# تاثیر غلظت‌های مختلف تنظیم‌کننده‌های رشد بر ریزازدیادی پایه‌رویشی GF۶۷۷ درمحیط کشت مایع

**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 ریزنمونه های گره گندزدایی شده در محیط‌کشت‌های MS، $B_5$ و WPM در حالت مایع در ترکیب با هورمون‌های BA (بنزیل آدنین)، در پنج غلظت ۰/۲۵، ۰/۵، ۱، ۲ و ۴ میلی‌گرم بر لیتر و IBA (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 روش آماری 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 در محیط مایع حداکثر درصد بازایی، تعداد شاخساره (۲/۴۴ شاخساره) درمحیط WPM با غلظت ۱ میلی‌گرم در لیتر BA و بیشترین طول شاخساره ها با ۱ میلی‌گرم در لیتر BA و ۰/۲۵ میلی‌گرم در لیتر IBA در محیط‌کشت B5 حاصل شد. جهت ریشه زایی، شاخساره ها را به محیط کشت MS جامد حاوی ۱ میلی‌گرم در لیتر IBA و ۰/۵ BA منتقل و ۳۳ درصد ریشه زایی ثبت شد.

***کلمات کلیدی:*** اکسین، باززایی، سیتوکنین.

## مقدمه

پایه رویشی GF677 که هیبریدی از هلو و بادام می‌باشد، به‌عنوان یکی از پایه‌های بسیار مناسب برای بادام و هلو در دنیا شناخته شده و مورد استفاده قرار گرفته‌است (Sepahvand *et al.*, 2012). در کشت درون شیشه ای، ترکیب محیط کشت روی رشد گیاهچه موثر است و این تاثیر در اثر ترکیب نمک های موجود در محیط کشت ایجاد می شود (Ruzic *et al.*, 2003). سیستم های کشت مایع، محیط یکنواخت تری را برای رشد فراهم می کند. ازطرف دیگر استریل نمودن محیط کشت مایع با استفاده از فیلتر به آسانی امکان پذیر است. در مقایسه با کشت های نیمه جامد، در این روش می توان از ظروف بزرگتری استفاده نمود و استفاده از کشت های مایع برای کاهش زمان و نیروی کار توصیه می شود. حرکت دائم محیط کشت در چنین سیستمی امکان بهتر رسیدن اکسیژن و مواد غذایی به بافت ها را فراهم کرده و میزان رشد و تکثیر شاخه ها در این روش به دلیل بهبود هوادهی افزایش می یابد (Afreen *et al.*, 2003). با توجه به مزایای استفاده از محیط کشت، هدف از این تحقیق مقایسه ریزازدیادی پایه هیبرید هلو – بادام GF 677، در محیط‌کشت‌های MS، $B_5$ و WPM در حالت مایع می باشد.

## مواد و روش‌ها

شاخه‌های جانبی پایه GF677 از باغ کلکسیون مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع‌طبیعی استان کرمانشاه واقع در شهرستان کرمانشاه تهیه و به آزمایشگاه منتقل شدند. برای تهیه ریزنمونه، شاخه‌های جانبی جوان به‌اندازه 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



IrHC2019

۱۰ دقیقه نمونه‌ها را در محلول ۲ 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 ۱ درصد 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. محیط های کشت MS، B5 و WPM مایع حاوی ۳ درصد ساکارز، 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 اتوکلاو کردن، 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. در نهایت، تعداد روز مورد نیاز جهت شروع باززائی ثبت گردید و پس از ۶ هفته بعد از کشت، درصد ریزنمونه‌های باززایی شده، تعداد شاخساره‌های تولید شده، طول ساقه، قطر ساقه ریز نمونه‌های باززایی شده اندازه‌گیری و ثبت شد.

برای ریشه زایی از محیط کشت MS حاوی ۱ میلی‌گرم در لیتر IBA و ۰/۵ BA حاوی ۳ درصد ساکارز، ۰/۸ درصد آگار استفاده شد. pH محیط کشت قبل از افزودن آگار و اتوکلاو کردن توسط NaOH ۰/۱ مولار بر روی 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.

