بررسی استقرار و پرآوری پایه‌ی رویشی کادامن (*Prunus persica× P. davidiana*) در کشت درون شیشه‌ای

حسن ساریخانی‌خرمی، حسن ساری‌خانی*
گروه علوم باغبانی، دانشگاه بوعلی سینا، همدان
*نویسنده مسئول: sarikhani@basu.ac.irhasan

چکیده

در بین روش‌های مختلف تکثیر پایه‌های درختان میوه، ریز ازدیادی روشی کارآمد و مناسب است که امروزه در سطح وسیعی کاربرد دارد. به همین منظور در این پژوهش، گندزدایی، استقرار و تأثیر نوع محیط کشت و غلظت‌های مختلف تنظیم‌کننده‌های رشد بر پر آوری پایه‌ی کادامن بررسی شد. ریز نمونه‌های تک گره از رشد جدید شاخه‌ها در فصل بهار تهیه‌شده و توسط غلظت‌های مختلف هیپوکلریت سدیم ضدعفونی شدند. سپس در محیط کشت MS و WPM فاقد تنظیم‌کننده‌های رشد مستقر گشتند. به‌منظور بررسی شاخه‌زایی از دو محیط کشت MS و WPM حاوی بنزیل‌آدنین در سه غلظت ۰، ۱ و ۲ میلی‌گرم در لیتر و نفتالین استیک اسید در سه غلظت ۰، ۰/۰۵ و ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر استفاده شد. نتایج نشان داد که هیپوکلریت سدیم در غلظت ۱/۵ درصد به مدت ۱۰ و ۱۲ دقیقه بیشترین کنترل آلودگی و کمترین سیاه‌شدگی ریزنمونه‌ها را داشت. استقرار ریزنمونه‌ها در محیط کشت MS فاقد تنظیم‌کننده‌های رشد به‌خوبی صورت پذیرفت. در مرحله‌ی پرآوری محیط کشت WPMنسبت به MS پرآوری بالاتری را داشت اما ریز نمونه‌های رشد یافته در این محیط کشت غلظت کلروفیل کمتر و سرسبزی پایین‌تری نسبت به ریز نمونه‌های رشد یافته در محیط کشت MS داشتند. کاربرد بنزیل آدنین با غلظت ۲ میلی‌گرم در لیتر و نفتالین استیک اسید با غلظت ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر بالاترین تعداد شاخه را تولید نمود. با بیشتر بودن تعداد شاخه طول شاخه‌ی کمتری مشاهده شد.

***کلمات کلیدی:*ریز ازدیادی، استریل، کشت بافت، تکثیر، پایه‌های رویشی.**

مقدمه

هسته‌داران[1] متعلق به زیر خانواده‌ی Prunoidae تیره‌ی گل‌سرخیان، دارای میوه‌های شفت هستند (Mahmood*et al.*,2008). قلمه‌ی اغلب ارقام مهم تجاری هسته‌دار سخت‌ریشه‌زا بوده و به‌طور معمول با پیوند روی پایه‌های کلونی و بذری تکثیر می‌شوند (Baleriola-Lucasand Mullins, 1984). استفاده از پایه‌های رویشی به دلیل برخی ویژگی‌های مطلوب مانند مقاومت به شرایط نامساعد رشد از اهمیت فراوانی برخوردار است. ازجمله‌ی این پایه‌ها می‌توان به پایه‌ی کادامن که از تلاقی *Prunus davidiana*×*Prunus persica* به‌دست‌آمده است اشاره کرد که به برخی ویروس‌ها مانند Plum pox virus (Salava *et al.*, 2013) و نیز به برخی نماتدها (Pinochet *et al.*, 1996) مقاوم است، قدرت رشدی خوبی داشته، محصول بیشتری نسبت به دیگر پایه‌های دورگ هلو و بادام تولید می‌کند و میوه‌های درختان پیوند شده روی آن کیفیت بالاتری دارند(Font iForcada *et al.*, 2009).

