پرآوری درون‌شیشه‌ای سه پایه هیبرید منتخب هلو و شلیل (GN، TETRA و GF677)

موسی رسولی*[۱]، دنیا بهاءلو هوره[۲]، علی وطن پور ازغندی[۳]

[۱] استادیار گروه علوم باغبانی و مهندسی فضای سبز، دانشکده کشاورزی دانشگاه ملایر، ملایر ، همدان، ایران.

[۲] دانش‌آموخته کارشناسی ارشد تولیدات گیاهی، دانشگاه ملایر، ملایر، همدان، ایران.

[۳] استادیار بخش تحقیقات کشت بافت و سلول، پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی ایران،کرج، ایران

*نویسنده مسئول: m.rasouli@malayeru.ac.ir

چکیده

پایه‌های 'GN'، 'Tetra' و 'GF677'پایه‌هایی ارزشمند هستند که سازگار با اکثر ارقام میوه‌های هسته‌دار می باشند. این پایه‌ها به روش‌های غیرجنسی مانند قلمه زدن، خوابانیدن، پاجوش قابل تکثیر هستند ولی با روش‌های نوین کشت بافت می‌توان آن‌ها را با راندمان بیشتر و عاری از هرگونه آلودگی تکثیر کرد. در این تحقیق ریزازدیادی درون شیشه‌ای ریزنمونه‌های حاصل از سرشاخه‌های سالم و فعال از این پایه‌ها به طول ۲ - ۱/۵ سانتی‌متر با حداقل یک جوانه، پس از طی مراحل ضدعفونی در محیط MS تغییریافته حاوی ۰/۵ میلی‌گرم در لیترGA_3، ۰/۰۱ میلی‌گرم در لیتر IBA و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP استقرار داده شد. جوانه‌های فعال‌شده درون محیط MS حاوی (۰، ۰/۵، ۱، ۲ و ۴ میلی‌گرم در لیتر) BAP و ۱ میلی‌گرم IBA کشت گردید. بیشترین تعداد و بلندترین طول شاخه (۱/۲سانتی‌متر) و بیشترین تعداد برگ (۱۳/۵ عدد) در غلظت ۱ میلی‌گرم در لیتر BAP مشاهده شد. در بررسی میزان شیشه‌ای شدن، مقایسه بین آگار و ژل‌رایت صورت گرفت. نتایج نشان دهنده این مطلب بود درصد شیشه‌ای شدن در محیط حاوی آگار (۱۷ درصد) در مقایسه با ژل‌رایت (۳۷ درصد) کمتر بود، اما تعداد شاخه (۲/۱)، طول بلندترین شاخه (۲/۵) و کیفیت ظاهری رشد در ژل رایت بهتر بود. در غلظت ۰/۰۱ میلی‌گرم در لیتر IBA به همراه ۲ میلی‌گرم در لیتر BAP، ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر GA_3 و ۱ میلی‌گرم در لیتر 2ip بهترین طول شاخه به میزان ۲/۸ بدست آمد.

