اثر تنظیم‌کننده‌های رشد بر ریزازدیادی پایه پنتا (*Prunus domestica*)

زیبا بالاپور*[۱]، حسین حسینی مقدم[۲]، مهدی زارعی[۲]، مهدی ملاشاهی[۲]
[۱]*دانشجوی کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشگاه گنبدکاووس
[۲]استادیار و عضو هیئت‌علمی دانشگاه گنبدکاووس
*نویسنده مسئول: z.balapoor70@yahoo.com

چکیده

پنتا با نام علمی (*Prunus domestica*) از خانواده *گل‌سرخیان* (Rosaceae) و سرده Prunus که یکی از پایه‌های درخت آلو می‌باشد. با توجه به مشکلات ناشی از کاربرد پایه‌های بذری و غیر یکنواخت در باغ‌های درختان میوه هسته‌دار، استفاده از پایه‌های یکنواخت و سازگار با این درختان الزامی است. به‌منظور تعیین بهترین محیط کشت، ریزنمونه‌های جوانه‌های انتهایی و جوانه‌های جانبی پایه پنتا (*Prunus domestica*) در اوایل بهار تهیه شدند. پس از استقرار و سازگاری ریزنمونه‌ها در شرایط کشت بافت دو محیط کشت مختلف (MS وWPM) که حاوی سه مقدار مختلف هورمون‌های ایندول بوتیریک اسید IBA (۰/۴، ۱/۳ و۲ میلی‌گرم در لیتر) و همچنین بنزیل آمینو پیورین BAP (۰/۳، ۱ و ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر) بودند، کشت شدند. بعد از چهار هفته تعداد شاخه‌ها ، طول شاخه‌ها تعداد ریشه‌ها، طول ریشه‌ها و تعداد برگ‌های هر نمونه شمارش گردید. این پژوهش به صورت آزمایش فاکتوریل در قالب طرح پایه کاملاً تصادفی با ۵ تکرار و ۳ ریزنمونه در هر تکرار به اجرا درآمد. نتایج نشان داد که در محیط کشت MS و تیمار ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP بیش‌ترین شاخه‌زایی، در ۰/۴ و ۲ میلی گرم در لیتر IBA به ترتیب بیشترین ریشه‌زایی و تعداد برگ بدست آمد که با دیگر تیمارها اختلاف معنادار داشت.

***کلمات کلیدی:* جوانه‌های جانبی، درون شیشه‌ای، محیط کشت، ایندول بوتیریک اسید و بنزیل آمینو پورین**

مقدمه

پنتا با نام علمی (*Prunus domestica*) از خانواده گل‌سرخیان (Rosaceae) و سرده Prunus که یکی از پایه‌های درخت آلو می‌باشد. ازدیاد آلو، بیش‌تر به طریق پیوند روی پایه بذری و تا حدودی به‌وسیله (قلمه زدن) و (خوابانیدن) انجام می‌گیرد. ازآنجایی‌که در تکثیر پایه رویشی پنتا از طریق بذر تفرق صفات ایجاد می‌شود و باغ حاصله از این پایه‌های بذری یکنواخت نخواهد بود، ضرورت دارد که تکثیر درون شیشه‌ای (کشت‌بافت) یعنی ازدیاد مستمر گیاهان در هر مقطع زمانی از سال و بدون توجه به فصل انجام شود. وقاری‌آذر و همکاران (۱۳۸۸) طی تحقیقی استقرار و پرآوری در کشت درون شیشه‌ای دو پایه هیبرید آلو وزرد آلو را مورد بررسی قرار دادند نتایج نشان داد بیش‌ترین تعداد شاخه تشکیل شده و میانگین طول شاخه‌ها در غلظت ۴ میلی‌گرم در لیتر بنزیل آمینو پیورین (BAP) به‌دست آمده است. یعنی با افزایش مقدار بنزیل آمینو پیورین تعداد برگ‌ها، طول بزرگ‌ترین برگ و شاخص کیفیت آن‌ها افزایش یافت. محیط کشت می‌تواند در رشد درون شیشه ای گیاهان بسیار مؤثر باشد (Pilar and Marin, 2005). تحقیق انجام‌شده توسط آندریو و مارین (۲۰۰۵) نشان داد، که ترکیب محیط کشت روی میزان پرآوری و ازدیاد پایه‌های هسته‌دارها تأثیر دارد، به‌طوری‌که پس از انجام ۹ بازکشت در QL (Quoirin and Lepoivre1977) در مقایسه با محیط کشت MS و WPM به‌طور معنی‌داری کاهش یافت. در کشت درون شیشه‌ای، ترکیب محیط کشت روی رشد گیاهچه مؤثر است و این تأثیر در اثر ترکیب نمک‌های موجود در محیط کشت ایجاد می‌شود (Ruzic *et al.*, 2003). به گزارش پرز و همکاران (۲۰۰۰) در کشت درون شیشه‌ای چندین رقم زردآلو، بهترین نتایج در محیط QL و عناصر ماکروی WPM تغییر یافته حاصل شد. اثر محیط‌های کشت پایه مختلف و غلظت سیتوکنین روی افزونگری زردآلوی کانینو (Canino) بررسی شد. شاخساره سالم‌تر و سبزتر روی محیط کشت WPM تغییر یافته ایجاد شدند (Perezm et al., 2006).به نظر می‌رسد با تغییر غلظت عناصر در محیط‌های کشت، نتایج بهتری حاصل می‌شود تاکنون، توجه