ریز ازدیادی در درختان میوه به‌عنوان روشی مؤثر برای تکثیر پایه‌ها کاربرد دارد (Borkowska*et al.*, 2008; Choudhary *et al.*, 2015). این روش دارای دشواری‌های متعددی ازجمله انتخاب محیط کشت مناسب، آلودگی داخلی

[1] *Prunus*

نمونه‌ها، ضدعفونی سطحی نمونه‌ها، انتخاب غلظت مناسب تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی و همچنین هزینه‌های بالای ایجاد شرایط بهینه رشد و تکثیر است. بدین منظور پژوهش‌های متعددی جهت تعیین شرایط مناسب تکثیر پایه‌ها انجام شده است (Isikalan *et al.*,2008 ؛Couto*et al.*, 2004 ؛GÜREL and Gulsen, 1998). گزارش‌شده بیشترین درصد شاخه‌زایی بادام نانپاریل از محیط کشت MS حاوی ۱ میلی‌گرم در لیتر بنزیل آدنین (Isikalan*et al.*,2008) دیده‌شده است. با بررسی ریز ازدیادی بادام ارقام تگزاس و نانپاریل، بیان‌شده که وجود غلظت پایین BAP برای نمو شاخه ضروری است (Gureland Gulsen, 1998). در ریز ازدیادی پایه‌ی کادامن مشخص شد که کاهش غلظت نمک محیط کشت سبب افزایش تولید شاخه با اندازه کوتاه‌تر می‌گردد (Couto *et al.*, 2004).

هدف از این پژوهش تعیین شرایط مناسب جهت گندزدایی، استقرار و پرآوری ریز نمونه‌های پایه‌ی کادامن در شرایط کشت درون شیشه‌ای است.

مواد و روش‌ها

ریز نمونه‌های مورد استفاده در این پژوهش از شاخه‌های رشد جدید انتخاب و در آزمایشگاه به قطعات ۲ تا ۳ سانتی‌متری تقسیم شده و ضدعفونی شدند. جهت ارزیابی مناسب‌ترین غلظت و مدت‌زمان کاربرد هیپوکلریت سدیم محلول‌های ۱، ۱/۵، ۲ و ۲/۵ درصد آن همراه با چند قطره توئین ۲۰ تهیه شده و به مدت ۱۰ و ۱۲ دقیقه جهت استریل نمونه‌ها مورد استفاده قرار گرفتند. ریز نمونه‌های استریل شده به‌صورت تک گره در محیط کشت MS و WPM فاقد تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی استقرار یافتند.

در مرحله‌ی بررسی اثر نوع محیط کشت، غلظت بنزیل آدنین (BA) و نفتالین استیک اسید (NAA) بر شاخه زایی، از دو محیط کشت MS و WPM دارای بنزیل آدنین در غلظت‌های ۰، ۱ و ۲ میلی‌گرم در لیتر و نفتالین استیک اسید در سه غلظت ۰، ۰/۰۵ و ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر، ۳ درصد ساکارز و ۰/۷ درصد آگار استفاده شد. پس از هشت هفته شاخص‌های رشدی ریز نمونه‌ها ازجمله تعداد شاخه، تعداد گره، طول شاخه و طول میانگره‌ها اندازه‌گیری شد. تجزیه و تحلیل داده‌ها به کمک نرم‌افزار SAS نسخه‌ی ۹/۴ و مقایسه میانگین تیمارها به کمک آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح ۵ درصد انجام پذیرفت.

نتایج و بحث

از بین غلظت‌های به کار رفته جهت ضدعفونی، محلول ۱ درصد هیپوکلریت نتوانست آلودگی‌های سطحی را به‌خوبی کنترل نماید و بیش از ۴۰ درصد ریز نمونه‌ها در اثر آلودگی از بین رفتند. محلول ۱/۵ درصد هیپوکلریت سدیم به مدت ۱۲ دقیقه مناسب‌ترین تیمار جهت ضدعفونی سطحی نمونه‌ها بود چرا که در این تیمار علاوه بر کنترل آلودگی اثر منفی بر رشد ریز نمونه‌ها مشاهده نشد. در تیمار ۲/۵ درصد هیپوکلریت به مدت ۱۰ و ۱۲ دقیقه بخش زیادی از ریز نمونه‌های گیاهی سیاه شده و از بین رفتند. در مرحله‌ی استقرار محیط کشت MS نسبت به WPM رشد و توسعه‌ی بیشتری در ریز نمونه‌ها ایجاد نمود (طولی در حدود ۵/۲ سانتی‌متر در محیط کشت MS و ۱/۸ سانتی‌متر در محیط کشت WPM). علت این رشد بیشتر می‌تواند مربوط به غلظت بالاتر برخی عناصر ضروری نظیر نیتروژن و پتاسیم موجود در محیط کشت MS نسبت به محیط کشت WPM باشد.

