بهینه‌سازی محیط کشت دو رقم تجاری زردآلو به وسیله‌ی کشت تک گره

مونا سلیمانی[*۱]، رضا ضرغامی[*۲]، حسن حسنی کومله[۲]، سید باقر محمودی[۳]، مسعود نادرپور[۳]، رحیم قره شیخ بیات[۳]

[۱] دانشجوی کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی کشاورزی، گروه بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه گیلان، گیلان

[*۲] استادیار، بخش کشت بافت و سلول، پژوهشگاه بیوتکنولوژی کشاورزی ایران، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج وزارت جهاد کشاورزی، کرج

[۲] استادیار، گروه بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه گیلان، گیلان

[۳] دانشیار، معاونت توسعه‌ی مدیریت و منابع انسانی، تهران

[۳]استادیار، معاونت تحقیقات و فناوری بذر و نهال، موسسه تحقیقات ثبت و گواهی بذر و نهال، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج

[۳] استادیار، عضو هیئت علمی پژوهشکده میوه‌های معتدله و سردسیری، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج

[*] نویسندگان مسئول: m_soleimani@msc.guilan.ac.ir ; zarghami@abrii.ac.ir (این نویسندگان سهم مساوی در تحقیق حاضر داشتند)

چکیده

در این پژوهش، بهینه‌سازی ریزازدیادی دو رقم تجاری زردآلو (شاهرودی و نصیری) و بررسی اثر محیط-های کشت مختلف به همراه تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی مورد بررسی قرار گرفت. ریزنمونه‌ها در محیط کشت QL حاوی یک میلی‌گرم در لیتر GA3, ۰,۰۱ میلی‌گرم در لیتر IBA, ۵ غلظت متفاوت از BAP به همراه ۳۰ گرم در لیتر ساکارز، ۵ گرم در لیتر آگار با pH ۵,۸ جهت بهینه‌سازی قرار گرفتند. طی هر واکشت درصد آلودگی و زنده‌مانی اندازه‌گیری شد. نتایج نشان داد درصد زنده‌مانی در فصل تابستان بطور قابل ملاحظه‌ای بالاتر از فصل پاییز و بهار بود که این موضوع رابطه‌ی عکس با افزایش درصد آلودگی در فصل پاییز داشت. در مرحله‌ی پرآوری این آزمایش، تأثیر شش محیط کشت مختلف (MS, QL, WPM, DKW, M1, M2) حاوی غلظت‌های یکسان تنظیم‌کننده‌های رشدی (1mg/L GA_3, 0.01 mg/L IBA) و BAP در پنج سطح صفر، ۰,۲۵، ۰,۵، ۱ و ۲ میلی-گرم بر لیتر بر روی شاخص‌های رشدی از جمله ارتفاع شاخه‌های جانبی، تعداد شاخه‌های جانبی و تعداد برگ ۶ هفته پس از کشت ارزیابی شد. نتایج نشان داد بیشترین میزان پرآوری در بین محیط‌های آزمایش در هر دو رقم برای اکثر شاخص‌های رشد مربوط به محیط کشت QL می‌باشد. در رقم شاهرودی، بیشترین شاخه‌زایی (بطور میانگین ۳,۴ شاخه در محیط QL) و کمترین شاخه‌زایی در محیط DKW با میانگین ۱ شاخه و همچنین بیشترین رشد طولی در ارقام شاهرودی و نصیری (۷,۴ و ۷,۱) نیز در محیط QL حاصل شد. این پژوهش بصورت آزمایش فاکتوریل در قالب طرح پایه‌ی کاملاً تصادفی با ۶ تکرار ، دو رقم و ۵ تیمار مختلف در هر تکرار به اجرا درآمد.

کلمات کلیدی: پرآوری، تنظیم‌کننده‌های رشد، زردآلو، ساقه‌زایی، سایتوکنین.