***کلمات کلیدی*: پایه رویشی، ریزازدیادی، پرآوری درون شیشه‌ای، غلظت BAP.**

مقدمه

هلو و شلیل از میوه‌های پرطرفدار در سطح دنیا و ایران می‌باشند. چهار کشور برتر تولیدکننده هلو و شلیل در دنیا به ترتیب چین (۱۱/۵ میلیون تن در سال)، ایتالیا (۱/۵۱۹ میلیون تن)، آمریکا (۱/۱۶۳ میلیون تن) و اسپانیا (۱/۱۲۳ میلیون تن) می‌باشند و میزان تولید در ایران ۵۰۰ هزار تن می‌باشد و از نظر تولید ایران در مقام هفتم قرار دارد. یکی از بهترین روش‌های حفظ خواص ژنتیکی در گیاهان باغی استفاده از روش ازدیاد رویشی پایه‌ها است که در این روش گیاهان از نظر ظاهری و ژنتیکی همانند می‌باشند. با توجه به اهمیت روزافزون پایه‌های رویشی تقاضا برای ازدیاد انبوه این پایه‌ها به‌صورت کلون زیاد است. یکی از روش‌های ازدیاد سریع این پایه‌ها استفاده از کشت درون شیشه است (Tatari et al., 2012). پایه رویشی 'GN' دارای خصوصیات ارزشمند مانند مقاومت علیه نماتدها و خفگی در کنار تولید محصول یکنواخت می‌باشد. این پایه بسیار پر رشد و پربار با میوه‌های یکنواخت می‌باشد. پایه رویشی 'Tetra' به رطوبت بالای خاک و خاک‌های آهکی مقاومت خوبی دارد و با پیوندک‌های هلو، شلیل، زردآلو، آلو و بادام به‌خوبی سازگار است، قدرت کمتری را به پیوندک القا می‌کند و پاجوش تولید نمی‌کند. پایه‌های 'GN' و 'Tetra' نیمه پاکوتاه و سازگار با اکثر ارقام میوه‌های هسته‌دار می‌باشند. پایه 'GF677' هیبرید طبیعی بین بادام و هلو بوده که مقاوم به خشکی، خاک‌های آهکی و متحمل به کمبود آهن می‌باشد. همچنین مقاومت خوبی در مقابل بیماری‌های لکه آجری و لکه سیاه دارد و تجانس خوبی با ارقام هلو و بادام داشته و به‌طور قابل‌توجهی محصول بادام و هلو را افزایش می‌دهد. این پایه به‌طور گسترده در دنیا برای هسته‌داران مورد استفاده قرار می‌گیرد. اگرچه در مورد ریزازدیادی پایه 'GF677' گزارشات متعددی در اختیار است ولی تحقیقات کافی در رابطه با عوامل مؤثر در ریزازدیادی پایه‌های 'GN' و

Tetra'انجام نشده است. اولین تحقیقات کشت درون شیشه‌ای پایه 'GF677' توسط تباکینگ وکستر (Tabachnick and Kester, 1977) انجام شد.آن‌ها توانستند با تغییراتی در محیط ناپس[1] نمونه‌های گیاهی را کشت و شاخه‌زایی نمایند. تحقیقات دیگری در مورد این پایه توسط دای ماسی و تریو (Dimassi and Theiou,1995) انجام شد.آن‌ها تأثیر محیط‌های کشت را برای ریشه‌زایی 'GF677' مورد تحقیق قرار دادند و نتیجه گرفتند ریشه‌زایی این پایه‌ها به غلظت و نوع محیط کشت استفاده شده بستگی دارد. در بررسی‌های که بر روی هلو انجام شد به این نتیجه رسیدند که بهترین تیمار جهت پرآوری هلو ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BA[2]، ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر IBA[3] می‌باشد. و بهترین تیمار برای ریشه‌زایی ۰/۵میلی‌گرم در لیتر IBA در محیط $MS_{1/2}$ می‌باشد که به میزان ۹۲ درصد ریشه‌زایی و با میانگین طول ۶/۸ سانتی‌متر گزارش گردید(Shehata et al., 2013).

هدف از انجام این تحقیق دستیابی به پروتکل‌های بهینه برای ریزازدیادی پایه‌های رویشی 'GN'، 'Tetra' و'GF677'، پرآوری درون شیشه‌ای و عوامل مؤثر بر آن به‌عنوان مهم‌ترین و اساسی‌ترین مرحله ریزازدیادی این پایه‌ها بود.

