بهینه‌سازی ریزازدیادی انار در کشت دورن شیشه‌ای

الهام اردکانی[*1]، غلامحسین داوری نژاد[2]، یحیی سلاح‌ورزی[3]، لیلا سمیعی[4]

[*1] گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد

[2] گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد

[3] گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد

[4] پژوهشکده علوم گیاهی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد

[*]نویسنده مسئول: e.ardakani@yahoo.com

چکیده

انار (*Punica granatum* L.) از خانواده پونیکاسه (Punicaceae) و از محصولات باارزش می‌باشد. ریزازدیادی انار از طریق کشت بافت می‌تواند راهکاری برای تولید نهال‌های یکنواخت و عاری از بیماری مطرح باشد. در حالیکه، عواملی مانند عدم ریشه‌زایی و قهوه‌ای شدن به دلیل حضور ترکیبات فنولی در کشت درون شیشه‌ای می‌تواند ریزازدیادی این گیاه را با مشکل مواجه سازد. به منظور یافتن راهکار مناسب برای حل این مشکلات، تاثیر عوامل مختلف بر ریزازدیادی ارقام انار مورد بررسی قرار گرفت. این آزمایش به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملا تصادفی با پنج تکرار انجام شد.

محیط‌کشت مورد استفاده در این تحقیق محیط‌کشت موراشی و اسکوگ (MS) بود. تنظیم کننده‌های رشد گیاهی شامل بنزیل آمینو پورین (صفر، ۰/۵، یک، دو و چهار میلی‌گرم در لیتر)، ایندول بوتیریک اسید (صفر، ۰/۲۵ و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر) بود. نتایج نشان داد که بین غلظت‌های مختلف تنظیم‌کننده‌های رشد اختلاف معنی‌داری وجود داشت. بر این اساس بیشترین پرآوری و رشد گیاهچه در محیط‌کشت MS حاوی یک میلی‌گرم بر لیتر بنزیل آمینو پورین و ۰/۲۵ میلی‌گرم بر لیتر ایندول بوتیریک اسید بود.

کلمات کلیدی: ازدیاد، *Punica granatum*، شاخه‌زایی، تنظیم کننده‌های رشد.

مقدمه

انار (*Punica granatum* L.) یکی از قدیمی‌ترین میوه‌های خوراکی است که به خانواده پونیکاسه تعلق دارد. این گیاه بومی ایران تا هیمالیا در شمال هند است، و به طور گسترده‌ای در ایران، هند، اسپانیا، افغانستان، پاکستان، ترکیه و ایالات متحده رشد می‌کند. مناطق فعلی کشت انار در دنیا مناطق گرمسیری، نیمه‌گرمسیری و معتدل مدیترانه‌ای است. تنوع ژنتیکی انار در ایران بسیار غنی است، یزد و ساوه از مناطق تولید کننده انار در ایران با بیش از ۷۰۰ رقم می‌باشد. انار اغلب در حاشیه بیابان‌ها در مرکز و شمال شرقی ایران رشد می‌کند، این مناطق دارای تابستان‌های طولانی و گرم است اما دما در زمستان ممکن است به ۲۰- درجه سانتی‌گراد یا کمتر برسد که باعث آسیب جدی به درختان انار شود. تولید سالانه انار در ایران حدود ۶۷۰۰۰۰ تن می‌باشد که یکی از بزرگترین تولیدکنندگان انار در دنیا است (آمارنامه جهاد کشاورزی، ۱۳۸۷). فارس، مرکزی، اصفهان، خراسان رضوی و یزد به ترتیب مهمترین استانهای انارخیز کشور می‌باشند وجود ذخایر ژنتیکی غنی از ارقام مختلف انار در ایران که به بیش از ۷۶۰ رقم و ژنوتیپ می‌رسد، از دیگر مزیت‌های کشور در این زمینه محسوب می‌شود (شاکری و دهقانی، ۱۳۸۶). ریزازدیادی شامل استقرار جوانه انتهایی و جانبی در شرایط درون شیشه‌ای و بزرگ شدن شاخه‌ها و تولید تعداد زیادی جوانه جانبی است. باززایی گیاه به طور عمده ممکن است از دو روش به دست آید: اندام‌زایی یا جنین‌زایی سوماتیکی.