در ارتباط با بررسی اثر نوع محیط کشت و غلظت‌های مختلف BA و NAA بر پرآوری پایه‌ی کادامن در شرایط درون شیشه‌ای مقایسه میانگین اثر متقابل نوع محیط کشت و غلظت بنزیل آدنین (جدول۱) نشان داد که بیشترین طول میانگره (۲/۰۹ میلی‌متر) در محیط کشت MS فاقد BA دیده شد و کمترین مقدار (۰/۶۷ میلی‌متر) آن در محیط کشت WPM دارای ۲ میلی‌گرم بر لیتر BA مشاهده شد که با غلظت ۱ آن و با محیط کشت MS حاوی ۲ میلی‌گرم بر لیتر BA اختلاف معنی‌داری نداشت. با توجه به این نتایج به نظر می‌رسد با بالا رفتن شاخه‌زایی و صرف شدن انرژی گیاه در جهت تولید شاخه‌های بیشتر توان رشد شاخه‌ها کم شده و درنتیجه طول میانگره‌ها کاهش می‌یابد.

مقایسه میانگین اثر متقابل نوع محیط کشت و غلظت NAA روی طول میانگره نشان داد بیشترین طول میانگره (۱/۴۸ میلی‌متر) در تیمار محیط کشت MS فاقد NAA مشاهده گردید که اختلاف معنی‌داری با غلظت ۰/۰۵ میلی‌گرم در لیترNAA در همین محیط نداشت (جدول ۱).

جدول ۱- مقایسه میانگین اثر متقابل محیط کشت وBAو اثر متقابل نوع محیط کشت و NAA بر طول میانگره

نوع محیط کشت	غلظت BA (mg/l)	طول میانگره (mm)	غلظت NAA (mg/l)	طول میانگره (mm)
WPM	۰	۰/۸۸^{c}	۰	۰/۸۰^{c}
	۱	۰/۸۰^{cd}	۰/۰۵	۰/۸۱^{c}
	۲	۰/۶۷^{d}	۰/۱	۰/۷۳^{c}
MS	۰	۲/۰۹^{a}	۰	۱/۴۸^{a}
	۱	۱/۲۱^{b}	۰/۰۵	۱/۳۹^{ab}
	۲	۰/۷۷^{cd}	۰/۱	۱/۱۲^{b}

حروف مشابه در هر ستون نشان‌دهنده‌ی عدم اختلاف معنی‌دار در سطح ۵ درصد با استفاده آزمون دانکن است.

بیشترین تعداد شاخه (۱۲/۱۶) در محیط کشت WPM با غلظت ۲ میلی‌گرم در لیتر BA و ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر NAA به دست آمد که با سایر تیمارها اختلاف معنی‌داری داشت و کمترین تعداد شاخه (۲/۴۱) در محیط کشت MS حاوی غلظت ۱ میلی‌گرم در لیتر BA و فاقد NAA مشاهده شد (جدول ۲) البته این را باید در نظر گرفت که شاخه زایی تنها در حضور بنزیل آدنین مشاهده شد و تیمارهای فاقد آن تنها یک شاخه داشتند که از رشد مریستم ایجاد گردیده بود. بنابراین می‌توان گفت برای پرآوری BA فاکتوری اساسی است که با نتایج برخی پژوهشگران(Coutoet *al.*, 2004؛ Isikalan *et al.*,2008) مطابقت دارد Gurel and Gulsen. (1998) با بررسی پرآوری بادام ارقام تگزاس و نانپاریل، وجود BAP را برای نمو شاخه‌ها ضروری اعلام کردند.

بیشترین مجموع طول شاخه‌ها (۳۸/۹۶ میلی‌متر) در محیط کشت WPM دارای ۲ میلی‌گرم در لیتر بنزیل آدنین و ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر نفتالین استیک اسید به دست آمد که با تیمار محیط کشت MS حاوی ۰/۰۵ میلی‌گرم در لیتر نفتالین استیک اسید و فاقد بنزیل آدنین اختلاف معنی‌داری نداشت(جدول ۲) این در حالی است که مجموع طول شاخه‌ها در محیط کشت WPM به دلیل تعداد شاخه‌ی زیاد و در محیط کشت MS به دلیل طول میانگره بیشتر بوده است.

بیشترین طول شاخه (۳۴/۴۸ میلی‌متر) در محیط کشت MS حاوی ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر نفتالین استیک اسید و فاقد بنزیل‌آدنین دیده شد که به دلیل رشد زیاد شاخه‌ها و طول میانگره بالا در آن‌ها بود و کمترین طول شاخه (۲/۸۷ میلی‌متر) در محیط کشت MS دارای ۲ میلی‌گرم در لیتر بنزیل آدنین و ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر نفتالین استیک اسید مشاهده گردید که با تیمارهای محیط کشت WPM حاوی غلظت ۲ میلی‌گرم در لیتر بنزیل آدنین اختلاف معنی‌داری نداشت (جدول ۲). با توجه به این نتایج می‌توان گفت غلظت عناصر موجود در محیط کشت نظیر نیتروژن، پتاسیم و فسفر که سبب رشد ریز نمونه می‌شوند تحت تأثیر غلظت تنظیم‌کننده‌های رشد قرار دارد که با برخی از پژوهش‌ها (Borkowskaet *al.*, 2008; Choudhary *et al.*, 2015) همخوانی دارد.

