اثر اکسین و سیتوکنین بر باززایی و ریشه زایی پایه‌رویشی GF۶۷۷ در محیط‌های کشت مختلف

محمد گردکانه [۱]* هدیه بدخشان [۲] مریم محمدی [۳] عیسی ارجی [۴]

[۱] بخش تحقیقات علوم زراعی و باغی، مرکز تحقیقات، آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان کرمانشاه، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرمانشاه، ایران.

[۲] گروه زراعت و اصلاح نباتات دانشگاه کردستان.

[۳] دانش آموخته کارشناسی ارشد گروه زراعت و اصلاح نباتات دانشگاه کردستان.

[۴] بخش تحقیقات علوم زراعی و باغی، مرکز تحقیقات، آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان کرمانشاه، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرمانشاه، ایران.

* نویسنده مسئول: mgerdakaneh@gmail.com

چکیده

در این تحقیق به‌منظور بهبود روش ریزازدیادی پایه GF۶۷۷، ریزنمونه‌های گره بر روی محیط‌های کشت MS، B_5 و WPM در حاوی تنظیم‌کننده‌های رشد بنزیل آدنین، در پنج غلظت ۰/۲۵، ۰/۵، ۱، ۲ و ۴ میلی‌گرم بر لیتر و ایندول-۳-بوتیریک اسید در چهار غلظت ۰، ۰/۱، ۰/۲۵ و ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر بررسی شد. آنالیز داده‌های صفات مختلف بر اساس مدل آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملا تصادفی تجزیه و تحلیل گردید و مقایسات میانگین داده‌ها به روش آزمون LSD در سطح احتمال ۵٪ انجام شد. نتایج نشان داد که محیط‌کشت MS، همراه با ۱ میلی‌گرم در لیتر BA و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر IBA با ۱۰۰٪ باززایی، بیشترین درصد ریزنمونه‌های باززایی، تعداد شاخساره و بلندترین طول ساقه، مناسب‌ترین محیط‌کشت در بین سایر محیط‌های کشت مورد استفاده بود . جهت ریشه زایی، شاخساره ها را به محیط کشت MS جامد همراه با IBA، در چهار غلظت ۰/۲۵، ۰/۵ ، ۱و ۲ میلی‌گرم در لیتر و BA، در چهار غلظت ۰/۰، ۰/۱، ۰/۲، و ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر منتقل شدند. بهترین ریشه‌زایی در محیط کشت MS حاوی ۱ میلی‌گرم در لیتر IBA و ۰/۵ BA حاصل شد.

کلمات کلیدی: تنظیم‌کننده‌های رشد، ریزازدیادی، شاخساره.

مقدمه

پایه رویشی دورگ هلو و بادام GF۶۷۷ به خشکی مقاوم است و بر خلاف هلو مقاومت زیادی نسبت به خاک‌های آهکی دارد ازاینرو پایه بسیار مناسبی برای درختان هلو و بادام بوده که در دنیا به طور گسترده‌ای مورد استفاده قرار می‌گیرد (Antonopoulou *et al.*, 2005). روش ازدیاد در شرایط درون شیشه‌ای برای تولید سریع پایه‌های رویشی عاری از بیماری که تکثیر آنها با روش های سنتی مشکل است، مورد استفاده قرار می گیرد (Hartmann *et al.*, 2007). با وجود مزایای فراوان کشت بافت، انتخاب محیط‌کشت، نوع و غلظت تنظیم کننده های رشد برای گونه ها و ارقام مختلف از جمله مشکلات این روش محسوب می شود (Bakhtiari *et al.*, 2017) استفاده از سیتوکنین به تنهایی یا همراه با اکسین در ریزازدیادی دورگ هلو × بادام (Bagheri *et al.*, 2017) با نتایج رضایت‌بخشی همراه بوده است. نوع محیط کشت نقش به سزایی در تکثیر درون شیشه-ای پایه درختان میوه دارد. ترکیب محیط کشت روی میزان پرآوری و ازدیاد پایه های هسته‌دارها موثر است، این تاثیر ناشی از ترکیب نمک های موجود در محیط کشت می باشد. به نظر می رسد غلظت بالای عناصر غذایی به کاررفته در محیط کشت MS مزیت این محیط‌کشت می باشد (Kose and Canli, 2015).

