰/۵ میلی گرم در لیتر GA و ۲میلی گرم بر لیتر BA بدست آمد؛ بلندترین طول ریشه با میانگین ۷/۸۳ سانتی‌متر توسط ۲میلی گرم بر لیتر IBA حاصل شد. ریزافزایی از راه کشت بافت یک روش موثر برای تولید انبوه از رقم مطلوب و مورد نظر است که زودباردهی، یکنواختی و افزایش تولید در واحد سطح را به همراه دارد . افزون بر آن کشت بافت گیاهی نیاز به قرنطینه گیاه را از بین می برد که خود عاملی در صرفه جویی زمان است. بررسی عوامل مؤثربرکشت بافت به منظور افزایش سریع و ایجاد همگروه‌های یکسان دو گونه تمشک بومی ایران، به ویژه تعیین محیط کشت مناسب و نوع تنظیم کننده رشد مورد نیاز برای کشت درون شیشه‌ای این گیاه، هدف این پژوهش بود.

## مواد و روش‌ها

ژنوتیپ‌های مورد استفاده در این از دو گونه‌ی مختلف با نام‌های علمی *Rubus sanctus* (خاردار، ژنوتیپ یاسوج)، *Rubus hirtus* (کم‌خار، ژنوتیپ همدان) می باشند.

محیط کشت پایه بکار رفته در این پژوهش MS است. در این محیط کشت، انواع و غلظت‌های متفاوتی از تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی استفاده شد. در تهیه این محیط کشت، سوکروز به مقدار ۳۰ گرم در لیتر و آگار به میزان ۶/۵ گرم در لیتر به عنوان غلظت پایه مورد استفاده قرار گرفتند. پس از افزودن همه ترکیب‌های محیط کشت (به جز آگار) و رسانیدن به حجم مورد نظر با آب مقطر، pH محیط کشت در محدوده ۵/۸-۵/۷ تنظیم شد. سپس آگار اضافه گردید و ظرف‌های حاوی محیط کشت، به مدت ۱۵ دقیقه در اتوکلاوبا دمای ۱۲۱ درجه سلسیوس و فشار ۱/۵ اتمسفر سترون شدند. جهت گندزدایی ابتدا برگ و دمبرگ از روی ساقه‌ها برداشته شد و قطعات ساقه به همراه چند قطره از مویان (مایع ظرفشویی خانگی) به مدت ۲۰ دقیقه در زیر جریان آب جاری قرار گرفتند. سپس از قارچکش مانکوزب برای کنترل آلودگی قارچی با غلظت ۲ گرم بر لیتر به مدت زمان ۳۰ دقیقه استفاده شد. در مرحله سوم، نمونه‌ها در محلول ۵۰ میلی‌گرم بر لیتر سیتریک اسید +۱۰۰ میلی گرم در لیتر آسکوربیک اسید به مدت ۴۵ دقیقه قرار گرفتند. در پایان و پس از سه بار آبکشی،نمونه‌ها هرکدام بصورت جداگانه داخل پارچه تمیز ململ تا ۲۴ ساعت در یخچال (۴+°) نگهداری شدند. این دو مرحله آخر برای کنترل میزان ترشح مواد فنولی انجام گرفت. ادامه گند زدایی در زیر هود جریان هوای افقی بدین صورت انجام شد: قطعات ساقه به مدت ۳۰ ثانیه در اتانول ۷۰٪، در ادامه با هیپوکلریت سدیم ۱۰٪ به مدت ۲۰ دقیقه گندزدایی شد. پس از ۳ بار آبشویی، نمونه‌های گیاهی به صورت تک گره‌هایی با اندازه ۱-۱/۵ سانتی‌متر برش داده شدند و در محیط کشت حاوی تنظیم کننده‌های رشد گیاهی کشت شدند.

محیط پرآوری

شامل محیط MS به همراه تنظیم‌کننده رشد BA در غلظت‌های ۰، ۱، ۲ و ۴ میلی گرم بر لیتر به همراه NAA در غلظت‌های ۰و ۰/۵ میلی گرم بر لیتر بود. نمونه‌ها پس از انتقال به محیط کشت به مدت ۴۸ ساعت در شرایط تاریکی-جهت کنترل ترشح مواد فنولی- نگهداری شدند. پس از به شرایط نوری ۱۶ ساعت نور و ۸ ساعت تاریکی(نور سفید خنک با شدت ۳۵ تا ۴۰ میکرومول بر متر در ثانیه) و دمای ۱±۲۳ درجه منتقل شدند. پس از گذشت چهار هفته تعداد شاخه‌های ایجاد شده را بر هر جوانه یادداشت‌برداری شد.