جدول ۱- اثر محیط کشت، بنزیل آدنین و نفتالین استیک اسید بر تعداد شاخه، طول شاخه، تعداد گره در پایه‌ی رویشی کادامن هشت هفته پس از کشت.

محیط کشت	غلظت BA(mg/l)	غلظت NAA(mg/l)	تعداد شاخه	مجموع طول شاخه‌ها (mm)	طول شاخه (mm)	تعداد گره
WPM	۰	۰	-	۱۳/۱۶^{gh}	۱۲/۲۰^{b}	۱۳/۵۸^{g}
		۰/۰۵	-	۱۳/۱۱^{gh}	۱۳/۱۶^{b}	۱۴/۳۳^{g}
		۰/۱	-	۱۲/۲۰^{h}	۱۳/۱۱^{b}	۱۶/۲۵^{g}
	۱	۰	۳/۰۸^{def}	۱۶/۶۵^{fgh}	۵/۶۲^{cd}	۲۰/۳۳^{ef}
		۰/۰۵	۳/۲۵^{def}	۱۶/۸۱^{fg}	۵/۵۳^{cd}	۲۲/۰۸^{def}
		۰/۱	۴/۰۰^{de}	۱۸/۱۱^{f}	۴/۹۷^{cd}	۲۳/۱۶^{def}
	۲	۰	۵/۵۸^{c}	۱۷/۵۰^{fg}	۳/۴۸^{ef}	۲۶/۵۸^{cd}
		۰/۰۵	۹/۷۵^{b}	۲۶/۸۵^{d}	۲/۸۹^{f}	۳۷/۵۸^{b}
		۰/۱	۱۲/۱۶^{a}	۳۸/۹۶^{a}	۳/۲۳^{ef}	۶۳/۹۱^{a}
MS	۰	۰	-	۲۸/۹۰^{cd}	۲۸/۹۰^{a}	۱۳/۲۵^{g}
		۰/۰۵	-	۳۱/۴۸^{ba}	۳۱/۴۸^{a}	۱۳/۹۱^{g}
		۰/۱	-	۳۴/۴۸^{b}	۳۴/۴۸^{a}	۱۹/۴۱^{f}
	۱	۰	۲/۴۱^{f}	۳۰/۰۸^{cd}	۱۳/۱۹^{b}	۲۴/۱۶^{de}
		۰/۰۵	۳/۰۸^{def}	۲۸/۶۱^{cd}	۹/۷۳^{b}	۲۵/۵۰^{cd}
		۰/۱	۲/۵۸^{ef}	۲۹/۱۲^{cd}	۱۱/۶۸^{b}	۳۰/۲۵^{c}
	۲	۰	۳/۶۶^{def}	۲۲/۷۵^{e}	۶/۳۳^{c}	۲۳/۲۱^{def}
		۰/۰۵	۴/۳۳^{cd}	۱۷/۵۶^{fg}	۴/۱۲^{de}	۲۴/۷۵^{d}
		۰/۱	۵/۵۸^{c}	۱۵/۹۳^{fgh}	۲/۸۷^{f}	۲۶/۰۸^{cd}

حروف مشابه در هر ستون نشان‌دهنده‌ی عدم اختلاف معنی‌دار در سطح ۵ درصد بین تیمارها با استفاده آزمون دانکن است.

شکل ۱- پر آوری به‌دست‌آمده در محیط کشت WPM حاوی ۲ میلی‌گرم در لیتر BA و ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر NAA

بیشترین تعداد گره (۶۳/۹۱) در تیمار محیط کشت WPM حاوی ۲ میلی‌گرم در لیتر بنزیل آدنین و ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر نفتالین استیک اسید به وجود آمد که با سایر تیمارها اختلاف معنی‌داری داشت (جدول ۲). کمترین تعداد گره (۱۳/۲۵) در تیمار محیط کشت MS فاقد بنزیل آدنین و نفتالین استیک اسید مشاهده شد که اختلاف معنی‌داری با تیمارMS فاقد بنزیل‌آدنین و دارای ۰/۰۵ میلی‌گرم در لیتر نفتالین استیک اسید و تیمار محیط کشت WPM فاقد بنزیل آدنین و حاوی غلظت‌های ۰، ۰/۰۵ و ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر نفتالین استیک اسید نداشت(جدول ۲)

که می‌توان گفت غلظت بنزیل آدنین بیش از غلظت عناصر محیط کشت و غلظت نفتالین استیک اسید بر تعداد گره تأثیرگذار است.