مواد و روش‌ها

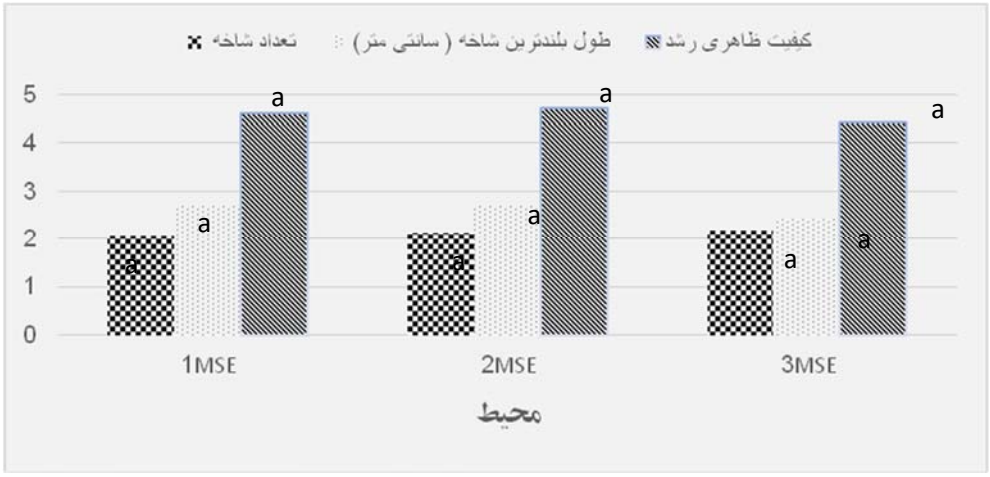
مواد گیاهی شامل نهال‌های تکثیری یک‌ساله سه پایه ('GN'،'Tetra' و'GF677') بودند که از شرکت دانش‌بنیان نهال گستر رویان در طالقان تهیه شد. پایه‌های مورد نظر در گلخانه پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی وابسته به وزارت جهاد کشاورزی ایران نگهداری شدند و نمونه‌گیری از شاخه‌های هر سه پایه در دی‌ماه ۱۳۹۳ انجام گردید.آزمایشات کشت بافت در بخش کشت بافت پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی ایران واقع در کرج انجام پذیرفت. شاخه‌های مورد استفاده به ریزنمونه‌های ۱/۵ الی ۲ سانتی‌متری تقسیم شدند به‌طوری‌که هرکدام حداقل دارای یک جوانه بودند. پروتکل ضدعفونی برای ریز نمونه‌های ساقه شامل۳۰ ثانیه الکل ۷۰ درصد، ۱۲ دقیقه نانوسید نقره ۲/۵ درصد، یک‌بار شستشو با آب مقطر استریل، ۱۰ دقیقه غوطه‌وری در وایتکس ۲۵ درصد و در انتها ۳ بار شستشو با آب مقطر استریل بود. ریزنمونه‌ها سپس در محیط MS تغییریافته با میزان ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر GA_3[4] و ۰/۰۱ میلی‌گرم در لیتر IBA و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP جهت استقرار کشت گردیدند و با فتوپریود ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد در فیتوترون به مدت یک ماه نگهداری شدند. پس از گذشت یک‌ماه جوانه‌های فعال‌شده از ساقه اصلی جدا شد و در محیط پرآوری حاوی غلظت‌های (۰، ۰/۵، ۱، ۲ و ۴ میلی‌گرم در لیتر) BAP و ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر IBA کشت گردید. در آزمایش بعد غلظت‌های (۰، ۰/۲۵ و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر) GA_3 و غلظت‌های (۰، ۰/۵ و۱ میلی‌گرم در لیتر)2ip[5] در ترکیب با ۲ میلی‌گرم در لیتر BAP بر پرآوری مورد بررسی قرار گرفت. در آزمایشی دیگر به بررسی تأثیر استفاده از آگار در مقایسه با ژل رایت در میزان شیشه‌ای شدن و شدت آن پرداخته شد. در آزمایش آخر اثر غلظت‌های (۰، ۰/۰۱ و ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر) IBA بر میزان شاخه زایی مورد بررسی قرار گرفت. آزمایش‌های صورت گرفته در قالب طرح فاکتوریل بر مبنای طرح کاملاً تصادفی با حداقل پنج تکرار برای هر تیمار انجام شد. فاکتورها شامل رقم و محیط کشت بودند. نتایج بدست آمده توسط نرم‌افزار SAS[6] (9.4) تجزیه آماری شد. مقایسه میانگین اثر تیمارها به روش آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ۱ و ۵ درصد انجام گرفت. همچنین رسم نمودارها با استفاده از نرم‌افزار Excel (2010) انجام گردید.