ریشه‌زایی شاخساره‌ها یک مرحله اجباری و تعیین کننده موفقیت تکثیر گیاهان در شرایط درون شیشه ای محسوب می شود. عدم القاء ریشه های نابجا یک عامل محدود کننده در قلمه های معمولی و شاخساره‌های حاصل از کشت بافت است. مدت مدیدی است که نقش اکسین در ریشه زایی شناخته شده و نقش مثبت این تنظیم کننده رشد بر القاء و توسعه پریموردیای ریشه به خوبی مستند است. در میان اکسین های مختلف، استفاده IBA برای تحریک ریشه زایی ریزقلمه ها به علت سمیت ضعیف و ثبات زیاد بسیارمعمول است (Hartmann *et al.*, 2007). با توجه به اینکه کارایی ازدیاد پایه

IrHC2019

رویشی GF۶۷۷ در شرایط درون شیشه ای تحت تاثیر نوع محیط کشت و تنظیم کننده‌های رشد قرار می‌گیرد. بنابراین هدف از این مطالعه، استفاده تنظیم کننده‌های رشد و محیط‌های کشت MS، WPM و B_5 برای بهینه سازی ریزازدیادی پایه GF۶۷۷ در شرایط درون شیشه ای بود.

مواد و روش‌ها

شاخه‌های سال جاری پایه GF۶۷۷ در ۱۵ اردیبهشت از باغ شهری مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع‌طبیعی استان کرمانشاه واقع در شهرستان کرمانشاه تهیه و به آزمایشگاه منتقل شدند. برای تهیه ریزنمونه، شاخه‌های جانبی جوان به طول ۱/۵ تا ۲ سانتی‌متر از شاخه‌ها جدا شد و به منظور حذف آلودگی‌های سطحی به مدت ۱۵ دقیقه در زیر جریان آب شسته شدند، سپس به‌مدت ۱۰ دقیقه نمونه‌ها را در محلول ۱/۵ درهزار قارچ‌کش بنومیل قرار داده و بعد آن‌ها را در زیر هود لامینار به مدت ۳۰ ثانیه در الکل اتیلیک ۷۰ درصد قرار داده و توسط هیپوکلرید سدیم به مدت ۱۵ دقیقه ضد عفونی شدند. جهت حذف بقایای ماده ضدعفونی کننده از سطح ریزنمونه‌ها، سه بار با آب دوبار تقطیر استریل شسته شدند.

محیط‌های کشت MS، B5 و WPM حاوی ۳ درصد ساکارز و ۰/۸ درصد آگار، همراه با تنظیم کننده های رشد BA در پنج غلظت ۰، ۰/۲۵، ۰/۵، ۱ ، ۲ و ۴ میلی‌گرم در لیتر همراه با چهار غلظت ۰ ، ۰/۱، ۰/۲۵ و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر IBA، تهیه شد. pH محیط کشت قبل از افزودن آگار به محیط‌های، توسط NaOH ۰/۱ مولار بر روی ۵/۸ تنظیم گردید.

محیط‌های کشت را به مقدار ۲۵ میلی‌لیتر در ظروف شیشه‌ای توزیع کرده و به‌مدت ۲۰ دقیقه اتوکلاو شدند. پس از سرد شدن محیط‌های کشت در هود لامینار، جوانه‌های استریل، بر روی آن‌ها کشت شدند. آزمایش با سه تکرار انجام شد و در هر ظرف سه ریزنمونه کشت شد و بلافاصله پس از بستن درب شیشه‌ها، توسط پارافیلم درب آن‌ها کاملا مسدود گردید تا در اتاقک رشد دچار آلودگی نشوند. سپس کشت‌ها در اتاقک رشد تحت شرایط ۱۶ساعت نور فلورسنت سرد و ۸ ساعت تاریکی در دمای ۲±۲۵ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. پس از ۶ هفته بعد از کشت، درصد ریزنمونه‌های باززایی شده، تعداد شاخساره‌های تولید شده، طول و قطر ساقه نمونه‌های باززایی شده اندازه‌گیری و ثبت شد.

