# اثر محیط کشت و تنظیم‌کننده‌های رشد بر پرآوری و ریشه‌زایی پایه رویشی JASPI

**رامین شفیعی الموتی*[۱]، ناصر بوذری[۲]**
[۱]* کارشناس ارشد بیوتکنولوژی
[۲] استادیار، موسسه تحقیقات علوم و باغبانی
*نویسنده مسئول: ramiinshafieii@gmail.com

**چکیده**

**تحقیق حاضر به‌منظور شناسایی بهترین محیط کشت و تنظیم کننده‌های رشد در پرآوری و ریشه‌زایی شاخساره‌های پایه JASPI در شرایط کشت درون شیشه انجام شد. شاخه‌های حاصل از محیط کشت موراشیک و اسکوک (MS) بدون هورمون، به محیط کشت MS و MS ½ با غلظت مختلف هورمون BAP (۰، ۰/۵، ۱ و ۱/۵) و IBA (۰، ۰/۱، ۰/۲) به‌منظور پرآوری و دو محیط کشت پایه استاندارد MS و WPM حاوی ترکیب هورمونی (۰ ، ۰/۵ ، ۱ و ۱/۵ ) در لیتر IBA و NAA به‌منظور ریشه‌زایی منتقل شدند. نتایج نشان داد بیشترین تعداد شاخساره (۴/۲۵) در محیط کشت MS حاوی ۱ میلی‌گرم در لیتر BA به‌علاوه ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر IBA و ارتفاع بلندترین شاخساره (۲/۶۷ سانتیمتر) در محیط کشت MS حاوی ۱ میلی‌گرم در لیتر BA به همراه ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر IBA مشاهده شد. بیشترین تعداد ریشه در ریزنمونه‌ها (۹/۷۵) در محیط کشت WPM حاوی ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر IBA و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA بدست آمد. به‌منظور سازگاری نمونه‌های سازگار شده از محیط حاوی کوکوپیت و پرلیت (۲ : ۱ حجمی) استفاده شد که در نهایت گیاهچه‌های سالم، شاداب و با رشد مطلوب تولید شدند.**

***کلمات کلیدی:*** **کشت بافت، BAP، IBA و NAA**

## مقدمه

یکی از مسائل حائز اهمیت در احداث باغات جدید استفاده از پایه‌های رویشی پاکوتاه می‌باشد. لذا کلیه عوامل مؤثر بر آن بایستی مدنظر قرار گرفته شود. از آنجا که یکی از مشکلات عمده باغات در ایران، بالا بودن هزینه‌های برداشت به دلیل ارتفاع بسیار بلند درختان در سن باردهی است. بنابراین برای دستیابی به درختان کم ارتفاع و یکدست، بایستی از پایه‌های رویشی پاکوتاه و نیمه پاکوتاه کننده استفاده شود(Davies, 2010). پایه JASPI از تلاقی (*P.spinosa* × *P.salisina*) است و یک پایه کلونال است. این پایه از لحاظ پاکوتاه بودن بسیار قابل توجه است. دارای سایز میوه بزرگ و وزن میوه بالای می‌باشد. با وجود مقاومت در برابر بیماری‌ها، نسبت به باکتری کنسر[۱] بسیار حساس است (Robert et al, 2006). این پایه سازگار با چند گونه است، سازگاری آن با هلو محدود است و در مقایسه با آن برای زردآلو و آلو مناسب‌تر است و ارقام هلو نسبت به JASPI بسیار مستعد ابتلا به شانکر باکتریایی هستند(Reighard et al, 2006).

در ریزازدیادی گیاهان به محیط‌های کشت، پاسخ‌های متفاوت می‌دهند که بایستی برای هر گونه و هر رقم خاص بهینه‌سازی نوع محیط کشت انجام شود. عوامل متعددی بر موفقیت ریزازدیادی گونه‌های چوبی تاثیرگذارند، اثر نوع ریز نمونه، نوع گونه، نوع محیط کشت و نسبت‌های تنظیم‌کننده رشد در باززایی درخت‌های میوه ثابت شده است. پرآوری شاخساره در محیط کشت بیشتر تحت تأثیر هورمون‌های گروه سیتوکنین می‌باشد. سیتوکنین‌ها سلول‌های گیاهی را برای تقسیم شدن تحریک می‌کنند و افزودن این ترکیبات به محیط کشت، موجب غلبه بر غالبیت انتهایی ساقه و فعال کردن جوانه‌های جانبی می‌شود و نیز موجب افزایش تعداد شاخه‌های کوتاه شده که قابل انتقال به محیط ریشه‌زایی نمی‌باشند، می‌شود(Ruzic et al, 2008). مهم‌ترین ترکیب‌های ریشه‌زایی اکسینی ایندول بوتیریک اسید[۲] و نفتالین استیک اسید[۳]