زیادی به پایه‌های رویشی در باغ‌های درختان میوه هسته‌دار نشده است و بیش‌تر این درختان روی پایه‌های بذری استقرار یافته‌اند. باتوجه به ضرورت ایجاد تنوع در پایه‌های موجود قابل استفاده برای احداث باغ‌های درختان میوه هسته‌دار، در این تحقیق تأثیر محیط کشت و هورمون‌های گیاهی برای دستیابی به محیط کشت مناسب برای ریزازدیادی پایه پنتا که برای احداث باغ‌های یکنواخت درختان میوه هسته‌دار مناسب است، بررسی و مطالعه شد.

مواد و روش‌ها

این پژوهش در آزمایشگاه کشت بافت دانشگاه کشاورزی گنبدکاووس صورت پذیرفت. این تحقیق در قالب یک طرح فاکتوریل بر پایه کاملاً تصادفی (فاکتور اول: نوع محیط کشت و فاکتور دوم: غلظت‌های مختلف هورمونی) با ۵ تکرار و ۳ ریزنمونه در هر تکرار اجرا شد. برای تهیه ریزنمونه (جوانه انتهایی و جانبی) از شاخه‌های جوان و در حال رشد درختان مادری در اوایل بهار استفاده گردید. پس از برداشت، نمونه‌های گیاهی به‌وسیله فلاسک یخ به محل مورد آزمایش انتقال یافتند. جهت انجام این تحقیق، پیش سترون‌سازی ریز نمونه‌ها با استفاده از آب و مایع ظرفشویی (دی ترژن) انجام شد. برای ضدعفونی از کلرید جیوه ۰/۰۳ درصد استفاده شد. برای اطمینان از حصول ضدعفونی، سه مرتبه به‌وسیله آب مقطر استریل شستشو شدند. قبل از واکشت تمامی محیط کشت، در دمای ۱۲۱ درجه سلسیوس به مدت ۲۰دقیقه استریل شدند. سپس ریزنمونه‌ها در محیط کشت‌های MS (موراشیگ و اسکوگ، ۱۹۶۲) و WPM با ۳۰ گرم در لیتر ساکارز و ۷ گرم در لیتر آگار کشت شدند و به اتاق رشد با شرایط دمای ۲۵ درجه سلسیوس در روز و ۲۰ درجه سلسیوس در شب، با دوره نوری۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی، با شدت نور ۲۷۰۰لوکس انتقال یافتند. بعد از ۲۰روز بهترین محیط کشت تعیین شد سپس ریزنمونه‌ها برای تعیین بهترین ترکیب هورمونی در غلظت‌های متفاوت هورمونی (IBA و BAP) کشت شدند. از غلظت‌های مختلف IBA: ۲، ۱/۳و۰/۴ میلی‌گرم در لیتر و غلظت‌های مختلف BAP: ۱/۵، ۱ و ۰/۳ میلی‌گرم در لیتر استفاده شد. بعد از چهار هفته میزان شاخه‌زایی و ریشه‌زایی ریزنمونه‌ها بررسی گردید. در پایان آنالیزها با استفاده از نرم‌افزار JMP انجام شد.

