بررسی اثر نوع ریز نمونه، محیط کشت و تیمارهای هورمونی در استقرار و پرآوری ریزنمونه های رقم نطنز گلابی در شرایط درون شیشه

صفیه وطن دوست جرتوده (۱)، غلامحسین داوری نژاد (۲)، علی تهرانی فر (۲)، حامد کاوه (۱)
۱-دانشجوی دکتری علوم باغبانی دانشگاه فردوسی مشهد، ۲- دانشیار گروه علوم باغبانی دانشگاه فردوسی مشهد

به منظور بررسی اثر نوع ریز نمونه، محیط کشت و تیمارهای هورمونی بر استقرار و پرآوری رقم نطنز گلابی در شرایط درون شیشه، آزمایشی بصورت فاکتوریل در قالب طرح کاملا تصادفی با ۱۰ تکرار انجام شد. جوانه های جانبی در دو حالت راکد و متورم با استفاده از تیمار الکل ۷۰ درصد بمدت ۳۰ ثانیه و تیمار هیپوکلریت سدیم ۱/۵ ٪ بمدت ۱۵ دقیقه ضدعفونی شدند. برای استقرار نمونه ها از محیط کشت های MS و WPM استفاده گردید.تیمار های هورمونی مورد استفاده شامل هورمون بنزیل آدنین در ٤ سطح صفر، ۱ ، ۱/۵ و ۲ میلی گرم در لیتر و همچنین ترکیب ایندول بوتریک اسید به غلظت ۱ میلی گرم در لیتر با ۲ میلی گرم در لیتر بنزیل آدنین بود. در مرحله استقرار مشخص شد که استفاده از جوانه های متورم بعنوان ریز نمونه بهتر است. محیط کشت MS به WPM برتری داشت و بهترین تیمار هورمونی تیمار۲ میلی گرم در لیتر BA + ۱ میلی گرم در لیتر IBA بود. در مرحله پرآوری مشخص شد که نوع محیط کشت تاثیری در میزان پرآوری ریزنمونه ها ندارد. در بین تیمار های انجام شده، بین غلظت های ۱ و ۱.۵ میلی گرم در لیتر بنزیل آدنین در تعداد شاخساره های ایجاد شده از هر ریزنمونه از نظر آماری تفاوت معنی داری وجود نداشت. در غلظت ۳ میلی گرم در لیترBA تعداد شاخساره ی ایجاد شده از هر ریزنمونه بطور معنی داری بیشتر بود.

کلمات کلیدی: ریز ازدیادی، بنزیل آدنین، ایندول بوتیریک اسید، محیط کشت MS، محیط کشت WPM

مقدمه:

گلابی *Pyrus spp.* از خانواده Rosaceae و زیر تیره *Pomoidae*، یکی از مهمترین میوه های مناطق معتدله است که از ارزش اقتصادی بالایی در ایران برخوردار است. بسیاری از باغ های گلابی ایران در تهران(کرج)، خراسان، اصفهان، آذربایجان شرقی و غربی و قزوین می باشد (ارزانی،۲۰۰۲). در حال حاضر رایج ترین روش ازدیاد گلابی در ایران پیوند ارقام مختلف برروی پایه های بذری گلابی است که از سالها پیش مرسوم بوده است. در چند دهه اخیر پیوند گلابی روی کوئینزA نیز رواج یافته است. اگرچه این روش در سطح وسیعی مورد استفاده قرار می گیرد، به علت حساسیت این پایه به خاکهای قلیایی و عدم استقرار مناسب مشکلات زیادی را برای باغداران و تولید کنندگان نهال ایجاد می کند. علاوه بر آن اکثر ارقام گلابی برروی پایه های کوئینز ناسازگاری نشان می دهند. بکارگیری سایر روش های ازدیاد غیر جنسی با هدف تولید درختان برروی ریشه خودشان[۲۵] (خود ریشه) می تواند راه حل مناسبی برای رفع این مشکلات باشد (داوری نژاد و همکاران، ۲۰۰۸). کشت بافت، امروزه در بسیاری از کشورها مورد توجه محققین است و یک روش نسبتا جدید در زمینه تولید تعداد زیادی گیاه از یک سلول ، بافت و یا اندام گیاهی است. ریزازدیادی به طور موفقیت آمیزی در مورد گلابی آسیایی در سال ۲۰۰۸ گزارش شد. براساس نتایج حاصل از این آزمایش ازدیاد درون شیشه ای در محیط کشت MS دارای ۱/۵ میلیگرم در لیتر بنزیل آدنین و ۰/۰۱ میلیگرم در لیتر نفتالن استیک اسید بهترین نتیجه را داد و ریشه زایی با افزودن ۱ میلی گرم در لیتر ایندول بوتریک اسید به محیط کشت به طور معنی داری افزایش یافت (تاکور،۲۰۰۸). جداکشت های OHF 51 و BA 29 و پایه های بذری پس از ۳ هفته از محیط پرآوری به محیط ریشه زایی منتقل شدند؛ غلظت کمتر عناصر اصلی در محیط کشت WPM