انتقال شاخساره‌ها به محیط ریشه‌زایی

محیط‌کشت MS حاوی ۳ درصد ساکارز، ۰/۸ درصد آگار همراه با تنظیم کننده های رشد IBA در چهار غلظت ۰/۲۵، ۰/۵، ۱ و ۲ میلی گرم در لیتر همراه با چهار غلظت ۰، ۰/۱، ۰/۲ و ۰/۵ میلی گرم در لیتر BA تهیه شد. pH محیط کشت ۵/۸ تنظیم گردید. محیط‌های کشت را به مقدار ۳۰ میلی‌لیتر در ظروف شیشه‌ای توزیع کرده و به‌مدت ۲۰ دقیقه اتوکلاو شدند. پس از سرد شدن محیط‌های کشت در هود لامینار، شاخساره‌های حاصل از آزمایش اول را جدا کرده و روی این محیط قرار داده شد. سپس درصد ریشه‌زایی و تعداد ریشه تولید شده ثبت شد.

در این تحقیق داده‌های حاصل از یادداشت برداری صفات مختلف براساس مدل آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملا تصادفی، تجزیه و تحلیل گردید. مقایسات میانگین داده‌ها به روش آزمون LSD در سطح احتمـــال ۵٪ انجام شد. برای انجام تجزیه‌های آماری از نرم افزارهای MSTAT-C استفاده گردید.

درصد باززایی ریزنمونه‌ها

نتایج مقایسه میانگین‌ها نشان‌داد که ریزنمونه‌ها؛ در محیط‌کشت B5 بیشترین درصد باززایی (۱۰۰درصد) در غلظت‌های مختلف BA، همراه با غلظت کم ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر IBA حاصل شد اما در محیط‌کشت WPM در غلظت‌های مختلف سیتوکنین BA بدون اکسین IBA بیشترین درصد باززایی (۱۰۰درصد) ثبت شد و در محیط WPM با ۰/۲۵ میلی‌گرم در لیتر BA و ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر IBA کمترین درصد باززایی را داشتند. نتایج مقایسه میانگین‌ها نشان داد، تعداد زیادی از ریز-نمونه‌ها، در غلظت‌های مختلف تنظیم‌کننده‌های رشد، می‌توانند به‌صورت صددرصد باززایی نمایند، اما در کیفیت و زمان باززایی بین آن‌ها تفاوت‌های معنی‌داری وجود دارد، نتایج کلی نشان داد، نمونه‌هایی که در محیط MS و در غلظت ۱ میلی‌گرم در لیتر BA و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر IBA قرار گرفتند با سرعت و کیفیت بیشتری ۱۰۰٪ باززایی را داشتند. محیط کشت می تواند در باززایی گیاهان بسیار موثر باشد (Pilar and Marin, 2005). گزارش شده که ترکیب محیط کشت روی میزان پرآوری و

IrHC2019

ازدیاد پایه های هسته‌دارها تاثیر دارد (Andreu and Marin,2005) و ترکیب محیط کشت و غلظت نمک‌ها نقش مهمی را در ریز ازدیادی پایه گیلاس بازی می کند (Ruzic *et al.* ,2008).