[1] Canker
[2] IBA

می‌باشند که القای ریشه‌زایی توسط این دو هورمون برای بسیاری از گونه‌های جنس Prunus انجام شده است (Pruski, 2007).

## مواد و روش‌ها

نمونه‌های آزمایش از شاخه‌های یک‌ساله پایه JASPI در گلخانه موسسه علوم و باغبانی تهیه شد. سپس با مایع ظرفشویی و آب مقطر شستشو داده شدند و به قطعاتی در اندازه‌های کوچک ۱۰ میلی‌متر به‌طوری‌که در هر قطعه یک جوانه وجود داشت تقسیم گردیدند و پس از آن در شرایط کاملاً استریل با هیپوکلریت سدیم ۵۰٪ به مدت ۱۵ دقیقه ضدعفونی شدند. ریزنمونه‌ها پس از تیمار ۳ بار با آب مقطر استریل شستشو شدند و دو انتهای سفید شده نمونه با تیغ برش داده شد و در شیشه‌های مربایی حاوی محیط کشت بدون تنظیم کننده رشد قرار داده شدند. PH محیط برای تمام مراحل کشت ۵/۷ بود و برای استریل محیط، از اتوکلاو به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد استفاده شد.

پرآوری: محیط کشت پایه استاندارد MS و ½ MS با نصف غلظت عناصر ماکرو و میکرو که هر کدام حاوی ۴ غلظت هورمونی ۰ ، ۰/۵ ، ۱ و ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP به همراه IBA با غلظت ۰ ، ۰/۱ و ۰/۲ استفاده شد و القای رشد در جوانه‌های جانبی و تشکیل شاخه‌های جدید مورد بررسی قرار گرفت و برای ارزیابی مرحله پرآوری، تعداد شاخساره‌های تولیدی در هر تکرار شمارش و سپس نرخ تکثیر که حاصل تعداد شاخساره تولید شده به ازاء شاخساره کشت شده بود برآورد شد.

ریشه‌زایی: شاخساره‌های تکثیر شده با اندازه ۴ سانتیمتر به محیط کشت MS و WPM که هر کدام حاوی ۴ غلظت هورمونی ۰ ، ۰/۵ ، ۱ و ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر IBA و NAA بود مورد بررسی قرار گرفتند و پس از گذشت ۴ هفته از کشت صفات درصد ریشه‌زایی، تعداد ریشه و طول ریشه در هر ریزنمونه ثبت گردید.

## نتایج

بر اساس نتایج تجزیه واریانس داده‌ها مشخص گردید که اثر ساده نوع محیط کشت بر تعداد شاخساره و ارتفاع بلندترین شاخساره تولید شده در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار شد درحالی‌که بر صفات تعداد برگ و میانگین ارتفاع شاخه‌های ایجاد شده معنی‌دار نشد. اثر ساده غلظت‌های مختلف BA بر روی تعداد شاخساره، تعداد برگ و ارتفاع بلندترین شاخساره تولید شده در سطح احتمال یک درصد و بر میانگین ارتفاع شاخساره‌های ایجاد شده در سطح احتمال ۵ درصد معنی‌دار گردید. اثر ساده غلظت‌های مختلف IBA بر روی صفات تعداد برگ، ارتفاع بلندترین شاخساره تولید شده و میانگین ارتفاع شاخساره‌ها در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بود. درحالی‌که بر روی تعداد شاخساره تکثیر شده معنی‌دار نشد. بر اساس نتایج اثرات متقابل نوع محیط کشت، BA و IBA بر روی صفات تعداد شاخساره و میانگین ارتفاع شاخساره‌ها در سطح احتمال ۵ درصد و برای صفات تعداد برگ و ارتفاع بلندترین شاخساره تولید شده در سطح احتمال یک درصد در پایه رویشی JASPI معنی‌دار گردید.

