تکثیر درون شیشه‌ای دورگ بین گونه‌ای HS-F2 از جنس پرونوس

جلیل دژم پور
دانشیار مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی آذربایجان شرقی- تبریز
*نویسنده مسئول: dejampour@yahoo.com

چکیده

بمنظور دستیابی به پروتوکل ریزازدیادی دورگ بین گونه‌ای "HS-F2" که نسل دوم از تلاقی برگشتی دورگ هلو بادام با بادام (*Prunus persica*× *p. amygdalus)*×*P.amygdalus*) است این آزمایش طراحی و ریزازدیادی درون شیشه‌ای آن بررسی شد .در صورتیکه این دورگ رویشی به تکثیر انبوه برسد می‌تواند جایگزین خوبی برای پایه‌های بذری برخی درختان میوه هسته‌دار بخصوص برای ارقام بادام و هلو باشد. نمونه‌های تک جوانه پس از ضدعفونی سطحی، در محیط کشت DKW , WPM دارای ۳ درصد ساکاروز، ۱۰۰ میلی گرم در لیتر فلوروگلوسینول، ۰/۷ درصد آگار گیاهی و ۰/۵ میلی گرم در لیتر بنزیل آمینو پورین (BAP) کشت شدند . جهت پرآوری و شاخه‌زایی نمونه‌ها به همان محیط کشت با ۰/۵، ۱ و ۲ میلی گرم در لیترBAP بعلاوه صفر ، ۰/۱ و ۰/۵ میلی گرم در لیتر اندول بوتیریک اسید(IBA) منتقل گردیدند. بیشترین تعداد شاخه‌زایی در محیط کشت DKW با ۱ میلی گرم در لیتر BAP + ۰/۰۲ میلی گرم در لیتر IBA بدست آمد. برای ریشه زایی ریز شاخه‌های حاصله از مرحله پرآوری به همان محیط با ۰/۵، ۱ ، ۲ و ۴ میلی گرم در لیتر IBA و یا نفتالین اسید استیک (NAA) منتقل شدند. بیشترین تعداد ریشه و بیشترین طول ریشه از محیط کشت حاوی ۲ میلی گرم در لیتر IBA حاصل شد. با تقلیل غلظت نمک‌های محیط DKW به نصف درصد ریشه‌زایی از ۵۵ درصد به ۶۶ درصد افزایش یافت. در نهایت گیاهچه‌های ریشه دار شده بدون تلفات و با موفقیت به محیط بیرون شیشه‌ای منتقل و مراحل سازگاری آنها انجام گرفت.

کلمات کلیدی: BAP, DKW, WPM، ریزازدیادی، پرونوس

مقدمه

یکی از عوامل محدود کننده در بخش میوه کاری مسئله پایه پیوندی است که بعنوان یک مشکل جدی در میوه کاری محسوب می‌شود. برای رفع این عامل محدود کننده اقدام به تلاقی بین گونه‌ای می‌کنند که از این طریق یعنی تلاقی بین گونه‌ای خصوصیات متنوعی در میان دورگ‌ها بوجود می‌آید تا بتواند مشکلات مربوط به عامل محدود کننده پایه را در جنس پرونوس حل نماید. این پدیده مدیون انجام تلاقی بین گونه‌های مختلف در جنس پرونوس است. انتخاب مناسب‌ترین روش ازدیاد رویشی، می‌تواند در تولید انبوه این پایه‌ها و در نتیجه اصلاح باغ‌های هسته‌دار در کشور نقش داشته باشد. یکی از مهم‌ترین این روش‌ها ازدیاد گسترده آنها از طریق کشت درون شیشه‌ای است. در ایران اولین تحقیق در خصوص تکثیر درون شیشه ای دورگ هلو × بادام (GF677) توسط کمالی و همکاران (۲) در سال ۱۳۸۰ اجرا گردید. این محققین گزارش کردند که بهترین روش ضدعفونی با استفاده از کلریدجیوه ۰/۱٪ به مدت ۶ دقیقه می‌باشد و بالاترین شاخه زایی با استفاده از محیط کشت Knop تغییر یافته به همراه ۲ درصد ساکاروز و یک میلی گرم در لیتر BAP بدون اضافه نمودن نفتالین استیک اسید بدست آمد. ذوالفقار نسب وهمکاران (۲) گزارش کردند که از بین محیط های کشت تحت مطالعه MS، WPM و M1، محیط کشت WPM با یک میلی گرم در لیتر BAP بالاترین نسبت پرآوری و با ۶/۵ میلی گرم در لیتر IBA بالاترین درصد ریشه‌زایی را در ریزازدیادی درون شیشه ای دورگ گوجه × زردآلو داشتند. دژم پور و همکاران (۴) در ریزازدیادی دورگ بین گونه‌ای هلو و بادام HS314 از محیط کشت DKW استفاده نمودند و بیشترین شاخه زایی را با ۲ میلی گرم در لیترBAP گزاش نمودند. میری