نتایج و بحث

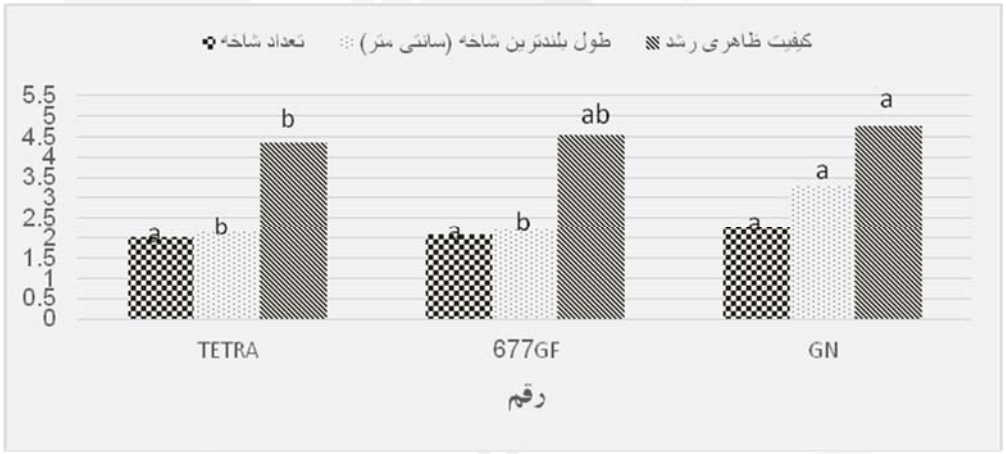
در بررسی نتایج جدول تجزیه واریانس اثر غلظت‌های مختلفBAP برپرآوری سه پایه هلو- شلیل غلظت BAP روی تعداد شاخه اثر معنادار در سطح ۱٪ و بر کیفیت ظاهری اثر معنادار در سطح ۵٪ داشت. بیشترین تعداد شاخه در غلظت۱ میلی‌گرم در لیتر BAP و در رقم 'GF677' مشاهده گردید. بلندترین طول شاخه به میزان ۱/۲ سانتی‌متر و بیشترین تعداد

1Knops
26-benzyladenine
3Indole-3-butyric acid
4Gibberellic Acid
52-Isopentenyladenine
6Statistical Analysis System