[3] NAA

جدول ۱- اثر نوع محیط کشت، BA و IBA بر روی صفات تعداد شاخساره، تعداد برگ، ارتفاع بلندترین شاخه و میانگین ارتفاع شاخه‌ها در مرحله پرآوری پایه رویشی JASPI

| منبع تغییرات | درجه آزادی | میانگین مربعات | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | تعداد شاخه | تعداد برگ | ارتفاع بلندترین شاخه cm | میانگین ارتفاع بلندترین شاخه cm |
| محیط کشت (A) | ۱ | ۲/۸* | ۲۱/۱ ns | ۰/۸۷* | ۰/۳۳ ns |
| (B) BA | ۳ | ۶/۹** | ۱۹۳/۵۶** | ۰/۷** | ۰/۳۵* |
| (C) IBA | ۲ | ۰/۵۶ns | ۸۲/۸۸** | ۳/۱۶** | ۱/۳۵** |
| A x B | ۳ | ۱/۳۷* | ۲۹/۰۳ ns | ۰/۱۵ns | ۰/۰۲ ns |
| A x C | ۲ | ۲/۹** | ۹۲/۳۷** | ۱/۶** | ۰/۲۸* |
| B x C | ۶ | ۱/۶۳** | ۴۳/۳۴* | ۰/۵۴** | ۰/۰۸ ns |
| B x CxA | ۶ | ۱/۱۷* | ۶۲/۲۹** | ۰/۵۷** | ۰/۲* |
| خطا | ۷۲ | ۰/۴۸ | ۱۵/۶۵ | ۰/۱۶ | ۰/۱ |
| ضریب تغییرات | | ۱۹/۴ | ۱۳/۷۳ | ۱۱/۰۷ | ۲۰/۸ |

**و ns به ترتیب نشان دهنده معنی‌دار بودن در سطح احتمال ۱٪ و غیر معنی‌دار

بیشترین تعداد شاخساره (۴/۲۵ عدد) تکثیر شده در محیط کشت MS حاوی ۱ میلی‌گرم در لیتر BA به‌علاوه ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر IBA و بیشترین تعداد برگ (۲۳/۵عدد) تولید شده در محیط کشت MS حاوی ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر BA به‌علاوه ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر IBA و بیشترین ارتفاع بلندترین شاخساره (۲/۶۷ سانتیمتر) و همچنین بیشترین میانگین ارتفاع شاخساره (۲/۳۲ سانتیمتر) در محیط کشت MS حاوی ۱ میلی‌گرم در لیتر BA به‌علاوه ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر IBA بدست آمد.

بر اساس نتایج مشاهده شد که اثرات ساده نوع محیط کشت بر درصد ریشه‌زایی در سطح احتمال ۵ درصد و بر تعداد ریشه در سطح احتمال یک درصد و غلظت‌های مختلف IBA و NAA بر تعداد ریشه در سطح احتمال یک درصد و همچنین اثرات متقابل IBA و محیط کشت بر درصد ریشه و تعداد ریشه در سطح احتمال ۵ درصد، اثرات متقابل NAA و محیط کشت بر درصد ریشه‌زایی در سطح احتمال ۵ درصد و بر تعداد ریشه در سطح احتمال یک درصد، اثر متقابل هورمون‌های NAA و IBA بر تعداد ریشه در سطح احتمال ۵ درصد و اثرات سه فاکتور مذکور بر صفات مورد بررسی در سطح احتمال یک درصد بر درصد ریشه‌زایی و تعداد ریشه معنی‌دار گردید.