تعداد شاخساره تولید شده

نتایج مقایسه میانگین‌ها نشان‌داد که حداکثر تعداد شاخساره در محیط کشت MS در ترکیب با ۱ میلی‌گرم در لیتر BA و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر IBA تولید شد (شکل ۱a) و کمترین تعداد شاخساره در محیط کشت MS همراه با ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BA و بدون استفاده از IBA حاصل شد. این مطالعه نشان داد تعداد شاخساره با افزایش غلظت BA تا غلظت مشخصی افزایش یافت. نتایج نشان داد که تعداد شاخساره در غلظت تا ۱ میلی گرم BA در لیتر به میزان ۴/۹۹ شاخساره در هر ریزنمونه افزایش یافت. به نظر می رسد که بین غلظت BA و تعداد شاخساره تا یک غلظت خاصی از BA، رابطه مثبت وجود دارد به طوری که تعداد شاخساره در غلظت ۱ میلی گرم لیتر BA به اوج خود می رسد. در غلظت های بالاتر از ۱ میلی گرم در لیتر BA، تعداد شاخساره ها کاهش می یابد. یکی از احتمالاتی که می تواند باعث کاهش تعداد شاخساره ها در غلظت بالاتر BA شود ظاهرا مقدار مشخصی از BA برای به دست آوردن بهترین اثر مورد نیاز است. غلظت های بالاتر BA سبب ایجاد مقدار زیادی کالوس می شود که در کشت بافت برای تولید شاخساره مناسب نیست. ترکیب محیط کشت و غلظت نمک‌ها نقش مهمی را در ریز ازدیادی بازی می‌کند (Ruzic et *al.*, 2008). Yadollahi و Nazarymoghaddam (۲۰۱۲) نیز برای به‌دست آوردن بیشترین تعداد شاخساره از محیط MS استفاده نمود که با نتایج این تحقیق همسو بود.

طول شاخساره

نتایج مقایسه میانگین نشان داد که بیشترین طول شاخساره‌ها در محیط‌کشت MS در ترکیب با ۱ میلی‌گرم در لیتر BA و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر IBA ثبت شد ولی در محیط‌کشت WPM، با غلظت ۰/۲۵ میلی‌گرم در لیتر BA و در محیط‌کشت B5 با ۱ میلی‌گرم در لیتر BA ، کمترین طول شاخساره حاصل شد. با توجه به این که BA باعث افزایش تقسیم سلولی می شود می توان گفت نسبت بالای BA به IBA در طویل شدن گیاهچه ها موثرتر از نسبت های کمتر این دو نوع تنظیم کننده رشد است. محیط کشت می‌تواند در رشد درون شیشه‌ای گیاهان بسیار موثر باشد (Pilar and Marin, 2005). نوع و مقدار بعضی از عناصر غذایی پر مصرف در محیط های کشت WPM ، MS و B5 متفاوت است. عناصر کم مصرفی همچون ید و کبالت و نیز نوع ویتامین‌ها نیز بین این محیط‌ها متفاوت است. این تفاوت‌ها در زرد شدن گیاهچه‌ها موثر بوده است. به نظر می‌رسد پایه مورد مطالعه مورد مطالعه نیاز غذایی خاصی دارد، به طوری که به کمبود عناصر غذایی و نوع و مقدار آن ها حساس است.