برگ به میزان ۱۳ عدد در رقم 'GN' و در غلظت ۱ میلی‌گرم در لیتر BAP مشاهده شد. بهترین کیفیت ظاهری در غلظت ۱ میلی‌گرم در لیتر BAP بدست آمد. همچنین در بررسی نتایج تجزیه واریانس اثر سه محیط کشت حاوی ۲ میلی‌گرم در لیتر BAP، (۰، ۰/۲۵ و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر) GA_3 و (۰، ۰/۵ و ۱ میلی‌گرم در لیتر) 2ip بر پرآوری سه پایه هلو- شلیل، رقم بر شیشه‌ای شدن، شدت شیشه‌ای شدن، طول بلندترین شاخه اثر معنادار در سطح ۱٪ داشت. همچنین بیشترین میزان شیشه‌ای شدن در محیط حاوی ۲ میلی‌گرم در لیترBAP بدون 2ip و GA_3 مشاهده شد. بیشترین تعداد شاخه با میزان ۲/۲ در محیط حاوی ۰/۵ میلی‌گرم در لیترGA_3 و ۱ میلی‌گرم در لیتر2ip بدست آمد(شکل ۱). بلندترین طول شاخه(۲/۷ سانتی‌متر) در رقم 'GN' و با غلظت ۰/۲۵ میلی‌گرم در لیتر GA_3 و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر2ip حاصل شد (شکل۲). در بررسی نتایج تجزیه واریانس اثر دو محیط کشت حاوی ۲ میلی‌گرم در لیتر BAP، ۰/۵ میلی‌گرم در لیترGA_3 و ۱ میلی‌گرم در لیتر2ip به همراه تیمار آگار و ژل رایت بر پرآوری سه پایه هلو- شلیل ، رقم روی شیشه‌ای شدن، شدت شیشه‌ای شدن اثر معنادار در سطح ۵٪ داشت. همچنین محیط کشت روی طول بلندترین شاخه در سطح ۱٪ اثر معنادار داشت. اثر متقابل محیط و رقم در طول بلندترین شاخه در سطح ۱٪ اثر معنادار از خود نشان داد. بیشترین میزان شیشه‌ای شدن (۹۳٪) و بیشترین شدت شیشه‌ای شدن (۲/۷) در محیط حاوی ۳ گرم در لیتر ژل‌رایت و در رقم'GN' مشاهده شد. بیشترین تعداد شاخه، بیشترین طول شاخه و بهترین کیفیت ظاهری رشد در محیط حاوی ژل رایت و در رقم 'GN' بدست آمد(جدول ۱). در بررسی نتایج تجزیه واریانس اثر سه محیط کشت حاوی ۲ میلی‌گرم در لیتر BAP، ۰/۵ میلی‌گرم در لیترGA_3، ۱ میلی‌گرم در لیترIP2 و (۰، ۰/۰۱ و ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر) IBA برپرآوری سه پایه هلو- شلیل، اثر متقابل محیط و رقم بر روی شیشه‌ای شدن، شدت شیشه‌ای شدن، تعداد شاخه، طول بلندترین شاخه و کیفیت ظاهری رشد اثر معنادار در سطح ۵٪ داشت. بیشترین میزان شیشه‌ای شدن (۴۱٪) و شدت شیشه‌ای شدن در محیط حاوی ۰/۱ میلی‌گرم در لیترIBA و در رقم 'GN' مشاهده شد. بیشترین تعداد شاخه (۲/۳) و بلندترین طول شاخه (۲/۸ سانتی‌متر) در محیط بدونIBA و در رقم 'GN' بدست آمد. در تحقیق حاضر، پرآوری سه پایه هلو- شلیل صورت گرفت بهترین محیط کشت جهت پرآوری MS تغییریافته با ۲ میلی‌گرم در لیتر BAP، ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر GA_3 و ۱ میلی‌گرم در لیتر 2ip بود که با نتایج بدست آمده از تحقیقات شهاتا و همکاران (۲۰۱۳) و نظری مقدم (۲۰۱۲) مشابه بود. با اضافه کردن 2ip به محیط کشت در ترکیب با GA_3 میزان شیشه‌ای شدن در ریزنمونه‌ها افزایش یافت. در پایه GN شیشه‌ای شدن با میزان ۹۷٪ مشاهده شد. به نظر می‌رسد ترکیب این دو هورمون گیاهی با میزان بالای BAP و غلظت پایین GA_3 بر میزان موفقیت آن‌ها تأثیرگذار بوده است. در بررسی دو محیط کشت MS یکی حاوی ۷ گرم در لیتر آگار و دیگری ۳ گرم در لیتر ژل‌رایت بر میزان شیشه‌ای شدن، آگار میزان شیشه‌ای شدن کمتری نسبت به ژل رایت داشت. صفات رویشی مورد ارزیابی (تعداد شاخه، طول بلندترین شاخه و کیفیت ظاهری رشد) در محیط کشت حاوی ژل رایت نسبت به آگار بهتر بود. که این نتایج با نتایج بدست آمده از تحقیقات Tatari et al., (2012) مشابه بود. این نتیجه به دلیل سفت‌تر بودن محیط حاوی آگار می‌باشد. غلظت ۰/۱ میلی‌گرم در لیترIBA در بلندتر شدن طول شاخه مؤثر بود. نتایج حاصله با نتایج بدست آمده از تحقیقات Shekafandeh (2010) برابری می‌کرد. اما استفاده از IBA تأثیر منفی در صفت تعداد شاخه داشت. در محیط کشتی که IBA استفاده نگردید تعداد شاخه بیشتری حاصل شد.



شکل ۱- اثرات محیط کشت بر تعداد شاخه، طول بلندترین شاخه و کیفیت ظاهری رشد(محیط ۱: ۲ میلی‌گرم در لیتر BAP، محیط ۲: ۲ میلی‌گرم در لیتر BAP، ۰/۲۵ میلی‌گرم در لیتر GA۳ و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر ۲ip، محیط ۳: ۲ میلی‌گرم در لیتر BAP، ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر GA۳ و ۱ میلی‌گرم در لیتر ۲ip)



شکل ۲-اثرات رقم بر تعداد شاخه، طول بلندترین شاخه و کیفیت ظاهری رشد.

جدول ۱- مقایسه میانگین اثرات متقابل محیط کشت و پایه رویشی بر برخی صفات رویشی در مرحله پرآوری.