[25] -Own root

[٢٦] (لوید و مک کاون،١٩٨٠) نسبت به غلظت های بالاتر نمکها در محیط MS برای پایه های OHF مناسبتر بود. غلظت پایین اکسین (٠/٠٥میلیگرم در لیتر IAA) و (٠/٥میلیگرم در لیتر BA) برای پرآوری شاخساره ها از غلظت های بیشتر، موثرتر بود(نادوسی،١٩٩٧).

مواد و روش‌ها:

تهیه و آماده سازی ریز نمونه ها: بمنظور تهیه ریزنمونه، شاخه هایی بطول ٢٠ سانتی متراز قسمت های بیرونی تاج درختان نطنز در فصول مختلف سال (کل بهار و تابستان، اواخر زمستان) انتخاب گردید. پس از انتقال به آزمایشگاه شست و شوی سطحی آن ها انجام و سپس ریزنمونه از آنها تهیه گردید.ریز نمونه های مورد استفاده در این آزمایش شامل جوانه جانبی در دو حالت جوانه راکد و جوانه متورم (درمرحله Green tip) بود. بمنظور انجام ضدعفونی، ریزنمونه ها شست و شو شده و سپس بمدت ٣٠ دقیقه در زیر آب روان قرار گرفتند، سپس با الکل ٧٠ درصد به مدت٣٠ ثانیه تیمار شدند. برای کنترل آلودگی های قارچی از هیپوکلریت سدیم با غلظت ١.٥ درصد دارای ٠.١ ٪ توین٢٠ بمدت ١٥ دقیقه استفاده شد. برای استقرار نمونه ها از محیط کشت های MS (موراشی و اسکوگ، ١٩٦٢) دارای ٣٠ گرم در لیتر ساکاروز و ٨ گرم در لیتر آگار و WPM (لوید و مک کاون، ١٩٨٠) دارای٢٠ گرم در لیتر ساکاروز و ٨ گرم در لیتر آگار استفاده گردید. تیمار های هورمونی مورد استفاده شامل هورمون بنزیل آدنین در ٤ سطح صفر، ١ ، ١.٥ و ٢ میلی گرم در لیتر و همچنین ترکیب ایندول بوتریک اسید به غلظت ١ میلی گرم در لیتر با ٢ میلی گرم در لیتر بنزیل آدنین بود. pH محیط کشت حدود ٥/٧ تنظیم و سپس ٢٠ میلی لیتر از محیط کشت درون ویال های ١٠٠ میلی لیتری ریخته شده و بمدت ٢٠ دقیقه در دمای ١٢١ درجه سانتیگراد اتوکلاو شدند. پس از کشت، ویال ها به اتاق رشد با دمای ٢٢-٢٤ درجه سانتیگراد و فتوپریود ١٦/٨ و شدت نور ٤٠ میکرو مول بر متر بر ثانیه منتقل شدند. در این مرحله تعداد جوانه های رشد کرده پس از چهار هفته (زمان متوسط برای انجام زیر کشت) مورد بررسی قرار گرفت. بمنظور پرآوری شاخساره های تشکیل شده، آنها را به قطعات ١ سانتی متری دارای یک جوانه تقسیم کرده و درون محیط کشت MS و WPM دارای هورمون BA به غلظت های ١، ١/٥، ٢ و ٣ میلی گرم در لیتر کشت شدند. پس از گذشت ١ ماه شاخساره ها زیرکشت داده شدند. این مرحله بصورت فاکتوریل در قالب طرح کاملا تصادفی با ١٠ تکرارانجام شد. هر تکرار شامل ١ ویال بود و درون هر ویال یک ریزنمونه قرار داشت.