مقدمه

زردآلو با نام علمی *Prunus armeniaca* متعلق به مراکز شرقی (چین، سیبری) ، پیش از میلاد مسیح می-باشد و از آنجا به ارمنستان برده شده است. از زمان‌های قدیم، غذاها، رسوم و سنت‌های ارمنستانی تحت تأثیر

IrHC2019

وجود زردآلو در این منطقه بوده است (Faustm *et al.*, 1998). زردآلو به عنوان دومین گونه‌ی مهم در میوه‌های هسته‌دار بعد از هلو است. بیش از نصف تولید جهانی زردآلو در نواحی مدیترانه متمرکز شده است و ایران پس از ترکیه دومین تولید کننده‌ی اصلی زردآلو است.

اطلاعات آماری FAO در سال ۲۰۱۷ نشان می‌دهد که ایران از لحاظ سطح زیر کشت، دارای مقام دوم پس از ترکیه است ولی به لحاظ عملکرد در هکتار، استرالیا مقام اول، ترکیه یازدهمین کشور و ایران به عنوان بیستمین کشور در سطح پایینی قرار دارد. تولید جهانی زردآلو در سال ۲۰۱۷ به میزان ۴،۲۵۷،۱۴۱ تن بوده که نسبت به سال ۲۰۱۶، به میزان ۹/۷ درصد افزایش داشته است.

اطلاعات مربوط به تکثیر درون شیشه‌ای زردآلو در مقایسه با سایر گونه‌های پرونوس محدود است. اولین گزارش‌های منتشر شده در مورد ریزازدیادی زردآلو به اواخر دهه‌ی ۱۹۷۰ برمی‌گردد (Skirvin *et al.*, 1979). ژنوتیپ نقش بسزایی در بهینه‌سازی پرآوری و موفقیت در ریزازدیادی زردآلو دارد .

گزارش‌های موجود درباره‌ی ریزازدیادی زردآلو همگی به سختی کار در فازهای مختلف شامل: سخت ریشه‌زایی، عدم تولید جوانه‌های جانبی کافی و تنوع محیط کشت وابسته به رقم اشاره دارند. تجمع برخی گازها در محیط چون CO_2 ،در نتیجه‌ی تنفس گیاه نیز با اثر بر رشد شاخساره‌ها و باززایی به این مشکلات دامن می‌زند (Marino and Noferini, 2013). به همین علت جهت بهینه‌سازی محیط کشت نیاز به سنجش محیط‌های مختلف برای هر رقم ضروری می‌نماید.

بنزیل آدنوپورن به عنوان تأثیرگذارترین سیتوکینین برای پرآوری شاخه‌های زردآلو توسط چندین پژوهشگر توصیه شده است (Murai *et al.*, 1997; Perez-Tornero *et al.*, 2000). غلظت بهینه‌ی BA در محیط کشت بستگی زیادی به واریته دارد. حمد سلیمان در سال ۲۰۱۲ تأثیر ۵ نوع محیط پایه (QL، B5، WPM، MS و ½ MS) همراه با تنظیم‌کننده‌های رشدی را بر تکثیر درون شیشه‌ای زردآلو واریته‌ی ایل- هماوی (El-Hamawey) بررسی کردند که بیشترین میزان بقا در محیط WPM غنی شده با یک میلی‌گرم در لیتر زآتین و ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر IAA در حضور ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر اسکوربیک اسید و ۱۵۰ میلی‌گرم در لیتر اسید سیتریک به دست آمد.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی

نمونه‌های اولیه‌ی مورد استفاده در این پژوهش شامل سرشاخه از سه درخت از هر یک از ارقام شاهرودی و نصیری (در طی سه فصل رشد) بهار، تابستان و پاییز از مرکز تحقیقات کشاورزی کرج بصورت تصادفی تهیه شده و پس از برچسب‌گذاری به آزمایشگاه کشت بافت در پژوهشگاه بیوتکنولوژی کشاورزی ایران منتقل شدند. آنالیز داده‌ها بوسیله نرم‌افزار SPSS انجام گردید. مقایسه میانگین داده‌ها نیز توسط آزمون دانکن در سطح احتمال یک درصد و پنج درصد صورت گرفت.