باززایی گیاه از طریق اندام‌زایی بر این اساس استوار است که بخش‌های کوچکی از بافت گیاهی می‌تواند بازسازی کل گیاه را القا کند. شکل‌گیری اندام مورد نظر با تغییر در غلظت‌های تنظیم کننده‌های رشد گیاهی در محیط کشت در

IrHC2019

شرایط درون شیشه‌ای به دست می‌آید. دامیانو و همکاران (۲۰۰۸) به طور موفق توانستند بخش‌های جوانه‌های جانبی را با استفاده از ترکیب هیپوکلرید سدیم به مدت بیست دقیقه ضدعفونی کنند به طوری‌که شصت و پنج درصد ریزنمونه‌ها زنده ماندند.

ولی زاده کاجی و همکاران (۲۰۱۳) بیان کردند که با توجه به اینکه روش تکثیر انار خسته کننده و وقت گیر می‌باشد و از طرفی از سلامتی و عاری از بیماری بودن گیاهان هم مطمن نیستند، عنوان کردند که کشت بافت انار می‌تواند راه حلی برای این مشکل باشد. بر این اساس با استفاده از جوانه‌ها و shoot tip انار رقم "ملس یزدی" و دو محیط کشت MS و WPM و تنظیم کننده‌های رشد مختلف تحقیقی را انجام دادند. برای تکثیر، محیط کشت با غلظت‌های مختلف (۲/۳، ۴/۷، ۹/۲ و ۱۸/۴ میکرو مولار) کنتین همراه با ۰/۵۴ میکرومول ۱- نفتالین استیک اسید (NAA) غنی شدند. در این تحقیق محیط کشت WPM کارایی بهتری نسبت به محیط کشت MS داشت. بهترین غلظت کنیتین ۹/۲ میکرومولار با بالاترین تعداد جوانه، طول شاخه و تعداد برگ گزارش شد. محیط کشت WPM 2/1 غنی شده با ۵/۴ میکرومول NAA برای ریشه‌زایی شاخه‌ها بسیار موثر بود. هم چنین در تحقیقی دیگر دو رقم "ملس ساوه" و "یوسف خانی" مورد بررسی قرار گرفتند. استقرار ریزنمونه‌های نوک ساقه و گره‌ها را در دو محیط کشت مختلف MS و WPM حاوی غلظت‌های مختلف کنیتین همراه با NAA را بررسی کردند. نتایج نشان داد که بهترین محیط WPM و بهترین غلظت ۴/۷ میکرومول کنتین برای رقم ملس ساوه و ۹/۲ میکرومولار برای رقم یوسف خانی می‌باشد. برای ریشه‌زایی شاخه‌ها در هر دو رقم محیط WPM 2/1 غنی شده با ۵/۴ میکرومولار NAA موثرترین تیمار بود (ValizadehKaji *et al.*, 2013).

بنیان پور و خوشخوی (۲۰۱۳) با استفاده از نمونه‌های برگی ارقام محلی انار پاکوتاه در محیط کشت MS غنی شده با غلظت‌های مختلف BA و NAA القا کالوس را بررسی کردند. بعد از ۴۰ روز حداکثر تولید کالوس در محیط کشت محتوی ۱ میلی‌گرم بر لیتر BA و ۰/۲ تا ۰/۴ میلی گرم بر لیتر NAA مشاهده شد. هرچند در این تحقیق بالاترین رشد کالوس در محیط کشت محتوی ۱ میلی‌گرم بر لیتر BA و ۱ میلی‌گرم بر لیتر NAA به دست آمد. بیشترین تعداد شاخه (۷ شاخه به ازای هر نمونه) با انتقال کالوس‌ها به محیط کشت حاوی ۵ میلی‌گرم بر لیتر BA با ۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر NAAبه دست آمد. حداکثر شاخه‌های پرآوری شده در محیط کشت WPM حاوی ۵ میلی گرم بر لیتر کنیتین مشاهده شد. در این تیمار بعد از ۴ بار زیرکشت کردن ۳۶ شاخه از یک نمونه به دست آمد. در بین تیمارهای استفاده شده در آزمایشات ریشه‌دهی ، شاخه‌های کشت شده در محیط کشت WPM حاوی ۰/۲ میلی‌گرم بر لیتر IBA بالاترین درصد ریشه‌زایی (۱۰۰٪) و رشد خوب ریشه (۲/۰۶ طول ریشه) را داشت .(Bonyanpour and Khosh-Khui, 2013)

