تکثیر درون‌شیشه‌ای انار رقم رباب نیریز با استفاده از قطعات گره‌ای ساقه

In Vitro Propagation of Pomegranate (*Punica granatum*) cv. *Rabab Neyriz* Using Nodal Segments

بابک ولیزاده کاجی[۱]، احمد ارشادی[۲] و مسعود توحیدفر[۳*]

تاریخ دریافت: ۹۲/۰۲/۲۰ تاریخ پذیرش: ۹۲/۰۸/۲۰

چکیده

در این تحقیق، یک روش سریع و کارآمد برای تکثیر درون‌شیشه‌ای انار رقم رباب نیریز شرح داده می‌شود. اثر دو محیط‌کشت WPM و MS، و تنظیم‌کننده‌های رشد مختلف در ریزازدیادی این رقم بررسی شد. برای مرحله پرآوری، محیط‌کشت دارای غلظت‌های مختلف کینتین (۲/۳، ۴/۷، ۹/۲ و ۱۸/۴ میکرومولار) همراه با ۰/۵۴ میکرومولار نفتالین استیک‌اسید استفاده گردید. از نظر پرآوری، محیط-کشت WPM در مقایسه با MS کارآمدتر تشخیص داده شد. بهترین غلظت کینتین ۹/۲ میکرومولار بود که منجر به بیش‌ترین طول شاخساره (۳/۹۳ سانتی‌متر)، تعداد برگ (۱۰/۷۱) و تعداد گره (۴) در ریزنمونه‌ها شد. محیط نصف غلظت WPM حاوی ۵/۴ میکرومولار NAA مؤثرترین محیط برای ریشه‌زایی شاخساره‌ها بود. گیاهان ریشه‌دار شده به‌طور موفقیت‌آمیزی سازگاری تدریجی شده و به خاک منتقل گردیدند. گیاهان ریز ازدیادی یافته از نظر مرفولوژیکی شبیه به هم بوده و صفات رویشی مشابه با گیاهان مادری نشان دادند.

واژه‌های کلیدی: انار، تکثیر درون‌شیشه‌ای، هورمون

۱. استادیار گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه اراک، اراک
۲. استادیار گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه بوعلی‌سینا، همدان
۴. استادیار بخش بیوتکنولوژی گیاهی، پژوهشکده بیوتکنولوژی، کرج
*: نویسنده مسوول Email: gtohidfar@yahoo.com

مقدمه

انار با نام علمی *Punica granatum* L. یکی از درختچه‌های بومی ایران و یکی از قدیمی‌ترین میوه‌های خوراکی است. این درختچه به‌منظور استفاده در صنایع غذایی، دارویی، پزشکی و زینتی کشت‌وکار می‌گردد. با توجه به شرایط مناسب تولید انار در ایران و امکان گسترش آن در مناطق خشک و نیمه‌خشک و همچنین سازگاری این درختچه با شرایط آب‌وهوایی کشور، کشت‌وکار آن در اکثر مناطق این سرزمین متداول است. به‌دلیل رشد تعداد مصرف‌کنندگان انار در خارج از کشور، این محصول از لحاظ صادراتی ارزش فوق‌العاده‌ای یافته است. ایران با تولید سالیانه حدود ۵۰۰۰۰۰ تن، بزرگ‌ترین تولیدکننده و صادرکننده انار در جهان است *تهرانی‌فر* و همکاران (Tehranifar *et al.*, 2010). وجود ذخایر ژنتیکی غنی از ارقام مختلف انار در ایران که به بیش از ۷۶۰ رقم و ژنوتیپ می‌رسد، از دیگر توانمندی‌های کشور در این زمینه محسوب می‌شود *مسلمی* و همکاران (Moslemi *et al.*, 2010).

تکثیر سنتی انار از طریق قلمه چوب نرم و قلمه چوب سخت می‌باشد. این روش وابسته به فصل بوده و نمی‌تواند منجر به تولید گیاهان عاری از بیماری شود. به‌علاوه، برای استقرار گیاهان تکثیر شده از طریق قلمه به یک‌سال زمان نیاز است و تعداد زیادی از قلمه‌ها در طی تکثیر از بین می‌روند *کانوار* و همکاران (Kanwar *et al.*, 2010). بنابراین، توسعه یک روش کارآمد درون‌شیشه‌ای برای تکثیر این درخت میوه ضروری می‌باشد. در طی سال‌های گذشته، تکنیک کشت‌بافت به‌طور گسترده برای تکثیر تعداد زیادی از درختان میوه مناطق گرمسیری و نیمه‌گرمسیری استفاده شده است *اسکیادا* و همکاران؛ *پرز-تومرو* و همکاران؛ *آگاروال* و همکاران؛ *تسوکاموتو* و همکاران (Skiada *et al.*, 2010؛ Perez-Tornero *et al.*, 2010؛ Agarwal *et al.*, 2004؛ Tsukamoto *et al.*, 2007) همچنین، ریزازدیادی انار یک مرحله‌ی ضروری در موفقیت باززایی لاین‌های تراریخته است و کارآیی پروتوکل تراریختگی را مشخص می‌کند.