IrHC2019

وهمکاران (۳) بمنظورجلوگیری از فنلی شدن نمونه های گیاهی در کشت درون شیشه ای همگروه های سیب M.26 و M.9 ، نگهداری ریزنمونه های تازه کشت شده به مدت ۶ روز در یخچال را توصیه کردند . هدف از این پژوهش تعیین بهترین روش ضدعفونی ، ارزیابی قابلیت افزایش درون شیشه ای و انتخاب مناسبترین محیط کشت با توازون هورمونی مناسب جهت ریزازدیادی دورگه‌ها است.

مواد و روشها

دورگه تحت بررسی از میان ۱۰۶ دورگه موجود در ایستگاه تحقیقات باغبانی سهند انتخاب شده و بنام "HS-F2" حاصل تلاقی برگشتی دورگ هلو× بادام با بادام می باشد. کلیه مراحل این پژوهش در ایستگاه تحقیقات باغبانی سهند و آزمایشگاه کشت بافت دانشکده کشاورزی دانشگاه تبریز اجرا گردید . نمونه ها در چهار محیط کشت شامل QL ، WPM , MS تغییر یافته و Knop تغییر یافته و با استفاده از هورمون BAP (صفر ،۰/۵ و ۱ میلی گرم در لیتر) و NAA (۰/۰۵ میلی گرم در لیتر) کشت شدند .شایان ذکر است pH محیط کشت برابر ۵/۷ بود و در تهیه آن از آگار ۰/۷ درصد و ساکاروز ۳ درصد استفاده شد . در واکشت‌های نهایی مرحله پرآوری، جهت ایجاد رشد طولی شاخساره‌ها و آماده شدن نمونه‌ها برای انتقال به محیط ریشه‌زایی از GA3 به مقدار ۲ میلی گرم درلیتراستفاده گردید. برای ریشه زایی ریز قلمه‌هایی بطول ۲ تا ۵ سانتی متر انتخاب و در ظروف شیشه‌ای۱۰۰×۵۰ میلی متری و لوله‌های آزمایش ۱۰۰×۱۵ میلی متری حاوی محیط کشت MS تغییر یافته و WPM با نصف غلظت عناصرمیکرو (به استثناءآهن) به همراه تنظیم کننده رشد IBA با غلظت (صفر، ۰/۵ ، ۱ ، ۱/۵ ، ۲ میلی گرم در لیتر) کشت شدند. در آزمایش دیگر تنظیم کننده رشد IBA پس از فیلتر کردن در زمان کشت به صورت آغشته نمودن قسمت تحتانی ریز قلمه‌ها، در غلظت‌های صفر، ۵۰۰، ۷۵۰ و۱۰۰۰ میلی گرم در لیتر به مدت ۵ ثانیه استفاده شد. نمونه‌ها در هر دو روش پس از کشت به مدت ۷ روز در تاریکی نگه داری و سپس به شرایط اتاق رشد استاندارد (دمای ۱± ۲۲ درجه سانتی گراد و۱۶ ساعت فتوپریود با شدت نور ۳۰۰۰ لوکس) منتقل شدند.