در بررسی دیگر بر روی رقم "ملس ساوه" از دو محیط کشت جامد و مایع و ریز نمونه‌های مختلف جهت کالوس‌زایی استفاده شد. نتایج این تحقیق نشان داد که بیشترین تعداد شاخه به ازای هر ریزنمونه در محیط کشت جامد و مایع غنی شده با ۱۳ میکرمولار BA و ۵/۵ میکرومولار NAA به دست آمد. بالاترین درصد ریشه‌زایی در محیط MS 2/1 حاوی ۲ میلی‌گرم بر لیتر IBA به دست آمد (Soukhak, Khalighi, and Ghaemmaghami, 2012).

پاتیل و همکاران (۲۰۱۱) قطعات گره انار رقم Bhagava بر روی دو محیط MS و WPM کشت کردند. نتایج نشان داد که در مرحله استقرار ریزنمونه‌های گره‌ای بر روی محیط MS شامل ۱/۸ میلی‌گرم بر لیترBAP ، ۹ میلی‌گرم بر لیتر NAA، 1میلی‌گرم بر لیتر نیترات نقره و ۳۰ میلی‌گرم بر لیتر سولفات آدنین بالاترین نسبت (۱۰ تا ۱۵ شاخه به ازای هر ریزنمونه) استقرار را داشتند. در این تحقیق زنده‌مانی گیاهچه‌های به دست آمده از محیط MS بیشتر از محیط WPMبود. ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر NAA و IBA در هر دو محیط کشت واکنش مشابهی برای ریشه‌دهی را نشان دادند، هرچند تشکیل ریشه‌های ضخیم‌تر در محیط کشت حاوی ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر IBA مشاهده شد .(Patil *et al*, 2011)

سینگ و همکاران (۲۰۱۴) برای کشت بافت انار از محیط کشت MS استفاده کردند. در این آزمایش برای مرحله استقرار از تنظیم کننده‌های رشد BAP با غلظت‌های ۰/۲ تا ۲ میلی‌گرم در لیتر، NAA با غلظت‌های ۰/۱ تا ۱ میلی‌گرم در لیتر، BAP با غلظت‌های ۰/۱ تا۰/۵ میلی‌گرم در لیتر، NAA با غلظت‌های ۰/۱ تا ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر استفاده شد. برای

IrHC2019

مرحله ریشه‌دهی از دو اکسین متفاوت (5/0 IBA و ۰/۲۵ میلی‌گرم در لیتر) و (5/0 NAA و ۰/۲۵ میلی‌گرم در لیتر) در محیط کشت MS استفاده شد. محیط کشت MS حاوی غلظت ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA ۹۷ % و غلظت ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر IBA ۹۵% ریشه‌دهی را داشتند. هر دو نوع اکسین پاسخ مشابهی برای ریشه‌دهی داشتند. در مرحله باززایی شاخه بالاترین پاسخ رشدی (۹۸٪) در محیط کشت MS حاوی ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP و هم چنین محیط کشتMS حاوی ۰/۹ میلی گرم در لیتر NAA مشاهده شد (Singh *et al.*, 2014).