## تجزیه‌های آماری

در این تحقیق داده‌های حاصل از یادداشت برداری صفات مختلف براساس روش آماری فاکتوریل در قالب طرح کاملا تصادفی در سه تکرار، 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.

## نتایج و بحث

نتایج تجزیه واریانس نشان داد که، اثر سطوح مختلف فاکتور های محیط کشت، تنظیم‌کننده‌های رشد سیتوکنین (BA) و اکسین (IBA) و اثرات متقابل دوگانه میان این فاکتورها و اثر متقابل سه‌گانه محیط BA × IBA × بر روی صفات سرعت باززایی، درصد ریزنمونه‌های باززایی شده، تعداد و طول شاخساره ریز نمونه‌های باززایی شده ، در محیط مایع معنی‌دار شد.

### سرعت باززایی

نتایج مقایسه میانگین‌ها نشان داد که سرعت باززایی ریزنمونه ها با توجه به نوع محیط کشت، نوع و غلظت تنظیم کننده های رشد مختلف متفاوت بود و تشکیل شاخساره های نابجا در ریزنمونه ها در محیط کشت مایع بین ۹ تا ۱۶ روز بعد از انتقال به محیط کشت باززایی آغاز شد. در محیط مایع، محیط کشت B5 همراه با ۴ میلی‌گرم در لیتر BA و ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر IBA و محیط کشت MS با ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BA و IBA صفر، ریزنمونه‌ها از سرعت باززایی بیشتری برخوردار بودند اما ریزنمونه‌هایی که در محیط کشت WPM با ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر IBA و ۲ میلی‌گرم در لیتر BA و در محیط کشت WPM همراه با ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر IBA و ۰/۲۵ میلی‌گرم در لیتر BA قرار داشتند، دیرتر شروع به باززایی کردند. رشد طبیعی گیاهان به مقادیر هورمونی و نوع آن‌ها بستگی دارد. هر دو هورمون اکسین و سیتوکنین در اندام‌زایی مهم هستند و به عنوان تسهیل کننده این فرایند عمل می‌کنند (Hartmann *et al.*, 2007).