با توجه به نتایج این پژوهش پایین‌تر بودن غلظت نمک‌ها در محیط کشت WPM نسبت به محیط کشت MS شاخه‌زایی بیشتری را سبب گردیده است که با نتایج Couto *et al.* (2004) مطابقت دارد. بنابراین محیط کشت WPM دارای ۲ میلی‌گرم در لیتر BA و ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر NAA بیشترین پرآوری را در ریز نمونه‌های پایه‌ی کادامن ایجاد نموده است و برای پرآوری این پایه قابل‌استفاده می‌باشد (شکل ۱).

منابع

Baleriola-Lucas, C. and Mullins, M.G. 1984. Micropropagation of two French prune cultivars (*Prunusdomestica* L.). Agronomie, 4 (5): 473-477.

Borkowska, B., Balla, I., Szucs, E. and Michaczuk, B. 2008. Evaluation of the response of micropropagated peach rootstock 'Cadaman'and cv.'Cresthaven'tomycorrhization using chlorophyll a fluorescence method.Journal of Fruit and Ornamental Plant Research,16: 243-260.

Choudhary, R., Chaudhury, R., Malik, S.K., and Sharma, K.C. 2015. An efficient regeneration and rapid micropropagation protocol for Almond using dormant axillary buds as explants.

Couto, M., Oliveira, R.P.D., and Fortes, G.R.D.L. 2004. *In vitro* multiplication of'Barrier'and'Cadaman'*Prunus* sp. rootstocks. RevistaBrasileira de Fruticultura, 26(1): 5-7.

Font iForcada, C., Gogorcena, Y., and Moreno, M.A. 2009. Effect of almond× peach hybrid rootstocks on fruit quality parameters and yield characteristics of peach cultivars. Acta Horticulturae, 962: 599-603.

Gurel, S. and Gulsen, Y. 1998. The effects of IBA and BAP on *in vitro* shoot production of almond (*Amygdaluscommunis* L.). Turkish Journal of Botany, 22(6): 375-380.

Isikalan, Ç.,Akbas, F.A., Namli, S., Tilkat, E. and Basaran, D. 2008. *In vitro* micropropagation of almond (*Amygdaluscommunis* L. cv. Nonpareil). African Journal of Biotechnology, 7(12):1876-1880

Mahmood, A.M., Duhoky, M. and Salman, M.A. 2008. *In vitro*propagation of peach (*Prunuspersica* L.) cv." Red June. J. Duhok University, 12(11): 67-73.

Pinochet, J., Aglès, M., Dalmau, E., Fernández, C. and Felipe, A. 1996. *Prunus* rootstock evaluation to root-knot and lesion nematodes in Spain. Journal of nematology, 28(4S): 616.

Salava, J., Polak, J. and Oukropec, I. 2013. Evaluation of the *Prunus* interspecific progenies for resistance to Plum Pox Virus. Czech Journal of Genetics and Plant Breeding, 49(2): 65-69.

Investigation of Establishment and Proliferation of CadammanRootstock (*Prunus persica* × *P. davidiana*) In *In Vitro* Culture.

Hassan Sarikhani-Khorami, Hassan Sarikhani*
Departmentof Horticultural Science, Bu-Ali Sina University, Hamedan-Iran.
**Corresponding Author: sarikhani@basu.ac.ir*

Abstract

Among the various methods of rootstock propagation, micropropagation is an efficient and appropriate method, so in this study disinfection, establishment and impact of the medium and different concentrations of growth regulators on proliferation of cadaman rootstock were investigated. single node samples got from shoots new growth in the spring and then washed with tap water and to verify disinfection insert in 1, 1.5, 2 and 2.5 percent sodium hypochlorite solutionsfor ten and Twelve minutes and then Established on MS and WPM medium without growth regulators. In order to evaluate shoot proliferation MS and WPM mediumwere used that containing 0, 1 and 2 mg per liter benzyladenine (BA) and 0, 0.05 and 0.1 mg per liter naphthalene acetic acid (NAA).The results showed that 1.5% sodium hypochlorite at for 10 and 12 minutes had maximum pollution control and minimum explants nigrescence. The establishment of explants in MS medium without growth regulators to be well accepted. Application of 2 mg per liter BA and 1.0 milligrams per liter NAA produced the highest number of branches. With the larger number of branches was lower length.

***Keywords*: Horticulture, Biotechnology, Postharvest, Pomology, Floriculture, Medicinal Plant, Floriculture.**