بهینه‌سازی مرحله‌ی استقرار

در این مطالعه ابتدا به منظور استقرار اولیه، شاخه‌های ۷ تا ۱۰ سانتی‌متری از سر شاخه‌های ارقام شاهرودی و نصیری به‌صورت تصادفی در سه فصل رشد انتخاب شد و به آزمایشگاه کشت بافت انتقال یافتند. ریز نمونه‌ها با

IrHC2019

استفاده از ضدعفونی کننده‌های عمومی کشت بافت، استریل شده و درون محیط استقرار کشت می‌شوند. نمونه‌ها به مدت دو ماه در دمای اتاق، شدت نور ۵۰۰۰ لوکس و فتوپریود ۱۶ساعت نگهداری شد تا شاخه‌زایی مناسب رخ دهد (Hu, Dong *et al.*, 2015). بهتر است جهت پیش‌گیری از زرد شدن، واکشت‌ها حداکثر ۳۰ روزه انجام شود(Marino and Noferini, 2013) .. نمونه‌های گیاهی تهیه شده به ارتفاع تقریبی ۱/۵ الی ۲ سانتی‌متر با دو گره جهت استقرار در محیط کشت اولیه، ابتدا با الکل ۷۰٪ به مدت ۱ دقیقه و سپس با نانوسیلور ۲/۵٪ به مدت ۱۰ دقیقه و در انتها با هیپوکلریت سدیم ۲/۵ درصد (حاوی ۲۰۰ میکرولیتر توئین ۲۰ در یک لیتر) به‌مدت ۱۰ الی ۱۵ دقیقه بسته به نوع ریزنمونه و سپس با آب جاری طی سه مرحله (۳، ۵ و ۱۰ دقیقه) شستشو داده شدند. پس از ضدعفونی سطحی در محیط کشت QL دارای ($1 mg/L GA_3$, 0.01 mg/L IBA, 0.5 mg/L BAP, 30 gr Sucrose, , 5 g/L Agar, pH= 5.8) در اتاقک‌های رشد با متوسط دمای ۲۲ درجه‌ی سانتی‌گراد و فتوپریود ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی قرار گرفتند. درصد زنده‌مانی و درصد آلودگی‌های قارچی و باکتریایی پس از چهار هفته مورد ارزیابی قرار گرفتند. ریزنمونه‌ها پس از طی ۶ هفته به محیط‌های پرآوری انتقال یافتند.

بهینه‌سازی مرحله‌ی پرآوری

در این مرحله از آزمایش اثر محیط‌های کشت متفاوت MS ، DKW ، WPM، QL، M1 و M2 در پنج غلظت صفر، ۰/۲۵، ۰/۵، ۱ و ۲ میلی‌گرم بر لیتر BAP بر پرآوری دو رقم زردآلوی شاهرودی و نصیری در محیط یکسان حاوی $1mg/L GA_3$, 0.01 mg/L IBA, 30 g/L Sucrose, 5 g/L Agar, برای هر یک از دو رقم مذکور با هدف تعیین مطلوب‌ترین محیط کشت مورد ارزیابی قرار گرفت. pH تمامی محیط‌ها نیز قبل از اتوکلاو و استریل سازی در 5.8 تنظیم گردید. این آزمایش بصورت فاکتوریل و در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۵ تکرار برای هر رقم انجام گردید. طرح شامل دو کولتیوار (شاهرودی و نصیری)، ۶ محیط کشت مختلف و ۵ سطح تیمار بود. طی این آزمایش در هفته‌ی ششم رشد، شاخص های رشدی از جمله تعداد شاخه‌های جانبی، طول شاخه‌ی اصلی، ارتفاع کل شاخساره‌ها، تعداد برگ گیاهچه‌ها یادداشت‌برداری شد «شکل ۱». مقایسه میانگین داده‌ها بوسیله‌ی آزمون دانکن در سطح احتمال یک و پنج درصد صورت گرفت.