نتایج و بحث

نتایج نشان داد بین دو ژنوتیپ از لحاظ درصد ریز نمونه های رشد کرده اختلاف معنی‌داری وجود داشت. اثر متقابل محیط کشت و ژنوتیپ نیز معنی‌دار بود بطوریکه در HS- F2 بهترین محیط کشت WPM و برای GF677 بهترین محیط کشت MS تغییر یافته بود. هیچ یک از دو ژنوتیپ تحت مطالعه در هیچ یک از محیط کشت‌های Knop تغییر یافته و QL رشد خوبی نداشتند. دراین مرحله علیرغم اینکه ریز قلمه‌ها با تیمار هورمونی BAP (۰/۵ میلی گرم در لیتر) وNAA (۰/۰۵ میلی گرم در لیتر) رشد خوبی داشتند ولی با بقیه تیمارهای هورمونی اختلاف معنی داری نشان ندادند

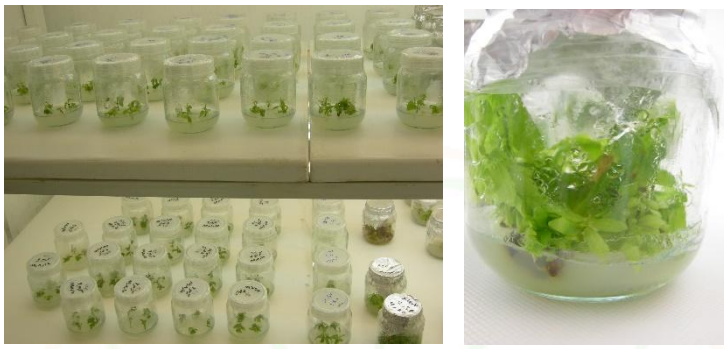
جدول «۱» میانگین درصد رشد نمونه‌های تک جوانه در مرحله استقرار

محیط کشت / ژنوتیپ	درصد نمونه های رشد کرده			
	MS تغییر یافته	WPM	QL	Knop
HS- F2	64.8bc	75a	54.9d	35.5f
GF677	61.5bc	58 c	40e	30.3g

* میانگین های با حروف مشابه اختلاف معنی دار در سطح احتمال ۵٪ ندارند

IrHC2019

تجزیه آماری نشان داد اثرات متقابل (ژنوتیپ × محیط کشت ، ژنوتیپ × هورمون و ژنوتیپ × هورمون × محیط کشت) و اثرات ساده در این بخش از آزمایش معنی‌دار است (جدول۲) و این نشان دهنده آنست که ژنوتیپ‌ها نسبت به محیط کشت ها و غلظت‌های مختلف هورمونی عکس العمل متفاوت نشان دادند و درجه پرآوری دو ژنوتیپ با همدیگر فرق می‌کند . دورگه HS- F2 در محیط کشت WPM به ترتیب با میانگین پرآوری ۵/۷ و ۲/۴ شاخساره و ژنوتیپ GF677 درمحیط کشت MS تغییر یافته به ترتیب با میانگین پرآوری ۴/۸ ، ۱/۷ و ۳/۹ شاخساره با غلظت هورمونی ۱ میلی گرم درلیترBAP + ۰/۱ میلی گرم در لیتر IBA (در کلیه محیط‌های کشت) بیشترین شاخه‌زایی را داشتند ولی با غلظت هورمونی ۱/۵ میلی گرم در لیتر BAP اختلاف در میزان شاخه‌زایی ژنوتیپ‌ها معنی‌دار نبود (شکل ۱) .



شکل «۱» شاخساره‌های رشد کرده دورگ بین گونه ایHS- F2 در محیط استقرار و پرآوری

جدول «۲» میزان پرآوری و شاخه زایی در سه محیط کشت مختلف با غلظت های مختلف هورمون

	محیط های کشت											
	MS تغییر یافته				WPM				MS 2/1			
غلظت BAP → / ژنوتیپ ↓	0	0.5	1	1.5	0	0.5	1	1.5	0	0.5	1	1.5
HS- F2	0.75jk	2.7ef	4bc	4bc	1ij	3.8cd	5.7a	5a	0.5kl	2.5efg	3ef	2.8ef
GF677	1ij	2.8ef	3.9cd	3.9cd	0.9hi	2.6efg	3.8cd	3.7cd	0.6kl	3ef	3.7cd	3.6de

* میانگین‌های با حروف مشابه اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۵٪ ندارند