جدول ۲- اثر نوع محیط کشت،IBA و NAA بر روی صفات درصد ریشه‌زایی، تعداد ریشه،طول بلندترین ریشه و میانگین طول ریشه ها در مرحله ریشه‌زایی پایه رویشی JASPI

| منبع تغییرات | درجه آزادی | میانگین مربعات | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | درصد ریشه‌زایی | تعداد ریشه | طول بلندترین ریشهcm | میانگین طول ریشه‌هاcm |
| محیط کشت (A) | ۱ | ۱۹۵۸/۴۲* | ۰/۵۲** | ۰/۶۷$^{ns}$ | ۰/۱$^{ns}$ |
| (B) IBA | ۳ | ۸۱۸۵/۷۴** | ۳/۱۶** | ۵/۳۱$^{ns}$ | ۳/۳۳$^{ns}$ |
| (C) NAA | ۲ | ۲۴۳/۰۵$^{ns}$ | ۰/۹۳ * | ۰/۲۹$^{ns}$ | ۰/۲۳$^{ns}$ |
| A x B | ۲ | ۱۷۰۱/۴* | ۱/۸۵ * | ۲/۶۳$^{ns}$ | ۱/۴۵$^{ns}$ |
| A x C | ۲ | ۲۴۳/۰۵* | ۲/۳ ** | ۰/۱$^{ns}$ | ۰/۰۳$^{ns}$ |
| B x C | ۲ | ۱۹۲/۵$^{ns}$ | ۱/۲ * | ۰/۲۴$^{ns}$ | ۰/۱۲$^{ns}$ |
| B x CxA | ۸ | ۱۲۸۴/۷۲** | ۰/۷۴ ** | ۰/۶$^{ns}$ | ۰/۴۸$^{ns}$ |
| خطا | ۵۷ | ۳۶۱/۸۴ | ۰/۶۳ | ۰/۳۴ | ۰/۲۵ |
| ضریب تغییرات | | ۲۱/۹۶ | ۱۳/۳ | ۱۴/۴۲ | ۱۱/۳۷ |

**و ns به ترتیب نشان دهنده معنی‌دار بودن در سطح احتمال ۱٪ و غیر معنی‌دار

بیشترین درصد ریشه‌زایی در محیط کشت MS حاوی ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر IBA و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA، MS حاوی ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر IBA و ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA، MS حاوی ۱ میلی‌گرم در لیتر IBA و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA، MS حاوی ۱ میلی‌گرم در لیتر NAA و MS حاوی ۱ میلی‌گرم در لیتر IBA و ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA و همچنین محیط کشت WPM حاوی ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر IBA و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA بدست آمد. همچنین بیشترین تعداد ریشه در ریزنمونه‌ها (۹/۷۵) در محیط کشت WPM حاوی ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر IBA و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA مشاهده شد.

در مرحله سازگاری گیاهچه‌های که از محیط کشت WPM منتقل گردیدند با داشتن ریشه‌های با کیفیت‌تر پاسخ بهتری به شرایط سازگاری نسبت به گیاهچه‌های انتقالی از محیط کشت MS دادند. گیاهچه‌ها در مرحله انتقال در گلدان پلاستیکی کوچک به همراه بستر ضدعفونی شده کوکوپیت و پرلیت سازگاری موفقی داشتند.

**بحث**

نوع و غلظت تنظیم کننده رشد و عناصر کم‌مصرف و پرمصرف در پرآوری نقش مهمی را در تکثیر گیاهان چوبی در شرایط کشت درون شیشه‌ای دارا می‌باشد(Andreu and Marín, 2005). در اکثر گزارش‌ها BA برای پرآوری گیاهچه پایه‌های جنس Prunus مناسب تشخیص داده شده است. در بررسی تکثیر درون شیشه‌ای Gesilla 5 محیط مناسب MS گزارش شده، در محیط MS جذب فسفر و نیتروژن بیشتر توسط شاخساره‌ها افزایش پرآوری و کیفیت بهتر آن‌ها را به دنبال دارد (Ruzik, 2008). در این پژوهش در غلظت ۱ میلی‌گرم در لیتر BA به همراه IBA ۰/۲ میلی گرم تعداد شاخساره تولید شده افزایش یافت و بالاترین تعداد شاخساره به دست آمد و پرآوری مطلوبی را نشان داد. و نیز بیشترین تعداد شاخه و ارتفاع بلندترین شاخه در BA ۱ میلی‌گرم و IBA ۰/۲ میلی‌گرم و محیط MS بود. و با افزایش بیش از حد BA به کاهش پرآوری منجر شد و مشخص گردید که غلظت‌های مختلف BAP به میزان قابل توجهی درصد شاخه‌زایی را تحت تأثیر قرار داد. کمالی و همکاران (۲۰۰۶) گزارش کردند که در کشت درون شیشه‌ای GF677 ، که استفاده بیش از ۱ میلی‌گرم در لیترBA باعث افزایش میزان پرآوری شد، ولی شیشه‌ای شدن را به دنبال داشت. درحالی‌که مغایر با نتایج کمالی و همکاران نتایج پژوهش حاضر مشخص کرد که در غلظت‌های ۱ و ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP بیشترین میزان پرآوری شاخه بدون شیشه‌ای شدن بدست آمد.