قطر شاخساره

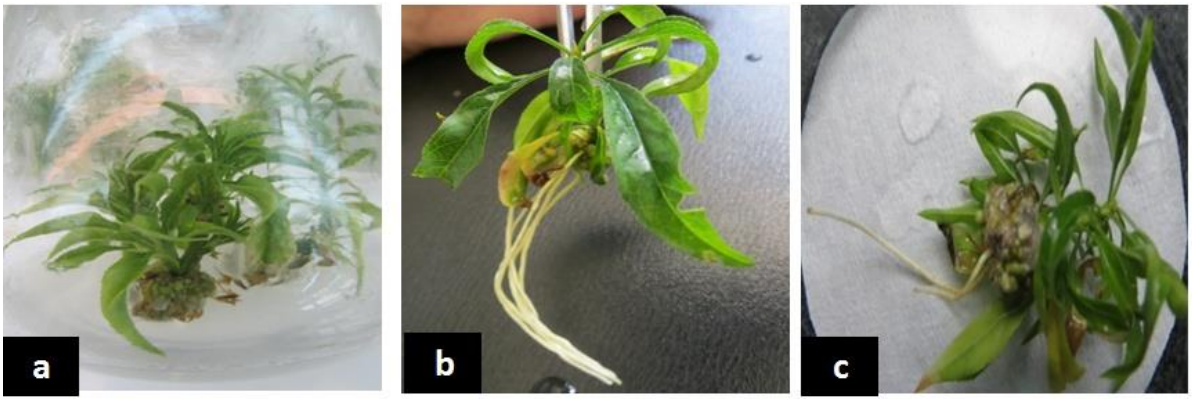
نتایج مقایسه میانگین‌ها نشان‌داد که شاخساره ها در محیط‌کشت MS همراه با ۱ میلی‌گرم در لیتر BA و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر IBA بیشترین قطر را داشتند و شاخساره ها در محیط WPM با ترکیب هورمونی، BA با غلظت ۱ میلی‌گرم در لیتر و IBA با غلظت ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر کمترین قطر شاخساره را به خود اختصاص دادند. نتایج نشان داد، نوع محیط‌کشت و ترکیبات هورمونی، بر افزایش قطر شاخساره های تولید شده مؤثرمی‌باشند. به نظر می رسد با تغییر غلظت عناصر در محیط های کشت، نتایج بهتری حاصل می‌شود. محیط کشت WPM دارای سطح بالاتری از کلرید است که به علت مهار جذب مواد غذایی، انتقال و استفاده از مواد مغذی منجر به رشد ضعیف گیاه می‌شود (Karimi *et al.*, 2005). علاوه بر این، کمبود منیزیم مشاهده شده در شاخساره ها به علت مقدارکلرید بالاتر و در اثر پتانسیل اسمزی پایین محیط کشت WPM است.

درصد ریشه‌زایی

نتایج تجزیه واریانس نشان می‌دهد که اثر فاکتورهای اصلی، تنظیم‌کننده‌های رشد، اکسین (IBA) و سیتوکنین (BA) و اثر متقابل بین آنها روی همه صفات ریشه‌زایی در سطح یک درصد معنی‌داری شد. نتایج مقایسه میانگین‌ها نشان‌داد، در محیط کشت با ترکیب هورمونی ۱ میلی‌گرم در لیتر IBA و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BA بیشترین درصد ریشه‌زایی مشاهده شد (شکل ۱b). تیمار اکسین یکی از عوامل مهمی است که توجه پژوهشگران را برای ریشه زایی شاخساره ا به خود جلب نموده است و مدت مدیدی است که نقش آن در ریشه زایی شناخته شده است و نقش مثبت اکسین ها بر القاء و توسعه پریموردیای

IrHC2019

ریشه به خوبی مستند است. در میان اکسین های مختلف، استفاده IBA برای تحریک ریشه زایی ریزقلمه ها به علت سمیت ضعیف و ثبات زیاد بسیارمعمول است (Hartmann *et al.*, 2007).



شکل- ۱- تأثیر محیط کشت MS و تنظیم کننده‌های رشد بر تعداد شاخساره و ریشه زایی GF۶۷۷؛ a) محیط کشت MS حاوی ۱ میلی‌گرم در لیتر BA و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر IBA بر تعداد شاخساره GF۶۷۷. b) محیط کشت MS همراه با ۱ میلی‌گرم در لیتر BA و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر IBA. بر ریشه زایی c) محیط کشت MS در ترکیب با ۱ میلی‌گرم در لیتر IBA بر ریشه زایی.

منابع

Antonopoulou, C., Dimassi, K., Therios, I., Chatzissavvidis, C., and Tsirakoglou, V. 2005. Inhibitory effects of riboflavin (Vitamin B2) on the in vitro rooting and nutrient concentration of explants of peach rootstock GF-677. Sci Hortic., 106, 268–272.

Andreu, P., and Marin, J.A. 2005. *In vitro* culture establishment and multiplication of the prunus rootstock Adesoto 101 (*P. insititia* L.) as affected by the type of propagation of the donor plant and by the culture medium composition. Scientia Horticulturae 106: 258-267.