آنالیز

این آزمایش در قالب طرح کاملا تصادفی با ۳ تکرار و در هر تکرار با ۵ ریزنمونه انجام خواهد شد. داده‌ها با نرم افزار SAS تجزیه شده و میانگین‌ها با استفاده از آزمون LSD در سطح ۵٪ مقایسه می‌شوند.

## نتیجه

تاثیر برهمکنش غلظت‌های مختلف BA (۰، ۱، ۲و ۴ میلی گرم بر لیتر) به همراه غلظت‌های مختلف NAA (۰و ۰/۵میلی‌گرم بر لیتر) بر شمار و ارتفاع شاخه مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان دادند که برهمکنش BA و NAA بر شمار شاخه در سطح ۵٪ معنی‌دار بود. کاربرد NAA همراه با BA شمار شاخه را در مقایسه با نبود NAA افزایش داد به صورتی که بالاترین میانگین شمار شاخه به میزان ۸/۹۸ شاخه در هر ریزنمونه در تیمار ۴ میلی‌گرم بر لیتر BA به همراه ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر NAA حاصل شد. کمترین شمار شاخه در محیط فاقد هر گونه تنظیم‌کننده رشد مشاهده شد؛ همچنین اختلاف میانگین گونه کم‌خار و پرخار در سطح ۵٪ معنی‌دار بود که بیشترین میزان شاخه‌زایی در گونه پرخار دیده شد.

شکل۱. الف و ب) پرآوری شاخه در محیط MS با ۴ میلی‌گرم برلیتر BA و ۰/۵میلی‌گرم برلیتر NAA. به ترتیب *R. hirtus* و *R. sanctus*

جدول۱- اثر تنظیم کننده های رشد بر تعداد شاخساره باززایی شده از قطعات گره تمشک در دو نژادگان.

| نژادگان | BA (میلی‌گرم بر لیتر) | NAA (میلی‌گرم بر لیتر) ۰ | NAA (میلی‌گرم بر لیتر) ۰/۵ | میانگین BA | میانگین نژادگان |
|---|---|---|---|---|---|
| پرخار | ۰ | ۱/۲۸†c-e | ۱/۴c-e | | |
| | ۱ | ۱/۵۳dc | ۱/۶c | ۱/۰۰C | |
| | ۲ | ۳/۴۲b | ۸/۶۲a | | |
| | ۴ | ۳/۵۷b | ۸/۹۸a | ۱/۲۰B | ۳/۸A |
| کم‌خار | ۰ | ۰/۶۳h | ۰/۷۲h | | |
| | ۱ | ۰/۹f-h | ۰/۷۸gh | ۴/۱۳A | |
| | ۲ | ۱/۲d-f | ۳/۳b | | ۱/۵۱B |
| | ۴ | ۱/۱e-g | ۳/۵۲b | ۴/۲۹A | |
| میانگین NAA | | ۱/۷۰B | ۳/۶۱A | | |

† میانگین‌های دارای حروف مشترک (حروف کوچک برهمکنش‌ها و حروف بزرگ اثرات اصلی)، در سطح ۵٪ آزمون LSD تفاوت معنی‌داری با هم ندارند.

## بحث

در کشت درون شیشه ای گیاهان چوبی با چند مشکل مواجه هستیم که موفقیت در ریزافزایی ودست‌ورزی فناوری زیستی آن ها را محدود می سازد .قهوه ای شدن که در پی آن مرگ ریزنمونه ها بر اثرتراوش ترکیبات فنولی در محیط صورت می‌گیرد، مشکل مهمی در کشت بافت گیاهان چوبی است .گزارش های مختلفی برای کنترل مواد فنولی و نجات ریزنمونه ها انجام شده است. در این پژوهش برای کنترل تراوش ماده فنولی از غوطه ور کردن ریزنمونه ها و بهم زدن آن ها در محلول دو آنتی اکسیدان اسکوربیک اسید و سیتریک اسید و نگهداری در یخچال در دمای پایین پیش از کشت، استفاده شد که روش کاملا مناسبی بود.