نتایج نشان داد بین غلظت‌های مختلف IBA در ریشه دهی ژنوتیپ‌ها اختلاف معنی دار ($P\leq0.05$) وجود داشت و مقایسه میانگین‌ها نشان داد بالاترین درصد ریشه‌زایی مربوط به غلظت ۱/۵ و ۲ میلی گرم در لیتر می‌باشد. اثر متقابل ژنوتیپ، غلظت IBA و محیط کشت معنی‌دار ($P\leq0.05$) می باشد، بدین معنی که GF677 بالاترین ریشه زایی را در محیط کشت MS تغییر یافته با غلظت ۱/۵ میلی گرم در لیتر IBA داشت و ژنوتیپ HS- F2 بهترین ریشه‌زایی و رشد ریز قلمه ها را در محیط WPM با نصف غلظت عناصر ماکرو از خود نشان داد. در این رابطه دیگر محققین (۴ و ۷) نتایج مشابهی در ریشه‌زایی درون‌شیشه‌ای دورگه هلو × بادام (PR204/84) به دست آوردند و اعلام داشتند ریشه‌زایی در محیط MS با نصف غلظت بعلاوه ۱۲ روز دوره تاریکی در غلظت‌های ۰/۲۵ و ۰/۵۰ میلی‌گرم در لیتر IBA بالاترین درصد ریشه‌زایی را دارد.

جدول «۳» میانگین درصد ریشه زایی در سه غلظت هورمونی

IrHC2019

IBA در دو محیط کشت مختلف

محیط کشت Medium	غلظت IBA concentration IBA(mgl-1)	HS- F2	GF677
MS تغییر یافته			
	1	33.00gh	42.33ef
	1.5	46.00e	66.18ab
	2	42.47ef	60.02c
WPM			
	1	56.00cd	32.30gh
	1.5	71.12a	50.00d
	2	70.00a	42.97ef

- میانگین‌های با حروف مشابه اختلاف معنی دار در سطح احتمال ۵٪ با آزمون دانکن ندارند

به طور میانگین درصد موفقیت سازگاری گیاهچه‌های ریشه دار شده ۷۵ درصد بود. اکثر گیاهچه‌های از بین رفته در این مرحله مربوطه به گیاهچه‌های با رشد ضعیف و ریشه‌های کمتر بودند. در مرحله انتقال، ژنوتیپ HS- F2 به علت داشتن ریشه های قوی و سالم در مقایسه باGF677 از پراکنش و قدرت سازگاری بیشتری برخوردار بودند.در مرحله قبل از ریشه زایی و در مرحله طویل شدن بمنظور ایجاد رشد طولی استفاده از GA3 بسیار سودمند است (۴) بنابراین در این آزمایش نیز پس از مرحله پرآوری جهت ایجاد رشد طولی به محیط های کشت GA3 به مقدار ۲ میلی گرم در لیتر اضافه شد و همه ژنوتیپ ها به آن عکس العمل مثبت نشان دادند و نسبت به شاهد (بدون هورمون) از رشد بسیار خوبی برخوردار بودند و این برای انتقال به محیط ریشه زایی بسیار مناسب می باشد (۶) . در پژوهشی بهترین شرایط برای القای ریشه‌دهی محیط حاوی چهار میلی‌گرم در لیتر ایندول بوتیریک اسید و تیمار تاریکی بود (۶). در پژوهش دیگری غلظت ۶/۵ میلی‌گرم در لیتر ایندول بوتیریک اسید برای ریشه‌زایی پایه سخت ریشه‌زایی که حاصل تلاقی طبیعی زردآلو و گوجه بود، گزارش شد (۱). در مقابل پایه رویشی محلب در محیط کشت بدون تنظیم کننده‌های رشد بیش‌ترین ریشه‌زایی را به همراه داشت (۳). در مقایسه با این پژوهش‌ها به نظر می‌رسد دورگ مورد مطالعه در این پژوهش سخت ریشه‌زا نباشند. زیرا به غلظت‌های بالای تنظیم کننده‌های رشد برای ریشه‌زایی نیاز ندارند. با توجه به اینکه دورگ مورد آزمایش در این مقاله برای اولین بار از لحاظ قابلیت ریزازدیادی مورد ارزیابی قرارمی گرفتند بنابراین در این پژوهش لازم بود روش ضدعفونی ، محیط کشت و شرایط رشدی مناسب برای هر یک از دورگه ها در شرایط کشت درون شیشه ای بطور جداگانه تعیین گردد. تا براین اساس و سایر آزمایشات تکمیلی که در این راستا انجام می گیرد بتوان در انتخاب و معرفی این دورگ قضاوت نمود . بطوریکه با داشتن قابلیت ریزازدیادی مطلوب می توان از ژنوتیپ های برتر انتخاب شده بعنوان پایه رویشی در احداث باغات جدید ، یکدست و مدرن درختان میوه هسته دار و بادام استفاده نمود.

