تولید گیاهان درون شیشه ای پایه GF677

اشرف السادات مرکفشی (۱)، علیرضا مطلبی آذر (۱)، جعفر حاجی لو (۱)، جلیل دژم پور(۲)، امیر کهنمویی (۱) و ناصر مهنا (۱)

۱- گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی دانشگاه تبریز، ۲- مرکز تحقیقات کشاورزی آذربایجان شرقی

چکیده

در بهمن ماه سال ۸٦ سرشاخه‌های جوان پایه‌های GF677 پس از استریل بصورت قلمه های تک جوانه روی محیط کشت استقرار (WPM همراه با ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP و ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر IBA) کشت شدند و پس از یک ماه، ٦٤ درصد ریزنمونه‌های کشت شده دارای شاخه‌های بیشتر از ۱/۵ سانتی‌متر با ٤/٤ برگ بودند. همچنین کشت تیر ماه قلمه های تک جوانه در محیط کشت حاوی غلظتهای مختلف BAP انجام شد و هر چند که درصد آلودگی در این نمونه ها بالا بود، با این حال در نمونه های غیر آلوده، جوانه های جانبی رشد کرده و حداکثر استقرار و رشد در محیط کشت حاوی ۰/۵ میلی گرم در لیتر BAP حاصل شد. نتایج آزمایش‌های بهینه سازی محیط کشت نگهداری، نشان داد که محیط کشت حاوی ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP، ٤ میلی‌گرم در لیتر GA_3 و ۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر کازئین هیدرولیز شده برای رشد و پرآوری شاخساره های حاوی بافت مادری یا بدون بافت مادری بهینه می باشد. با انجام بازکشت‌های ماهانه تعداد زیادی گیاه درون شیشه ای حاصل شد.

مقدمه

پایه GF677 هیبرید طبیعی بین بادام (*Prunus amygdalus* Batsch) و هلو (*P. persica* (L.) Batsch) بوده و مقاوم به انواع بیماری و نماتد بوده و متحمل به کمبود آهن می‌باشد (آنتونوپولو و همکاران، ۲۰۰۵). امروزه استفاده از فن‌آوری زیستی، تولید ژنوتیپ‌های جدید را سرعت بخشیده و باعث وسیع شدن خزانه ژنی قابل دسترس برای اصلاح پایه‌های درختان میوه گردیده است (آینسلی و همکاران، b ۲۰۰۱) و باززایی موثر از بافتهای بالغ پیش نیازی برای کاربرد تکنیک‌های انتقال ژن می باشد (لیتزوگرای، ۱۹۹۲). در این راستا به منظور فراهم آوردن ریز نمونه های استریل لازم است تا گیاهان درون شیشه ای، به تعداد زیاد، تولید شود. کشت درون شیشه‌ای پایهGF677 توسط کستر (۱۹۷۰)، دیماسی (۱۹۸۹)، زیمرمن (۱۹۹۱) و مولاسیوتیس و همکاران (۲۰۰۳) انجام شده است دادند. با این حال دیماسی (۱۹۹۵) خاطر نشان کرد که گیاهان درون شیشه ای از لحاظ رشد و تکثیر مشکل داشته و می‌توان از طریق بهینه کردن ترکیبات محیط کشت بر این مشکل فائق آمد. لذا در این تحقیق مراحل تولید گیاهان درون شیشه ای با استفاده از محیط های کشت، بهینه سازی شده است.

مواد و روش‌ها

در بهمن ماه سال ۸٦ سرشاخه‌های جوان پایه‌های GF677 پس از استریل بصورت قلمه های تک جوانه روی محیط کشت استقرار (WPM با ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر BAP همراه با ۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر IBA) کشت گردید همچنین در تیر ماه سال ۸۷ قلمه های تک جوانه روی محیط کشت حاوی غلظتهای مختلف BAP کشت گردید. پس از سپری شدن یک ماه از کشت، درصد ریز نمونه‌های جوانه زده، شاخص رشد و نیز تعداد برگ اندازه‌گیری شد. برای مرحله نگهداری از محیط‌های کشت WPM با نصف مقدار کلسیم (به منظور کاهش زرد شدگی برگها)، MS ۱/۲ با نصف غلظت کلسیم و غلظت کامل آهن و در

نهایت از محیط کشت AP استفاده شد. همچنین در باز کشت اول از جوانه جانبی با بافت مادری و بدون بافت مادری استفاده شد و در این مرحله نیز تعداد برگ تولیدی و شاخص رشد اندازه‌گیری شد.