Bakhtiari, F., Mozafari, J., and Abdollahi, H. 2017. A study on growth, propagation and rooting of Iranian native pears for developing *in vitro* conservation system. Journal of Agricultural Biotechnology, 8(4): 17-34.

Bagheri, S., Davoodi, D., Amiri, M.E., Bayanati, M. and Entesari, M. 2017. Effect of different culture media on the micropropagation of GF677. Journal of horticulture science (Agricultural sciences and technology) 30(4): 616 - 623.

Hartmann, H.T., Kester, D.E., Davies, Jr.F.T. and Geneve, R.L. 2007. Plant Hormones. In: Plant Propagation: Principle and Practices. 7th edition, Prentice-Hall, New Delhi: 292-320.

Karimi, G., Ghorbanli, M., Heidari, H., Khavari-Nejad, R.A. and Assareh, M.H. 2005. The effects of NaCl on growth, water relations, osmolytes and ion content in Kochia prostrata. Biologia Plantarum, 49(2): 301-304.

Kose, S. and Canli, F.A. 2015. In vitro propagation and rooting of ‘Garnem’ (P. persica × P. dulcis) rootstock. Plant Mol. Bio. Biotech. 5(1):25-30

Nazarymoghaddam, R. and Yadollahi, A. 2012. Micropropagation of GF 677 Rootstock. Journal of Agricultural Science; 4 (5): 131-138.

Pilar, A. and Marin, J.A. 2005. *In vitro* culture establishment and multiplication of the Prunus rootstock ‘Adesoto 101’ (*P. insititia* L.) as affected by the type of propagation of the donor plant and by the culture medium composition. Scientia Horticulturae 106: 258-267.

Ruzic, D.j.V. and Vujovic, T.I. 2008. The effect of cytokinin types and their concentration on *in vitro*, multiplication of sweet cherry cv. Hort. Sci. 35: 12-21.

IrHC2019

Effect of auxin and cytokinin on regeneration and rooting of GF677 under different media

Mohammad Gerdakaneh [*1] Hedieh Badakhshan [2] Maryam Mohammadi [3] Issa Arji [4]
[1] Crops and Horticultural Science Research Department, Kermanshah Agricultural and Natural Resources Research and Education Center, AREEO, Kermanshah, Iran
[2] Department of Agronomy and Plant Breeding, Kurdistan University
[3] Graduated from the Department of Agronomy and Plant Breeding, Kurdistan University
[4] Crops and Horticultural Science Research Department, Kermanshah Agricultural and Natural Resources Research and Education Center, AREEO, Kermanshah, Iran
**Corresponding author: mgerdakaneh@gmail.com*

Abstract
This experiment was conducted during 2015 at the laboratory of plant tissue culture "Agricultural and Natural Resources Research Center of Kermanshah" using a factorial in a completely randomized design with three replication. Sterile nodal explants were cultured onto different media of in MS, WPM and B5 supplemented with benzyl adenine at concentrations of 0.25, 0.5, 1, 2 and 4 mg/L and indole-3-butyric acid at concentrations of 0, 0.1, 0.25 and 0.5 mg/L. Elongated shoots of GF-677 were cultured on MS medium supplemented with 0.25, 0.5, 1.0 and 2.0 mg/l IBA and 0.0, 0.1, 0.2 and 0.5 mg/l BA for rooting. Factorial analysis of variance was carried out and differences between means were scored with LSD tests. Effect of different culture media (MS, B5 and WPM) and plant growth regulators (BA and IBA) on number of shoots per proliferated explant of GF677 proved the highest rate of adventitious shoot initiation, percent of regeneration (100%), shoot length and diameter was obtained in MS medium containing 1 mg/l BA + 0.5 mg/l IBA. Results of this experiment confirmed, the highest rate of rooting (33%) and the number of roots per shootlet (1.62) were obtained on MS medium containing 1.0 mg/l IBA and 0.5 mg/l BA.
Key words: Growth regulator, Micropropagation, Vegetative rootstock.

IrHC2019