ساقه‌زایی

شاخه‌های تکثیر یافته‌ی ارقام شاهرودی و نصیری با طول ۳ تا ۴ سانتی‌متر و تعداد ۳ برگ به مدت ۴ هفته در محیط QL پایه حاوی هورمون های رشدی GA_3 با یک سطح (۱ میلی‌گرم در لیتر) و IBA نیز در یک سطح (۰/۲ میکرومولار) 30 g/L Sucrose, 100 mg PG, 7 g/L Agar, جهت ساقه‌زایی قرار گرفتند « شکل ۲».

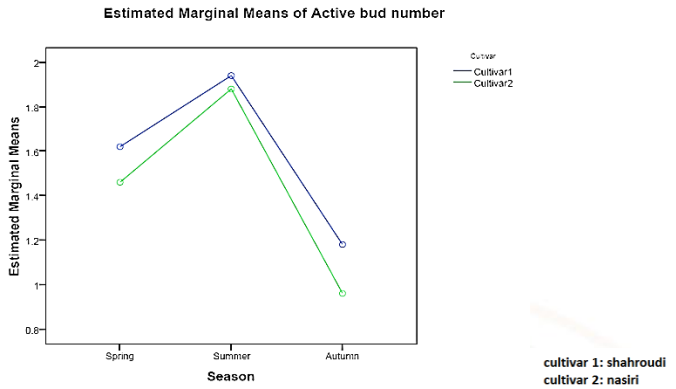
نتایج و بحث

بهینه‌سازی مرحله استقرار

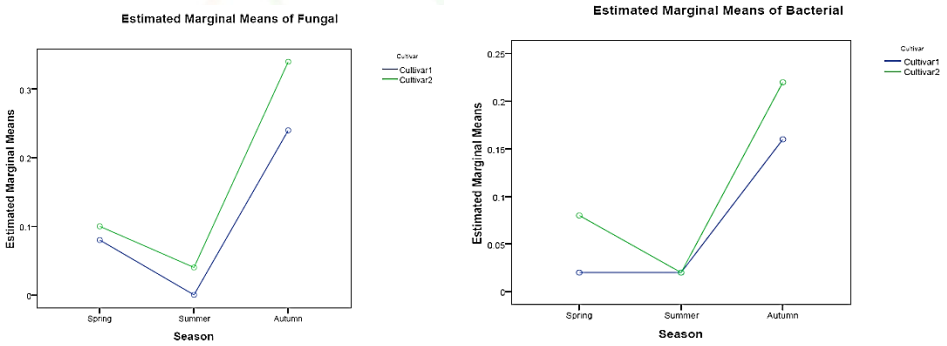
نتایج بررسی تاثیر زمان نمونه‌برداری نشان داد که در هر دو رقم درصد آلودگی به طور معنی‌داری در فصل پاییز بیشتر از فصل تابستان و بهار بود، درصد زنده‌مانی نیز در فصل تابستان بطور قابل ملاحظه‌ای بالاتر از فصل

IrHC2019

پاییز بود که این موضوع رابطه عکس با افزایش درصد آلودگی در فصل پاییز داشت « نمودار ۱ و ۲». همسو با پژوهش حاضر بر اساس تحقیقی که توسط Shakya و همکاران در سال ۲۰۱۳ انجام پذیرفت دلایل بسیاری همچون: تأثیر پارامترهای خاک، عوامل زیست محیطی، فنوتیپ میزبان، ژنوتیپ گیاه میزبان، فصل و محیط جغرافیایی نمونه برداری بر میزان آلودگی‌های باکتریایی و قارچی برشمردند.