### درصد باززایی ریزنمونه‌ها



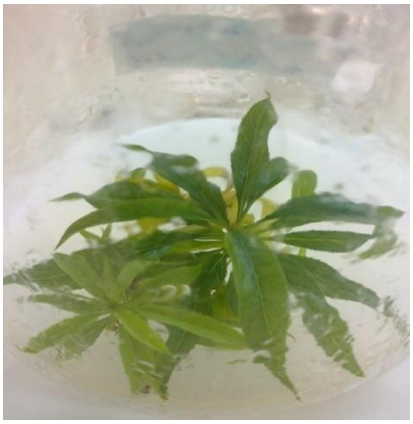
IrHC2019

نتایج مقایسه میانگین‌ها در محیط مایع نشان‌داد که تعداد زیادی از ریز نمونه‌ها، در غلظت‌های مختلف هورمونی، می‌توانند به‌صورت صددرصد باززایی نمایند، اما در کیفیت و زمان باززایی بین آن‌ها تفاوت‌های معنی‌داری وجود داشت. به طوری که الف: در محیط‌کشت MS با ۰/۵ و ۴ میلی‌گرم در لیتر BA. ب: در محیط‌کشت B5 با ۰/۲۵و ۱ میلی‌گرم در لیتر BA، ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر IBA و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BA، ۰/۲۵ میلی‌گرم در لیتر IBA و ۰/۲۵، ۰/۵و ۲ میلی‌گرم در لیتر BA و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر IBA و ۰/۲۵ میلی‌گرم در لیتر BA. ج: در محیط‌کشت WPM با ۱ و ۴ میلی‌گرم در لیتر BA، ۰/۲۵ میلی‌گرم در لیتر IBA و ۰/۲۵ میلی‌گرم در لیتر BA و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر IBA و ۲ میلی‌گرم در لیتر BA بیشترین درصد باززایی (۱۰۰درصد) و در محیط MS با ۰/۲۵ میلی‌گرم در لیتر BA کمترین درصد باززایی را داشتند. 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 ویتامین ها نیز بین این محیط ها متفاوت است. این تفاو ت ها در زرد شدن گیاهچه های موثر بوده است. به نظر می رسد پایه مورد مطالعه نیاز غذایی خاصی دارد، به طوری که به کمبود عناصر غذایی و نوع و مقدار آن ها حساس است. همچنین در محیط مایع به دلیل تماس نزدیک بافت گیاهی با محیط کشت، سرعت جذب مواد غذایی و هومون‌های گیاهی و در نتیجه سرعت باززایی گیاهچه‌های رشد یافته در سیستم مایع افزایش می یابد (Tatari *et al.*, 2012). یکی از موادی که به شدت توسط آگار جذب می‌شود سایتوکینین است بنابراین آگار می تواند جذب سایتوکینین از محیط کشت را با مشکل مواجه کند بنابراین ریزنمونه سیتوکنین را در محیط مایع بهتر جذب می کند (Amiri *et al.*, 2002). بر اساس نتایج به دست آمده ، می توان نتیجه گرفت که تفاوت تاثیر هورمون های مختلف سایتوکنین مربوط به جذب سیتوکنین، توسط سلول ها و یا مکانیسم عملکرد ترکیبات سیتوکنین‌ها باشد.

**تعداد شاخساره**

در محیط مایع حداکثر تعداد شاخساره (۲/۴۴ شاخساره) درمحیط WPM با غلظت ۱ میلی‌گرم در لیتر BA (شکل ۱) و حداقل تعداد شاخساره درمحیط MS با ۱ میلی‌گرم در لیتر BA حاصل شد (شکل ۱). با توجه به اینکه محیط کشت‌های مختلف از نظر نوع و غلظت بعضی از املاح و ترکیبات با یکدیگر متفاوت می باشند، بنابراین رشد و نمو ریز نمونه-های مستقر شده روی این محیط‌ها با یکدیگر متفاوت بوده که با شناخت این تفاوت‌ها می‌توان محیط مطلوب برای هدف مورد نظر را شناسایی کرد. این مطالعه نشان داد تعداد شاخساره با افزایش غلظت BA تا غلظت مشخصی 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 BAP، تعداد شاخساره ها کاهش می یابد. این نشان می دهد که چه زمانی است غلظت BA در مقدار بیش از حد، منجر به کاهش تعداد ساقه شد. به نظر می رسد پایه GF 677 دارای مقادیری از تنظیم کننده های رشد به صورت درون زا باشند، به طوری که کاربرد غلظت کمی از تنظیم کننده های رشد برون زا برای پرآوری آن ها کافی است. 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. سیتوکینین با تحریک فعالیت مریستیم های جانبی، منجر به تشکیل شاخساره می گردد (Dobránszki *et al.*, 2010). تأثیر سیتوکینین ها بر روی کشت های بافت یا سلول می تواند بر اساس بر نوع کشت، نوع و سن گیاه متفاوت باشد. همچنین گزارش شده است که BA در غلظت های کم از ۰،۵ تا ۲/۵ میلی گرم در لیتر مورد نیاز است (Thorpe *et al.*, 2008).

IrHC2019



شکل- ۱- تأثیر محیط کشت WPM مایع حاوی ۱ میلی‌گرم در لیتر BA بر تعداد شاخساره تولید شده GF۶۷۷

**طول شاخساره**

در محیط مایع، بیشترین طول شاخساره ها در محیط‌کشت B5 با ۱ میلی‌گرم در لیتر BA و ۰/۲۵ میلی‌گرم در لیتر IBA و کمترین طول شاخساره ها در محیط‌کشت MS و ۱ میلی‌گرم در لیتر BA حاصل شد. نتایج نشان داد، با افزایش میزان اکسین تا غلظت ۰/۲۵ میلی‌گرم در لیتر رشد طولی ساقه نیز افزایش یافت ولی غلظت های بالا اثر عکس داشت. نقش و اثر BA در شکستن غالبیت انتهایی و تحریک رشد شاخساره های جدید است، بنابراین با افزایش غلظت بنزیل آدنین در محیط شاخساره های بیشتر اما کوتاه تری تولید می شوند. (Ruzic *et al.*, 2008). هورمون اکسین موجب رشد طولی بسیار شدید سلول‌های ساقه می‌شود، اگر غلظت اکسین بیش از حد زیاد شود اثر سمی دارد (Biswas *et al.*, 2007).