محیط کشت	پایه رویشی	شیشه‌ای شدن	میزان شیشه‌ای شدن	تعداد شاخه	طول بلندترین شاخه (سانتی‌متر)	کیفیت ظاهری رشد
۷ گرم آگار	Tetra	۰/۴۴±۰/۵	۱/۸۱±۱/۲	۱/۸۱±۰/۸	۱/۷۸±۰/۸	۴/۶۹±۰/۶
	GF677	۰/۱۵±۰/۴	۱/۴۶±۱/۱	۱/۹۲±۰/۸	۱/۹۲±۱/۴	۴/۵۴±۰/۷
	GN	۰/۰۶±۰/۲	۱/۰۶±۰/۲	۱/۷۶±۰/۷	۱/۰۳±۰/۷	۴/۲۳±۱/۰
۳ گرم ژل‌رایت	Tetra	۰/۵۳±۰/۵	۲/۴۷±۱/۶	۱/۵۹±۰/۵	۱/۸۸±۰/۶	۴/۷۶±۰/۴
	GF677	۰/۳۱±۰/۵	۱/۴۶±۰/۸	۲/۲۳±۰/۷	۲/۶۹±۱/۲	۵/۰۰±۰/۰
	GN	۰/۲۵±۰/۵	۱/۲۵±۰/۵	۲/۵۸±۰/۵	۳/۲۵±۱/۰	۵/۰۰±۰/۰

منابع

Dimassi-Theriou, K. 1995. In vitro rooting of rootstock GF677 (*Prunusamygdalus x P. persica*) as influenced by mineral concentration of the nutrient medium and type of culture-tube sealing material. *J. Hort. Sci*., 70:105-108.

Shekafandeh, A. 2010. The effects of pH levels and plant growth regulators on *in vitro* regeneration of almond (*Prunusdulcis* Mill.). *World Applied Sciences Journal*, 8(11):1322-1326.

Shehata W.F., AL-Khayri J.M. 2013. Conservation of endangered Hassawi Peach (*Prunuspersica*L.) through micropropagation. *J. Biological Sciences*, 13:75-81

Tabachnik, L. and Kester, D.E. 1977. Shoot culture for almond and almond-peach hybrid clones in vitro. *HortScience*, 12:545-547.

Tatari Varnousfaderani, M., Mousavi, S. A., Bouzari. N. 2012. Micropropagation of some Clonal Rootstocks of Stone Fruits. 3. 28 (1) :53-66.

In Vitro Proliferation of Three Selected Rootstocks of Peach and Nectarine (GN, Tetra and GF677)

M.Rasouli[1*], D.Bahalou Horea[2] , A.Vatan Pour Azghandi[3]

[1] Assistant Professor, Department of Horticulture, Malayer University, Malayer, Hamedan, Iran.
[2] Graduate student of Plant Production of Horticultural Crops, Malayer University, Malayer, Hamedan, Iran.
[3] Assistant Professor, Department of cell and tissue culture, Agricultural Biotechnology Research Instituteof Iran, Karaj, Iran.
**Corresponding author: m.rasouli@malayeru.ac.ir*

Abstract

GN, Tetra and GF677 are valuable rootstocks as compatible with the most important stone fruits cultivars. These rootstocks are reproducible by asexual methods such as cuttings, layering and suckers, but with modern techniques of tissue culture can be product much more efficient and free from contamination multiply. In this study, in vitro micropropagation explants of healthy and active branches from the base to the length of 1.5 - 2 cm with at least one bud, after the disinfection process in MS medium containing 0.5 mg/l GA3, 0.01 mg/l IBA and 0.5 mg/l BAP was established. Maximum Buds activated in MS medium containing (0, 0.5,1, 2 and 4 mg/l) BAP and 0.1 mg IBA were cultured. The largest number of branches, the longest branches and the largest number of leaves at a concentration of 1 mg/l BAP were observed. In a survey of vitrification compared agar and gelright. The results showed that the percentage of vitrification in agar (17%) was less than to gel right (37%), but the number of branches (2.1), the largest branch (2.5 cm) and apparent growth was better in gel right. The better length of branch with 2.8 cm was obtained at a concentration of 0.01 mg/l IBA, 2 mg/l BAP, 0.5 mg/l GA3 and 1 mg/l 2ip.

***Keywords*: Vegetative Rootstock, Micropropagation, *In vitro* Proliferation, BAP concentration.**