نمودار «۱» تأثیر فصول مختلف رشد بر تعداد گره‌های فعال در دو رقم مورد مطالعه



ب الف

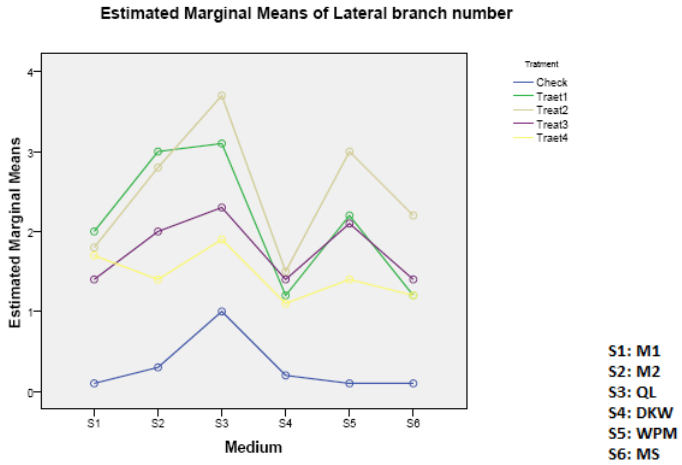
نمودار «۲» الف: تأثیر فصول مختلف رشد بر میزان آلودگی باکتریایی در دو رقم مورد مطالعه

ب: تأثیر فصول مختلف رشد بر میزان آلودگی قارچی در دو رقم مورد مطالعه

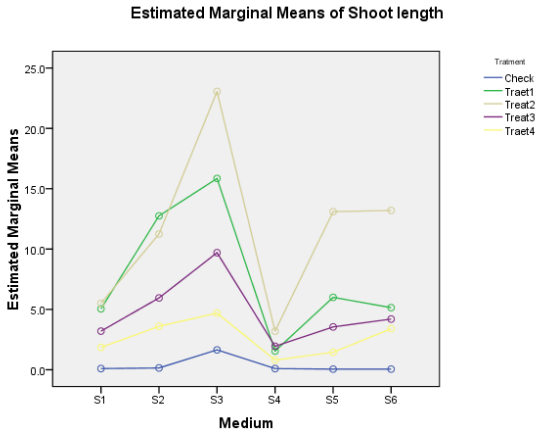
بهینه‌سازی مرحله‌ی پرآوری

در این پژوهش، بیشترین میزان پرآوری برای اکثر شاخص‌های رشد در هر دو رقم، در محیط کشت QL حاصل شد. بر اساس نتایج بدست آمده در رقم شاهرودی اثر محیط کشت QL در تمامی فاکتورهای اندازه‌گیری شده، تعداد شاخه‌های جانبی (بطور میانگین ۳,۴ شاخه)، طول شاخه (در حدود ۷,۴) و تعداد برگ (۳۱,۶) قابل توجه بود که البته بطور معنی‌داری بالاتر از تیمارهای دیگر بود. در رقم نصیری نیز محیط بهینه QL در فاکتورهای تعداد شاخه جانبی، ارتفاع و تعداد برگ با اختلاف کمی بالاتر از سایر محیط‌ها تعیین شد« نمودار ۳ و ۴» که این نتیجه با نتایج آزمایشات Gago و همکاران در سال ۲۰۱۱ مطابقت داشت.

IrHC2019



نمودار «۳» نمودار اثر متقابل محیط کشت و تیمار بر تعداد شاخه‌های جانبی



نمودار «۴۱» نمودار اثر متقابل محیط کشت و تیمار بر افزایش طول شاخه‌ها (بر حسب سانتی‌متر)

شکل «۱» پرآوری رقم زردآلوی شاهرودی

IrHC2019

شکل «۲» افزایش طول شاخه در رقم شاهرودی

منابع

Faust, M., Suranyi, D., and Nyujto, F. (1998). Origin and dissemination of apricot. Horticultural Reviews, Westport Then New York, 22: 225-260.

Gago, J., Pérez-Tornero, O., Landín, M., Burgos, L. and Gallego, P.P., 2011. Improving knowledge of plant tissue culture and media formulation by neurofuzzy logic: a practical case of data mining using apricot databases. Journal of plant physiology, 168(15): pp.1858-1865.