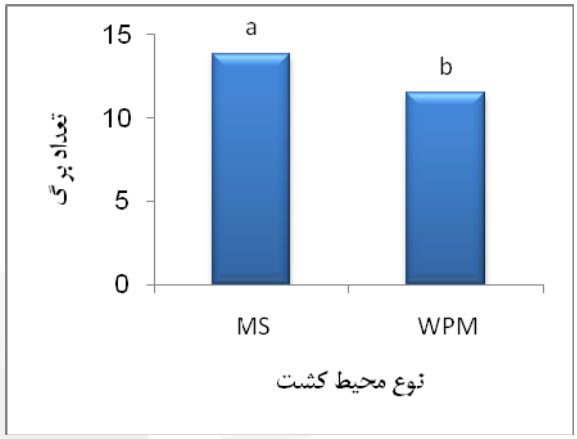
شکل ۱- ریزنمونه‌های کشت شده در اتاقک رشد

نتایج و بحث

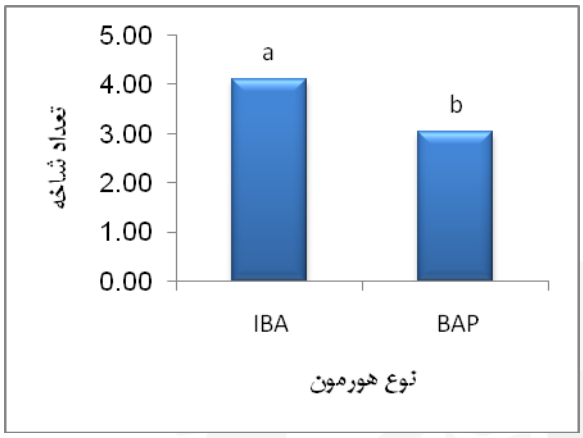
پاسخ مورفوژنیک درون شیشه‌ای ریزنمونه‌های کشت شده تحت تأثیر اجزای مختلف محیط کشت، از جمله غلظت و نوع تنظیم‌کننده رشد، قرار می‌گیرد (Gamburg and Semenova, 1977). بر اساس نتایج به‌دست آمده نوع محیط کشت‌های MSو WPM فقط بر روی صفت تعداد برگ معنی‌دار بود و در محیط کشت MS بیش‌ترین تعداد برگ بدست آمد (شکل ۲). در پژوهش (Ambrozic *et al.*, 1992) آلوی Bistrica که به‌عنوان پایه برای زردآلو به‌کار می‌رود، به‌صورت درون شیشه‌ای ازدیاد شد و بیش‌ترین پرآوری شاخساره روی محیط کشت MS با ۰/۲۵ میلی‌گرم در لیتر BAP و ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر IBA حاصل شد. در این تحقیق بیش‌ترین تعداد برگ در محیط کشت MS با ۲ میلی‌گرم در لیتر IBA به دست آمد. همچنین نوع محیط کشت بر شاخه‌زایی معنی‌دار نبود و بیش‌ترین شاخه‌زایی در غلظت ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP به دست آمد.

به گزارش رگالسکی و همکاران (۲۰۰۳) بیش‌ترین پرآوری آلوی سانتارزا در محیط حاوی ۲ میلی‌گرم BAP و بیش‌ترین ارتفاع شاخساره در محیط دارای ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP حاصل شد. در تکثیر سریع گیلاس وحشی (Dorkovic, 2006)، غلظت بنزیل آمینو پورین به مقدار زیادی بر درصد شاخه‌زایی مؤثر بود، به‌طوری‌که ترکیبی از ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر تیدیازرون و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر بنزیل آمینو پورین سبب افزایش شاخه‌زایی شد که مطابق نتایج این تحقیق نمی‌باشد. پژوهش‌ها نشانگر این است که ریشه‌دهی پایه GF677 در شرایط درون شیشه‌ای به نوع محیط کشت بستگی دارد (Kamali *et al.*, 2006).

در این تحقیق نوع هورمون فقط بر روی صفت تعداد شاخه معنی‌دار بود و به‌طوری‌که در هورمون IBA بیش‌ترین شاخه‌زایی بدست آمد (شکل ۲). در این تحقیق بهترین محیط کشت MS با تیمار هورمونی ۱/۵میلی‌گرم در لیتر IBA بدست آمد.