مواد و روش‌ها

جوانه‌های رویشی شاخه‌های فصل جاری انار رقم‌های 'ملس ساوه' 'شیشه کپ' از مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی استان خراسان رضوی، شهر کاشمر جمع‌آوری و سریعاً در شرایط خنک به آزمایشگاه کشت بافت، پژوهشکده علوم گیاهی دانشگاه فردوسی مشهد منتقل شدند. جوانه‌ها بعداز ضدعفونی سطحی با اتانول ۷۰ درصد برای یک دقیقه و هیپوکلریت سدیم ((NaClO) ۲/۵درصد برای ۲۰ دقیقه سه بار با آب مقطر استریل شستشو داده شدند و در محیط کشت MS حاوی غلظت‌های مختلف تنظیم کننده‌های رشد مستقر شدند. شاخه‌های جدید رشد یافته از جوانه‌های فعال شده بعد از ۴ هفته به محیط کشت MS حاوی هورمون BAP در غلظت‌های ۰/۵، ۱، ۲ و ۴ میلی‌گرم بر لیتر و در ترکیب با IBA در غلظت‌های ۰/۵، ۱، ۲ و ۴ میلی‌گرم بر لیتر منتقل شدند. ریزنمونه‌های کشت شده به اتاقک رشد منتقل گردیدند. شاخه‌های درون‌شیشه‌ای پرآوری شده (بزرگتر از ۳ سانتیمیتر) برای آزمایش ریشه‌دهی مورد استفاده قرار گرفتند. غلظت‌ها و ترکیبات مختلف از دو اکسین IBA و NAA مورد بررسی قرار گرفت. تیمارها شامل غلظت‌های ۰/۳، ۰/۶ و ۰/۹ میلی‌گرم بر لیتر از IBA و یا NAA بود. در تمامی آزمایشات pH محیط کشت قبل از اضافه کردن آگار (۸ گرم بر لیتر) در حدود ۵/۷±۰/۱ تنظیم شد. ساکارز (Merck, CAS 57-50-1) به مقدار ۳۰ گرم بر لیتر استفاده گردید.

شرایط اتاقک رشد ۲۴±۲ درجه سانتیگراد و ۱۶/۸ ساعت تاریکی/روشنایی در شدت نور ۴۰ میکرومول برمترمربع بر ثانیه تامین شده توسط لامپ‌های فلورسنت سفید بود.

تعداد شاخه پرآوری‌شده و طول آن‌ها، تعداد برگ، نکروزه شدن نوک شاخه و درصد ریشه‌دهی برای آزمایش ریشه‌زایی بعد از ۴ هفته از شروع هر آزمایش ثبت گردید. آزمایشات در قالب طرح کاملاً تصادفی (CRD) با پنج تکرار به اجرا در آمد. از نرم افزار (SAS) برای آنالیز آماری ا ستفاده گردید و میانگین‌ها با ا ستفاده از آزمون LSD در سطح احتمال ۵ درصد مقایسه شدند.

نتایج و بحث

نتایج تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که اثر تیمار ضدعفونی بر درصد آلودگی در سطح احتمال ۵ درصد معنی‌دار بود. هم چنین نتایج تجزیه واریانش داده‌ها نشان داد که بیشترین تعداد شاخه و بیشترین طول شاخه در تیمار یک میلی‌گرم بر لیتر بنزین آمینو پورین + ۰/۲۵ میلی‌گرم بر لیتر ایندول بوتریک اسید مشاهده شد. تعداد شاخه پرآوری شده یکی از مهم‌ترین فاکتورهای اقتصادی در ریزازدیادی است. تعداد شاخه پرآوری شده تحت تاثیر غلظت‌های مختلف لیتر بنزین آمینو پورین و ایندول بوتریک اسید قرار گرفت. غلظت زیاد بنزین آمینو پورین باعث ایجاد حالت تراکم در گیاه می‌گردد. مطالعات نشان داده است که استفاده از بنزین آمینو پورین نسبت به سایر سایتوکنین‌ها در شاخه‌زایی انار نتایج بهتری را نشان می‌دهد. Hassanen and Gabr (۲۰۱۲) بیشترین مقادیر طول شاخه پرآوری شده را در سطوح بالای BAP گزارش کردند. Haqand Kaloo (۲۰۱۰) نیز شاخه‌های پرآوری شده بلندتری را در مقادیر بالای BAP بدست آوردند.

IrHC2019

شکل ۱- *Punica granatum* در مراحل مختلف ازدیاد درون شیشه‌ای: a) پرآوری شاخه در محیط کشت MS حاوی ۱ میلی‌گرم بر لیتر BAPو ۰/۲۵ میلی‌گرم بر لیتر IBA؛ b) شاخه‌های ریشه‌دار شده در محیط کشت MS حاوی ۰/۶ میلی‌گرم بر لیتر ایندول بوتریک اسید

منابع

شاکری، منصور. و دهقانی، فرهاد. ۱۳۸۶. بررسی و مقایسه یازده رقم انار از انارهای تجاری استان یزد. پژوهش و سازندگی در زراعت و باغبانی، شماره ۷۷.