**ریشه‌زایی**

برای ریشه زایی از محیط کشت MS حاوی ۱ میلی‌گرم در لیتر IBA و ۰/۵ BA حاوی ۳ درصد ساکارز، ۰/۸ درصد آگار استفاده شد و شاخساره‌های حاصل از آزمایش اول جهت ریشه زایی به این محیط منتقل شدند. سپس درصد ریشه‌زایی، ۶ هفته بعد از کشت شمارش و ثبت شد. در این محیط کشت درصد ریشه‌زایی ۳۳ درصد بود.

**منابع**

Afreen, F. 2007.Temporary immersion bioreactor. Plant Tissue Culture Engineering, 6: 87–201.

Amiri, M.E. 2002. Mass Propagation of a Unique Variety of Pear (*Pyruspyrifolia*Nak.Cv. Sebri) by shoot Tip Culture in vitro.ActaHorticulturae. 587:55-56.

Biswas, M., Islam, R. and Hossian, M. 2007. Somatic embryogenesis in strawberry (*Fragaria* sp.) Through callus culture. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 90: 40–45.

Dobránszki, J. and Teixeira da Silva, J. A. 2010. Micropropagation of apple – A review. Biotechnology Advances. 28: 462-488.

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.

Ruzic, D., Saric, M., Cerovic, R. and Culafic, L. 2003. Contents of macroelements and growth of sweet cherry rootstock *in vitro*. Biology of Plants. 47: 463-465.

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.

Sepahvand, S., Ebadi, A., Kamali, K. and Ghaemmaghami, S. A. 2012. Effects of Myo-Inositol and Thiamine on Micropropagation of GF677 (Peach × Almond Hybrid). Journal of Agricultural Science 4:275-280.

Tatari vernosafadarani, M., Mousavi, S.A. and buzarim, N. 2012. Micropropagation of some Clonal Root stocks of Stone Fruits. Seed and plant Improvement Journal. 1-28(1): 53-66 (in Persian).

Thorpe, T., Stasolla, C., Yeung, E.C., de Klerk, G.J., Roberts, A. and George, E.F. 2008. Plant Growth Regulators II: Cytokinins, their Analogues and Antagonists. In: George, E.F., Hall, M.A., De Klerk, G.J. (eds). Plant Propagation by Tissue Culture. Third Ed, Vol 1, Springer, pp. 115-173.

IrHC2019

# The effect of different concentrations of growth regulators on micropropagatin GF677 rootstock under liquid medium

Mohammad Gerdakaneh [*1] Hedieh Badakhshan [2] Maryam Mohamadi [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**
In this study, sterile nodal explants were cultured onto different media of in Murashige and SKoog (MS), Woody plant medium (WPM) and Gamborg (B5) supplemented with various concentrations of 6-benzylaminon purine Factorial analysis of variance was carried out and differences between means were scored with LSD tests. For this purpose, sterile nodal sections were cultured onto different media of MS, B5 and WPM in solid status supplemented with BA (*benzyl adenine*) at concentrations of 0.25, 0.5, 1, 2 and 4 mg/L and IBA (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. Effect of different culture media (MS, B5 and WPM) and growth regulators (BA and IBA) on number of shoots per proliferated explant of GF-677 showed that the maximum number of shoots (2.44 shoots) was obtained in WPM medium at a concentration of 1 mg / l BA and the highest shoot length was obtained with 1 mg / l BA and 0.25 mg / l IBA in medium B5. On MS medium containing 1.0 mg/L IBA and 0.5 mg/l BA, a maximum rooting efficiency was obtained.
***Key words:*** Auxin, cytokinin, regeneration.

IrHC2019