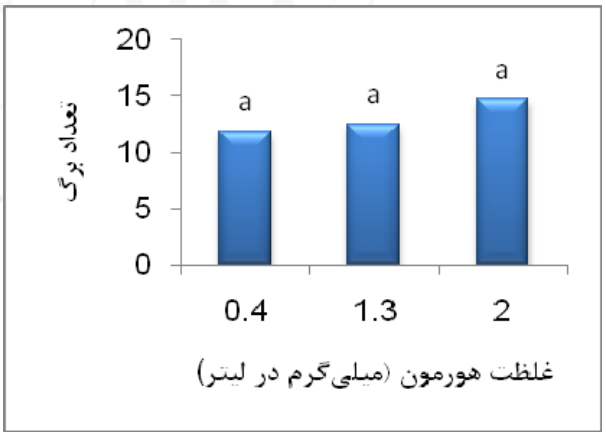
شکل۲- تأثیر نوع محیط کشت بر متوسط تعداد برگ



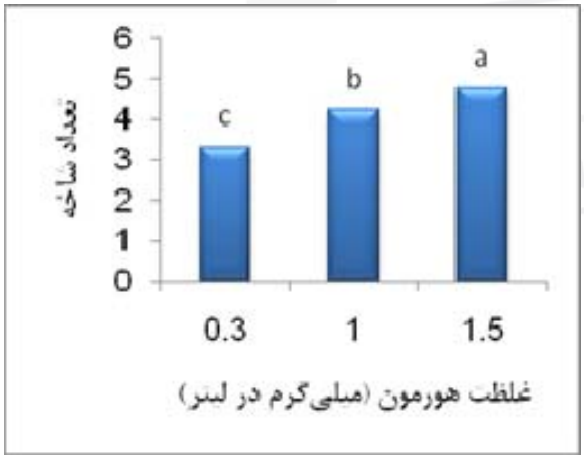
شکل۳- تأثیر نوع هورمون بر شاخه‌زایی

با افزایش غلظت BAP، تعداد شاخساره تولید شده از هر ریز نمونه در محیط کشت WPM افزایش یافت، به‌طوری‌که بالاترین میانگین تعداد شاخساره در غلظت دو میلی‌گرم در لیتر BAP در محیط WPM بدست آمد، ولی طول شاخساره‌ها به‌شدت کاهش یافت. در این تحقیق نوع محیط کشت بر روی شاخه‌زایی تأثیر چندانی نداشت . بررسی ریزازدیادی زردآلوی رقم کانینو نشان داد که با افزایش غلظت BAP، شدت پرآوری بسیار بالا و طول شاخساره‌ها حداقل بود (Perez-Tornero et al., 2000). در ریزازدیادی پایه رویشی گزیلا ۶ محیط کشت MS و غلظت یک میلی‌گرم در لیتر BAP برای پرآوری و محیط کشت MS به همراه یک میلی‌گرم در لیتر IBA برای ریشه‌زایی، بهترین نتایج را داشت (Daneshvar Hossini et al., 2010).

نتایج آزمایشات این تحقیق نشان داد که در غلظت ۲ میلی‌گرم در لیتر IBA بیش‌ترین تعداد برگ بدست آمده است (شکل ۳). همچنین در این تحقیق بیش‌ترین شاخه‌زایی با استفاده از هورمون ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP بدست آمد (شکل ۴).



شکل ۴- تأثیر هورمون IBA بر صفت تعداد برگ



شکل ۵- تأثیر هورمون BAP بر شاخه‌زایی

به‌طورکلی نتایج حاصل از داده‌ها نشان داد که محیط کشت MS بهترین محیط برای تکثیر پایه پنتا می‌باشد. که می‌تواند به دلیل وجود مقادیر بالای نیتروژن (نیترات آمونیوم) در ترکیب آن باشد. گیاهچه‌ها در محیط MS شاداب‌تر، دارای رشد طبیعی‌تر و بیش‌تری نسبت به گیاهچه‌های رشد یافته در محیط کشت WPM بودند. به‌طورکلی می‌توان گفت ریزنمونه‌ها در نمک MS از رشد کیفی مطلوب‌تر و نرمال‌تری برخوردار بودند. در مقابل گیاهچه‌هایی که در نمک WPM رشد یافته بودند رشد ضعیفی داشتند. همچنین برای شاخه‌زایی تیمار هورمونی ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP و برای ریشه‌زایی تیمار هورمونی ۰/۴ میلی‌گرم در لیتر IBA مناسب می‌باشد. با توجه به نتایج بدست آمده به نظر می‌رسد، پایه پنتا توانایی ازدیاد از طریق کشت بافت را دارد بهترین محیط کشت برای پرآوری ، محیط کشت MS می‌باشد.