Bonyanpour, A. and Khosh-Khui, M. 2013. Callus Induction and Plant Regeneration in *Punica Granatum* L. Nana'from Leaf Explants. Journal of Central European Agriculture, 14(3).

Damiano, C., Padró, M. D. A. and Frattarelli, A. 2008. Propagation and establishment in vitro of myrtle (*Myrtus communis* L.), pomegranate (*Punica granatum* L.) and mulberry (*Morus alba* L.). Propagation of Ornamental Plants, 8(1): 3-8.

Haq Z. and Kaloo Z.A. 2010. In vitro micro propagation of "sand pear" *Pyrus pyrifolia* (Burm.f.) Nakai. Front. Agric. China, 4(3): 358–361. DOI 10.1007/s11703-010-1014-x

Hassanen S.A., and Gabr M.F. 2012. In vitro propagation of Pear *Pyrus betulaefolia* rootstock. American-Eurasian J. Agric. & Environ. Sci, 12 (4):484-489.

Kaji, B. V., Ershadi, A. and Tohidfar, M. 2013. In vitro propagation of pomegranate (*Punica granatum* l.) Cv.'Males Yazdi'. Albanian Journal of Agricultural Sciences, 1(12): 37-42.

Patil, V. M., Dhande, G., Thigale, D. M. and Rajput, J. 2011. Micropropagation of pomegranate (*Punica granatum* L.)'Bhagava'cultivar from nodal explant. African journal of Biotechnology, 10(79): 18130-18136.

Singh, N. V., Singh, S. K., Singh, A. K., Meshram, D. T., Suroshe, S. S. and Mishra, D. C. 2012. *Arbuscular mycorrhizal* fungi (AMF) induced hardening of micropropagated pomegranate (*Punica granatum* L.) plantlets. Scientia Horticulturae, 136, 122-127.

ValizadehKaji, B., Ershadi, A. and Tohidfar, M. 2013. In vitro propagation of two Iranian commercial pomegranates (*Punica granatum* L.) cvs.'Malas Saveh'and 'Yusef Khani'. Physiology and Molecular Biology of Plants, 19(4): 597-603.

IrHC2019

Optimizing Micro propagation *in vitro* culture of Pomegranate (*Punica granatum* L.)

Elham Ardakani[1]*, Gholamhossein Davari Nejad [2], Yahya selahvarzi [3], Liela Samiei[4]
[1*] Department of Horticulture, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad
[2] Department of Horticulture, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad
[3] Department of Horticulture, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad
[4] Faculty member of Research Center for Plant Sciences, Ferdowsi University of Mashhad

[*]*Corresponding Author: e.ardakani@yahoo.com*

Abstract

Punica granatum L. micro propagation by tissue culture could be considered as a method for production of steady and pathogen free plants in these species. But some factors such as lack of rooting and browning due to the present of phenol combination *in vitro* culture can limits Micro propagation efficiency. Vegetative buds were taken from current growth shoots of Pomegranate collection orchard of Agricultural and Natural Resources Research and Education Centre of Khorasan Razavi Province (Kashmar city). New shoots of active buds after 4 weeks transfer to MS media containing BAP (0.5, 1, 2 and 4 mg l-1) and IBA (0.5, 1, 2 and 4 mg l-1). Different concentrations and combinations of two auxins were used. 0.3, 0.6 and 0.9 mg l-1 of IBA or NAA. Data of all experiments were analyzed according by completely randomized design (CRD) with 5 replications. SAS (v. 9.1) was used for analysis and means were compared with LSD test at 5% probably level. Proliferated shoot number was affected by BAP ($p \leq 0.01$) concentrations. BAP ($p \leq 0.01$) was caused elongation of proliferated shoots. Different types of auxin and their concentrations had significantly effect on Pomegranate micro shoots rooting ($p \leq 0.05$).

***Keywords*:** propagation, *Punica granatum*, Shooting, Growth regulators.

IrHC2019