نتایج و بحث:

بر اساس نتایج حاصل از تجزیه واریانس داده مشخص گردید که مرحله رشد جوانه در سطح احتمال ١٪ تاثیر معنی داری را در سرعت و درصد استقرار ریز نمونه ها در محیط کشت دارد. در جوانه های متورم درصد استقرار بیشتر بود(P≤١٪). همچنین بین دو محیط کشت MS و WPM در سطح احتمال ٥٪ تفاوت معنی دار دیده شد و محیط کشت MS نسبت به WPM برتری داشت. در محیط کشت MS در حالتی که از جوانه های راکد استفاده شد تمامی تیمار ها بطور معنی داری باعث افزایش درصد جوانه های رشد کرده نسبت به شاهد شدند (P≤١٪).در بین تیمارهای بکار رفته تیمار ١و ١/٥ میلی گرم در لیتر BA از نظر آماری تفاوت معنی داری با هم نداشتند و ٣٢٪ جوانه های کشت شده با این تیمارها در محیط کشت MS رشد کردند. تمامی تیمار ها بطور معنی داری باعث افزایش درصد جوانه های رشد کرده نسبت به شاهد شدند (P≤١٪). بیشترین درصد جوانه های استقرار یافته در تیمار٢ میلی گرم در لیتر BA +١ میلی گرم در لیتر IBA به دست آمد که ٥٠٪ بود. تیمار ٢ میلی گرم در لیتر نسبت به شاهد برتری داشت ولی نسبت به سایر تیمار ها کمتر موثر بود. بر اساس نتایج این آزمایش مشخص شد که ترکیب BA با IBA بسیار موثرتر از کاربرد بنزیل آدنین می باشد که این موضوع توسط پارولی در

[26] -Woody plant medium

سال ١٩٨٤ بیان شده است. در حالتی که از جوانه های متورم بعنوان ریزنمونه استفاده شد در محیط کشت MS ، بهترین تیمار ٢ میلی گرم در لیترBA +١ میلی گرم در لیتر IBA بود که ٨٣٪ ریزنمونه ها جوانه زدند و مستقر شدند. در بین تیمارهای بکار رفته تیمار ١و ١.٥ میلی گرم در لیتر BA از نظر آماری تفاوت معنی داری با هم نداشتند ولی نسبت به تیمار درصد استقرار را بالاتر بردند. در محیط کشت WPM و در حالتی که از جوانه های راکد بعنوان ریز نمونه استفاده شد، مشابه موارد قبل بهترین تیمار ٢میلی گرم در لیترBA +١ میلی گرم در لیتر IBA بود که با آن حدود ٤٦٪ جوانه های کشت شده مستقر شدند. در این محیط کشت درصد استقرار جوانه ها در شاهد بسیار پایین و حدود ٣٪ بود. در حالتی که از جوانه های متورم استفاده شد درصد استقرار بطور معنی داری نسبت به حالت قبل بالاتر بود و در تیمار ٢ میلی گرم در لیترBA +١ میلی گرم در لیتر IBA بیشترین درصد استقرار بدست آمد که حدود ٧٦٪ بود. براساس نتایج حاصل از تجزیه واریانس داده ها مشخص گردید که نوع محیط کشت تاثیری در میزان پرآوری (تعداد شاخساره های ایجاد شده از هر جوانه) رقم نطنز ندارند در حالی که تیمار های هورمونی بطور معنی داری باعث بهبود میزان پرآوری می شوند (P≤٪١). در بین تیمار های انجام شده، بین غلظت های ١ و ١/٥ میلی گرم در لیتر بنزیل آدنین در تعداد شاخساره های ایجاد شده از هر ریزنمونه از نظر آماری تفاوت معنی داری وجود نداشت. در غلظت ٣ میلی گرم در لیترBA تعداد شاخساره ی ایجاد شده از هر ریزنمونه بطور معنی داری بیشتر و برابر ٢/٥ شاخساره از هر ریزنمونه بود، ولی از نظر آماری تفاوت معنی داری با تیمار ٢ میلی گرم در لیترBA نداشت. در محیط کشت WPM ، تعداد شاخساره ی ایجاد شده از هر ریزنمونه مشابه با محیط کشت MS بود با این تفاوت که بیشترین تعداد شاخساره در تیمار ٢ میلی گرم در لیتر BA بدست آمد ولی از نظر آماری تفاوتی با تیمار ٣ میلی گرم در لیترBA نداشت. بین دو تیمار ١ و ١.٥ میلی گرم در لیتر BA نیز از نظر آماری تفاوت معنی داری مشاهده نشد.

منابع:

Arzani, K . 2002 .Introduction of some Asian pear(pyrus serotina Rehd.) cultivars. Acta Hort, 587:International symposium of asian pear.

Davarynejad, G.H., Shahriari,F and Hassanpour,H. 2008 .Identification of graft incompatibility of pear cultivars on Quince rootstock by using Isozymes banding pattern and starch. Asian Jornal of Plant Science,7(1):109-112.

Nadosy,F. 1997. Micropropagation of pear rootstocks. Hort.Science, v. 29(2) p. 17-21.

Takur, A., Kanwar, J.S. 2008. Micropropagation of 'Wild pear' *Pyrus pyrifolia* (Burm F.) Nakai. II. Induction of Rooting. Not. Bot. Hort. Agrobot. Cluj 36 (2):104-111 .