در همه آزمایش های انجام شده افزایش غلظت BA در محیط کشت موجب افزایش پرآوری شاخساره‌ها شد. رابطه BA و NAA بر طبق جدول معنی‌دار بود و بیشترین تعداد شاخه بر جوانه در رقم پرخار و با تیمار ۰/۵ میلی‌گرم برلیتر NAA و ۴ میلی‌گرم بر لیتربود که البته با تیمار ۰/۵ میلی‌گرم برلیترNAA به همراه ۲میلی‌گرم برلیتر BA اختلاف معنی‌داری نداشت. در رقم کم خار نیز بیشترین تعداد شاخه بر جوانه از تیمار NAA ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر به همراه ۴ و یا ۲ میلی‌گرم برلیتر BA حاصل شد.لازم به ذکر است اختلاف بین دو رقم نیز معنی‌دار بر طبق جدول تجزیه واریانس، معنی‌دار بود.

سیتوکینین‌ها برای تقسیم سلولی از اهمیت بالایی برخوردارند و همچنین برای تحریک شاخه‌زایی مستقیم یا غیر مستقیم ضروری می‌باشند. پیشنهاد میشود برای غلبه بر چیرگی انتهایی و تحریک به رشد جوانه‌های جانبی از سیتوکینین‌ها استفاده شود( Donnelly *et al.*,1980).

بابروسکی و همکاران (۱۹۹۶) بیان نمود با میزان ۱ یا ۲ میلی‌گرم برلیتر BA میتوان به شاخه‌زایی در تمشک رسید. همچنین وی و همکاران (۱۹۹۲) بیان نمود با کاهش میزان BA از ۲ به ۱ میلی‌گرم برلیتر آغازیدن جوانه‌زنی چوانه‌های کناری صورت نمی‌گیرد نیز با افزایش میزان ۲ به ۴ میلی‌گرم بر لیترجوانه‌زنی جوانه‌های کناری کاهش می‌یابد.

ویلا و همکاران (۲۰۰۵) بهترین محیط برای پرآوری تمشک را محیط WPM به همراه ۱ میلی‌گرم بر لیتر BA گزارش نمود.

**منابع**


۱. جلیلی مرندی، ر. ۱۳۸۶. میوه‌های ریز. انتشارات جهاد دانشگاهی ارومیه. ۲۹۷ صفحه.

2. Bobrowski, V. L., Mello, F. P., & Petters, J. 1996. Micropropagation of blackberries (*Rubus sp.*) cultivars. *Current Agricultural Science and Technology, 2*(1), 17-20.
3. Crandall, P. 1995. Bramble production. The management and marketing of raspberries and blackberries: Food Products Press.
4. Donnelly, D..J, Stace-Smith, R.& Mellor, F.C. 1980. In vitro culture of three *rubus* species. *Acta Hort* 112: 69 76.
5. Gu, Y., Zhao, C., Jin, W., & Li, W. 1993. Evaluation of rubus germplasm resources in China. *Acta Horticulturae*(352), 317-324.
6. Jafari, N. A., & Hamidoghli, Y. 2009. Micropropagation of thornless trailing blackberry (*Rubus* sp.) by axillary bud explants. *Australian Journal of Crop Science, 3*(4), 191-194.
7. James, D.J., Knight, V.H.& Thurbon, I.J. 1980. Micropropagation of Red Raspberry and the influence of phloroglucinol. *Scientia Horticulturae* 12: 313-319.
8. Lloyd, G. & McCown, B. 1980. Commercially-feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot-tip culture. *Intern. Plant Prop. Soc. Proc*. 30:421-427 (Publ 1981).
9. Murashige, T., & Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum, 15*(3), 473-497.
10. Villa, F., Araujo, A.G., Salles Pio, L.A.& Pasqual, M. 2005. *In vitro* multiplication of blackberry (*Rubus* sp.) Ebano in different MS medium concentrations and BAP. Ciênc agrotec, Lavras 29(3): 582-589.


## Effect of plant growth regulator on *in vitro* proliferation of two species of native raspberry


**Nasrin Sabooni [1*]. Akhtar Shekafande[2]**

1-M. SC. of Science Horticulture, shiraz university, shiraz. 2- Associate Professor, Dep. Scinece Horticulture, shiraz university, shiraz.
*corresponding author: n_sabooni@yahoo.com



**Abstract**

In this study, shoot proliferation of nodal segments Porkhar raspberries and blackberries Kamkhar were studied. After surface disinfection, explants on MS medium with different concentrations of BA and NAA were planted. In both species, regardless of changes in NAA, BA has increased the number of branches in the bud was more. The proliferation of treatment in both 5.0 mg/l NAA and 4 mg/l BA was, of course, significant differences between the 5.0 mg and 2 mg /l NAA was BA.



**Key word**: Prolifration, nod, *in vitro* culture, Raspberry.