در بحث ریشه‌زایی القای ریشه‌زایی توسط هورمون‌های IBA و NAA برای بسیاری از گونه‌های جنس *Prunus* انجام شده است (Pruski, 2007 ). Edris و همکاران (2014) در مرحله ریشه‌زایی دو پایه رویشی هلو، اثر دو اکسین

NAA و IBA در غلظت‌های ( ۲ ، ۱ و ۰ میلی‌گرم در لیتر ) به‌تنهایی و در ترکیب با یکدیگر بررسی کردند و بیشترین تعداد ریشه و طول ریشه را در محیط کشت MS حاوی ۱ میلی‌گرم در لیتر IBA و ۱ میلی‌گرم در لیتر NAA گزارش کردند. در کشت درون شیشه‌ای ارقام مختلف زرد آلوی مجارستانی در مرحله ریشه‌زایی از غلظت‌های مختلف IBA و NAA استفاده شد و بیان گردید که ریشه‌زایی همه ارقام با موفقیت بیش از ۹۰ درصد انجام شدند( Vertesy, 1981). با افزایش غلظت اکسین در محیط کشت توانایی ریزنمونه‌ها برای تولید ریشه افزایش می‌یابد مطابق با پژوهش حاضر George (2008) تأیید کرد افزایش غلظت اکسین تا حدودی باعث افزایش درصد ریشه‌زایی می‌شود و بیش از آن نه‌تنها تأثیری در تولید و تعداد ریشه نخواهد شد بلکه واکنش‌های منفی خواهد داشت.

## منابع

**Andreu, P., Marín, J. A. 2005.** *In vitro* culture establishment and multiplication of the Prunus rootstock 'Adesoto 101'(*P. insititia* L.) as affected by the type of propagation of the donor plant and by the culture medium composition. Scientia Horticulturae, 106(2): 258-267.

**Davies, P. J. 2010.** The plant hormones: their nature, occurrence, and functions. In Plant hormones (pp. 1-15). Springer Netherlands.

**Edriss, M. H., Baghdadi, G. A., Abd, E. R., Abdel-Aziz, H. F. 2014.** Micropropagation of Some Peach Rootstocks. *Nat. Sci*., *12*: 106-114.

**George, E. F., Hall, A., DeKlerk, G. J. 2008.** Plant growth regulators II: cytokinins, their analogues and antagonists. In Plant propagation by tissue culture . Springer Netherlands. pp: 205-226.

**Kamali, K., Majidi, E., and Zarghami, R. 2006.** Micropropagation of GF677 rootstocks (Prunus amygdalus × P. persica). Plant Genetics and Breeding 56: 175- 177.

**Pruski, K. 2007.** Tissue culture propagation of Mongolian cherry (*Prunus fruticosa* L) and Nanking cherry (*Prunus tomentosa* L.). In Protocols for Micropropagation of Woody Trees and. Springer Netherlands. Fruits. Pp: 391-407

**Reighard, G. L., Ouellette, D. R., Brock, K. H. 2006.** Growth and survival of 20 peach rootstocks and selections in South Carolina. *Acta horticulturae*.

**Robert, A,. Jay, F. and Terence, R. 2006.** Plum Rootstock Trials at Geneva: A Progress Report. Department of Horticultural Sciences, NYSAES, Cornell University, Geneva, NY

**Ružić, D., V., Vujović, I. 2008.** The effects of cytokinin types and their concentration on in vitro multiplication of sweet cherry cv. Lapins (*Prunus avium* L.). Horticultural Science. 35(1): 12-21.

**Vertesy, J. 1981.** *In vitro* propagation of *Prunus persica* and *Prunus persicodavidiana* shoot tip in order to get virus free plants. Acta Horticulture. 94: 261-266.