Hu, G., et al. 2015. Virus elimination from in vitro apple by thermotherapy combined with chemotherapy. Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC) 121(2): 435-443.

Marino, G. and M. Noferini 2013. Effect of the type of closure for culture bottles on micropropagation efficiency of apricot. Scientia Horticulturae 161: 306-313.

Murai, Y., Harada, H. and Yamashita, H., 1997. In vitro propagation of apricot (*Prunus armeniaca* L.) cv.'Bakuoh junkyou'. Journal of the Japanese Society for Horticultural Science, 66(3-4): 475-480.

Perez-Tornero, O., Lopez, J.M., Egea, J. 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(3): 283-286.

Skirvin, R.M., Chu, M.C. and Rukan, H., 1979. Tissue culture of peach, sweet and sour cherry and apricot shoot tips. In Proc. 124th Ann. Meeting Illi. State Horticultural Society (pp. 30-38).

Zamanipour, M., et al. 2015. Meristem culture of two sweet cherry cultivars cvs." Bing" and" Dovomras". International Journal of Biosciences (IJB) 6(5): 179-185.

IrHC2019

Optimization of culture media of two apricot cultivars by single-node cultivation

Mona Soleimani *[1], Reza Zarghami *[2], Hasan Hasani Kumle[2], Seyed Bagher Mahmoudi[3], Masoud Naderpour[3], Rahim Ghare Sheykh Bayat[3]

[1*]MSc student of Agricultural Biotechnology, Department of Biotechnology, Faculty of Agriculture, Guilan University, Guilan

[2*]Assistant Professor, Department of Tissue and Cell Culture, Iranian Agricultural Biotechnology Research Institute, Research, Education and Promotion Center, Ministry of Agriculture, Karaj, Iran

[2]Assistant Professor, Department of Biotechnology, Faculty of Agriculture, Guilan University, Guilan

[3]Associate Professor, Dean of Management Development and Human Resources, Tehran

[3]Assistant Professor, Seed and Plant Certification Research Institute, Research, Education and Promotion Center, Ministry of Agriculture, Karaj, Iran

[3]Assistant Professor, Member of the scientific board of the Center for Temperate and Cold Fruit Research, Research, Education and Promotion Center, Ministry of Agriculture, Karaj, Iran

* Corresponding authors: m_soleimani@msc.guilan.ac.ir; zarghami@abrii.ac.ir (These authors contributed equally to this research)

Abstract

In this research, the microscopic optimization of two cultivars of apricot (Shahroudi and Nasiri) and the effects of different culture media and plant growth regulators were investigated. Exposed explants in QL culture medium containing 1 mg/L GA3, 0.01 mg/L IBA, 5 concentration different from BAP with 30 g/L sucrose, 5 g/L agar with pH 5.8 to optimize they. Percentage of contamination and viability were measured during each incubation. The results showed that the percentage of live weight in spring was significantly higher than that of autumn, which was correlated with the increase in the percentage of contamination in autumn. In this experiment, the effects of six different culture media (MS, QL, WPM, DKW, M1, M2) containing the same concentrations of growth regulators (1mg/L GA3, 0.01 mg/L IBA and BAP at five levels of 0, 0.25, 0.5, 1 and 2 mg/L were evaluated on growth indices such as height of lateral branches, number of lateral branches and number of leaves in 6 weeks after planting. The results showed that the highest percentage Experimental media in both cultivars were in QL medium for most growth indices. In Shahroudi cultivar, the highest branching (average 3.4 branches in QL environment) and the lowest branching in DKW medium with mean 1 branch and also the most longitudinal growth in Shahroudi and Nasiri (7.4 and 7.1), in the QL was obtained. This factorial experiment in a completely randomized design with six replications and 5 treatments in each replications.

Keywords: cytokines, growth regulators, elongation, proliferartion.

IrHC2019