IrHC2019

منابع

ذوالفقاری نسب ، رحیم. محمود خسروشاهی، وازگین گریگوریان و علیرضا مطلبی آذر. ۱۳۸۳. بررسی افزایش درون شیشه ای دورگه طبیعی زردآلو× گوجه. مجله علوم و فنون باغبانی ایران ،جلد ۵ شماره ۲ .

کمالی کاظم، اسلام مجیدی و رضا ضرغامی.۱۳۸۰. تعیین مناسبترین محیط کشت و شرایط رشد جهت ریزازدیادی پایه های رویشیGF677 (هیبرید هلو × بادام). مجلۀ نهال و بذر جلد ۱۷. شمارۀ ۳.

میری سید مهدی ، بهزاد واعظ لیواری ، احمد خلیقی و سید علی قائم مقامی . ۱۳۸۲. کاهش اکسیداسیون فنولی و پرآوری درون شیشه ای شاخساره همگروه های سیب M.9 وM.26 ، مجله علوم و فنون باغبانی ایران ،جلد ۴ شماره ۳و۴ .

Dejampour, J., Majidi, E., Khosravi, S., Farhadi, S. and Shadmehr, A. 2011. In vitro propagation of HS314 rootstock (Prunus amygdulus × P. persica). Horticultural Science . 46: 928-931.

Kester, D. E., Asay, R. N. and Gradzil, Th. M. 2002. 'Nickels' Almond × Peach hybrid clonal rootstock. Hort. Sci., 137 (2): 415 – 417.

Reeves, D. V., G. A. Couvillon and B. D. Horton. 1985. Effects of giberellic acid (GA3) on elongation and rooting of 'St. Jolien A' on the in vitro condition. Scientia Horticulturae. Vol. 26, Pp 253 – 259.

Renaud, R., Bernhard, R., Grasselly, Ch. and Dosba, F. 1988. Diploid plum × peach hybrid rootstocks for stone fruit trees. HortScince. 23 (1): 115 – 117.

In Vitro Propagation of interspecific hybrid "HS- F2"

Jalil. Dejampour
Associate professor of Agricultural and Natural Resources Research Center of East Azerbaijan- Tabriz
Corresponding Author: dejampour@yahoo.com

Abstract

A micropropagation protocol was developed for the HS- F2 rootstock, a hybrid between apricot and prune that could be used as an alternative clonal rootstock instead of seedling rootstocksfor stone fruits. Surface-sterilized nodal segments were cultured in WPM medium containing 3% sucrose, 100 mg_L–1 of Phloroglucinol, 0.7% plant agar, and 0.5 mg_L–1 benzyl amino purine (BAP). Explants were transferred to the same culture media supplemented with 0.5, 1, or 2 mg_L–1 BAP and 0, 0.02, or 0.05 mg_L–1indole butyric acid (IBA) for further shoot proliferation. The maximum number of shoots produced on WPM medium containing 1 mg/l BAP + 0.02 mg/l IBA as the best culture media and concentration of growth regulators. Microshoots were transferred to the WPM medium supplemented with 0.5, 1, 2, or 4 mg_L–1 IBA or naphthaleneacetic acid (NAA) for root induction. The highest root number and the greatest root length were gained on a medium containing 2 mg_L–1 IBA. Rooting percentage was improved from 65% to more than 75% by reducing the concentration of WPM salts to half strength. Finally, rooted plantlets were successfully acclimatized and transferred in vivo conditions.

Key words: BAP, WPM, IBA, Micropropagation, Prunus

IrHC2019