شکل ۶-گیاهچه‌های ریشه‌دارشده با هورمون ۰/۴ میلی‌گرم در لیتر IBA

در این بررسی، به‌طورکلی گیاهچه‌هایی که در محیط MS با غلظت ۰/۴ میلی‌گرم در لیتر ریشه‌دار شدند، کیفیت بهتری داشتند و در مقابل تنش ناشی از تغییر شرایط محیطی در مرحله انتقال سازگاری بیشتری نشان دادند.

شکل ۷- گیاهچه پایه پنتا پس از انتقال به گلدان

منابع

Andreu, P., and Marin, 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: 258-267.

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

Dorkovic J. 2006. Rapid micropropagation of maturawild cherry *(Prunus avium* L.). Biologia Plantarum. 50(4): 733-736.

Daneshvar Hossini A., Ganji Moghadam E. and Anahid S. 2010. Effects of Media Cultures and Plant Growth Regulators in Micro Propagation of Gisela 6 Rootstock. Annals of Biological Research. 1(2):135-141.

Perez-Tornero O., Egea J., Vanoostende A. and Burgos L. 2000. Assessment of factors affecting adventitious shoot regeneration from in vitro cultured leaves of apricot. Plant Science. 158: 61-70.

Perez, O., Burgos, L., and Burgos, T. 2000. Different media requirements for micropropagation of apricot cultivars. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 63: 133-141.

Perezm, T. O., Lopez, J. M., Egea, L., and Burgos, L. 2000. Effect of basal media and growth regulators on the in vitro propagation of apricot (*Prunus armenica* L.) cv. Canino. The Journal of Horticultural Science and Biotechnology 75: 283-286.

Pilar, A., and Marin, 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: 258-267.

Rogalski, M., Moraes, L. K., Felisbino, C., Crestani, L., Guerra, M. P., and Silva, A. L. 2003. Acclimatization of micropropagated Prunus sp. rootstock. Revista Brasileira de Fruticultura 25 (2): 279-281.

Ruzic, D., Saric, M., Cerovic, R., and Culafic, L. 2003. Contents of macro elements and growth of sweet cherry rootstock in vitro. Biology of Plants 47: 463-465.

Gamburg, K.Z. and L.A. Semenova. 1977. Clonal propagation, flowering and fruiting of tomato in vitro. Acta Hort. 447: 147-148.

Vaghari Azar, E., Majidi Hervan, E., Vathanpour Azgandi, A. and Dejampour, J. 2010. Establishment and Proliferation of Two Apricot × Plum Hybrid Rootstocks for In Vitro Culture .seed and plant production journal 2-25(4):352-465.

The Effect of Different Growth Regulators on Micro Propagation of Penta Rootstock (*Prunus domestica*)

Ziba balapour[1]*, Hossein Hosseini Moghaddam[2], Mehdi Zarei[2], Mehdi Mollashahi[2]
[1]MSc. student of Biotechnology, Gonbad Kavous University, Gonbad Kavous, Iran
[2]Assistant professor, Gonbad Kavous University, Gonbad Kavous, Iran
*Corresponding Author: z.balapoor70@yahoo.com

Abstract

Penta rootstock *(Prunus domestica)* is from Rosaceae family which is one of the plum rootstock. According to difficulties caused by seedling rootstocks and causing heterogeneous orchard trees, using genetically unique and compatible rootstocks are obligated to have homogenous orchard. In order to find the best culture medium and also growth regulator supplement, the explants of shoot tip and auxiliary buds of Penta (*Prunus domestica*), collected at the beginning of spring. After establishment and adaptation the explants under in vitro condition, two culture media (WPM and MS) supplemented with four different level of indole-3-butyric acid (IBA) and as well as 6-benzylaminopurine (BAP) were tested. The shoots and the amount of leaves produced were recorded after four weeks. The most shoots produced in MS medium supplemented with 1/5 mg/l BAP which showed significant differences with other experiments. This experiment was designed as factorial in the form of completely random plan with 5 replication and 3 sample in each replication.

Keywords: **auxiliary buds, in vitro, IBA, BAP, Medium**