نتایج و بحث

در نمونه های بهمن ماه، ۱۰ روز پس از کشت قلمه های تک جوانه، فقط ۵/۵ درصد از کل ریز نمونه‌ها آلوده شدند، همچنین قهوه‌ای شدن جوانه‌های جانبی مشاهده نشد. پس از یک ماه ٦٤ درصد ریز نمونه‌های کشت شده، شاخه‌های بیش از ۱/۵ سانتی‌متر را تولید کردند. تعداد برگ تولیدی از ۱ تا ۷ برگ متغیر بود و بطور متوسط ٤/٤ برگ در محیط کشت استقرار تولید شد. کمالی و همکاران (۲۰۰٦) از محیط کشت Knop حاوی NAA و BAP، ایمانی و عبدالهی (۲۰۰٦) از محیط کشت MS حاوی BAP و NAA جهت استقرار نمونه های دورگه های هلو × بادام، استفاده کردند. در نمونه های تیر ماه، درصد آلودگی بالا بود ولی قهوه‌ای شدن جوانه‌های جانبی مشاهده نشد. نتایج تجزیه واریانس نشان داد که غلظت ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر BAP برای استقرار نمونه ها مناسب می باشد. انتقال شاخساره های جدید تولید شده در مرحله استقرار، به همان محیط کشت پایه (WPM) و همان غلظتهای هورمونی باعث رشد کند آنها و نهایتاً منجر به زرد شدن برگها گردید و باز کشت زود هنگام هم نتوانست این مشکل را حل کند. بنابراین گیاهچه های درون شیشه ای به محیط کشت WPM با نصف غلظت کلسیم (به منظور کاهش زرد شدگی برگها) باز کشت شدند. بهبودی نسبی حاصل شد ولی مشکل زردگی همچنان باقی ماند. سپس شاخه های سالم به محیط کشت1/2MS با نصف مقدار کلسیم و غلظت کامل آهن باز کشت شدند که بهبود نسبی (و نه کامل) در بر طرف شدن زرد شدگی برگها حاصل شد. با این حال رشد شاخساره ها در حد مطلوب نبود. در باز کشتهای بعدی از محیط کشت AP همراه با ۲۰۰ میلی گرم در لیتر کازئین هیدرولیز شده (آینسلی و همکاران، ۲۰۰۰) (با همان ترکیبات هورمونی) استفاده شد. رشد شاخساره ها بخوبی انجام شد و مشکل زرد شدگی کاملاً بر طرف شد. از طرف دیگر در این محیط کشت نگهداری ، پرآوری شاخساره نابجا نیز مشاهده شد بطوریکه هر ریز شاخه باز کشت شده پس از یک ماه ۳ الی ۵ شاخه نابجا تولیدکرد. به نظر می رسد که اضافه کردن کازئین هیدرولیز شده همراه با تعویض محیط کشت، باعث بهبود رشد شاخساره های تولیدی شد. مقایسه شاخص رشد شاخه های باز کشت شده، با و بدون بافت مادری، به محیط کشت نگهداری حاوی ۰/۵ و ۱ میلی گرم در لیتر BAP، نشان داد که در همه کشتها رشد شاخساره اتفاق افتاده و تفاوت معنی داری بین آنها مشاهده نشد. لذا استفاده از شاخه های دارای بافت مادری و ۰/۵ میلی گرم در لیتر BAP، برای نگهداری نمونه های گیاهی مناسب تشخیص داده شد.

منابع

Ainsley, P. J., Gollins, G., and M. Sedgley. 2000. Adventitious shoot regeneration from leaf explants of almond. In vitro Cell Dev. Bio-Plant. 36: 470-474.

Ainsley, P. J., Hammerschlag, F. A., Bertozzi, T., Collins, G. G., and M. Sedgley. 2001b. Regeneration of almond from immature seed cotyledons. Plant Cell Tissue and Org. Cult. 67: 221-226.

Antonopoulou, C., Dimassi, K., Therios, I., Chatzissavvidis , C., and Tsirakoglou, V. 2005. In hibitory effects of riboflavin on thin vitro rooting and nutrient concentration of explants

Dimassi _Theriou, K. 1989. Factors affecting in vitro multiplication and rhizogenesis of the peach rootstock GF677and Petunia *(Petunia hybrida).*Aristotle University of the ssaloniki, Greece (in Greek)

Dimassi _Theriou, K. 1995. In vitro rooting of rootstock GF677 *(Prunus amygdalus ×Prunus persica)* as influenced by mineral concentration of the nutrient medium and type of culture _tube sealing material. HortSci. 70: 105-108

Imani, A., and Abdollahi , H. 2006. In vitro colonal propagation of *Prunus persica* x *Prunus amygdalus* batsch hybrid. Acta Hort. 726:179-180

Kamali, K., Majidi, E., Zarghmi , R., and Arrin, M. J. 2006 . Differences in micro propagation of vegetative root stock *(GF677)* and other Almond seed genotypes. Acta Hort. 726:192-200.

Kester , D. E. 1970. Growth in vitro of tissue of almond, almond hybrid and some other *Prunus*. Hort. Sci . 59: 349.

Litz, R. E. and D. J. Gray. 1992. Organogenesis and somatic embryogenesis. In: Hammerschlag, F. A., R. E. Litz (eds). Biotechnology of perennial fruit crops. CAB Int.

Molassiotis. A. N., Dimassi K., Theriosand, I., and Dimantidis, G. 2003. Fe_EDDHApromotes rooting of rootstock GF677 *(Prunus amygdalus × Prunus peach)* explants in vitro .Biology in Plant. 47: 141-147.

Zimmerman, R. H. 1991. Micropropagation of temperate zone fruit and crops. In: Debergh, P. C., Zimmerman,(eds). Micropropagation. The Netherlands: Kluwer Academic Publishers: 231-246.ulci Mill).

Production of in vitro plants on GF677 rootstock

A. Markafshi[1], A. Motallebi-Azar[1], J. Hajilo[1], J. Dojampour[2], A. Kahnamuei[1] and N. Mahna[1]

Abstract

Shoot tips of the rootstock GF677, in February, 2008, surface sterilized and single node cuttings were cultured on initiation culture medium (WPM contaning 0.5 mg/l BAP and 0.1 mg/l IBA). After one month, 64 percent of the explants produced shoots (more than 1.5 cm long) and leaves (an average of 4.4 leaves/shoot). In June, 2008, single node cuttings were cultured on AP culture medium supplemented with different BAP concentrations and despite a high rate of contamination, lateral buds grew and maximum initation and growth were obtained in AP medium with 0.5 mg/l BAP. The results of the optimization experiment for the maintenance medium showed that AP medium with 0,5 mg/l BAP, 4 mg/l GA_3 and 200 mg/l casein hydrolysate was the best for growth and multiplication of GF677 shoots with and without the original explants. Shoot multiplication was achieved through monthly subcultures.

Keywords: GF677 rootstock, *in vitro* plants, Initiation culture medium, Maintenance culture medium.