تکثیر درون‌شیشه‌ای ارقام انار خارجی قبلاً گزارش شده است *نیک و چاند* (Naik and Chand, 2011)، ولی هیچ گزارشی در مورد ریزازدیادی ارقام ایرانی وجود ندارد. این مطالعه با هدف توسعه یک پروتکل کارآمد برای تکثیر درون‌شیشه‌ای رقم رباب نیریز به‌عنوان یکی از ارقام انار مهم کشور انجام شده است. همچنین، محدودیت‌های پروتکل‌های قبلی قهوه‌ای‌شدن محیط‌کشت و به‌دنبال آن نکروزه‌شدن ریزنمونه‌ها می‌باشد، درحالی‌که در این مطالعه این مشکل جزیی بود. به‌علاوه، نتایج این تحقیق به‌عنوان یک بخش ضروری جهت تراریختی انار حائز اهمیت می‌باشد.

مواد و روش‌ها

این تحقیق در آزمایشگاه کشت‌بافت گروه علوم باغبانی دانشگاه بوعلی‌سینا در طی سال‌های ۱۳۹۰ تا ۱۳۹۱ انجام شد. ریزنمونه‌ها از گیاهان دو ساله رقم رباب نیریز که از ایستگاه تحقیقات انار ساوه تهیه شده و به‌صورت گلدان‌هایی در گلخانه پرورش یافتند، جمع‌آوری گردید.

تهیه ریزنمونه

قطعات گره‌ای ساقه (۱/۵-۰/۵ سانتی‌متر) از گیاهان دو ساله رشد داده شده در گلخانه جدا شدند. به‌دنبال حذف برگ‌ها، ریز نمونه‌ها با آب شیر برای ۳۰ دقیقه شسته شدند، سپس به‌مدت ۱۰ دقیقه در محلول هیپوکلریدسدیم ۰/۱٪ حاوی ۳-۲ قطره مایع ظرفشویی ضدعفونی شده و سه بار در آب مقطر استریل شستشو گردیدند. ریزنمونه‌های ضدعفونی شده (دو ریزنمونه در هر شیشه) به‌طور عمودی روی محیط موردنظر کاشته شدند.

محیط‌های کشت و شرایط کاشت

در این تحقیق دو محیط‌کشت *موراشیگ و اسکوگ* (MS) (Murashige and Skoog, 1962) و محیط‌کشت گیاهان چوبی (WPM) *لیود و مک کرون* (Lloyd and McCown, 1980) استفاده شد. ساکارز به میزان ۳۰ گرم در لیتر اضافه گردید و سپس pH محیط‌های تهیه شده قبل از اضافه کردن آگار (۰/۶٪) با استفاده از سود ۰/۱ نرمال به ۵/۶±۰/۱ تنظیم گردید.

برای مرحله‌ی پرآوری، کینتین در غلظت‌های ۰، ۲/۳، ۴/۷، ۹/۲ و ۱۸/۴ میکرومولار همراه با ۰/۵۴ میکرومولار نفتالین استیک‌اسید به‌کار برده شد. سپس محیط‌های‌کشت در ظروف شیشه‌ای ۲۰۰ میلی‌لیتری توزیع شدند، حجم محیط به‌کار رفته برای هر ظرف حدود ۲۵ میلی‌لیتر بود. ظروف حاوی محیط‌کشت در دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد برای ۱۵ دقیقه اتوکلاو شدند و سپس چند ساعتی در هوای اتاق قرار گرفتند تا به‌حالت جامد درآیند. ریزنمونه‌ها به‌طور عمودی و به صورتی‌که چند میلی‌متر از ته آنها در محیط‌کشت وارد شود، کاشته شدند. ریزنمونه‌های کاشته‌شده برای هفت روز در تاریکی و دمای ۱±۲۵ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند و سپس به شرایط با هشت ساعت تاریکی و فتوپریود ۱۶ ساعت حاوی نور سفید انتقال یافتند. هر تیمار سیتوکنین در هفت

تکرار (ظرف شیشه‌ای) و هر ظرف حاوی دو ریزنمونه بود و این آزمایش دو بار تکرار گردید. بعد از حدود یک‌ماه، شاخساره‌های به‌وجود آمده از ریزنمونه‌ها فقط برای رشد بیش‌تر (نه اندازه-گیری صفات) به محیط‌کشت تازه و تحت فتوپریود قبلاً ذکر شده انتقال داده شدند.

ریشه‌دار کردن درون‌شیشه‌ای

شاخساره‌های نمویافته با طول ۴-۲ سانتی‌متر در مرحله‌ی پرآوری، بریده شدند و در محیط نصف غلظت WPM حاوی ۱۵ گرم در لیتر ساکارز و ۳ گرم در لیتر آگار کشت شدند. برای ریشه‌زایی، ایندول‌بوتیریک‌اسید (IBA) در غلظت ۰، ۲/۵، ۴/۹ و ۹/۸ میکرومولار و نفتالین استیک‌اسید (NAA) در غلظت ۰، ۲/۷، ۵/۴ و ۱۰/۸ میکرومولار استفاده شد. بعد از ۱۰ روز، شاخساره‌های ریشه‌دار شده به یک محیط نصف غلظت بدون اکسین برای طویل‌شدن بیشتر ریشه‌ها انتقال داده شدند. هر تیمار اکسین در هفت تکرار (ظرف شیشه‌ای) و هر ظرف حاوی یک ریزنمونه بود. بعد از یک ماه از کشت، تعداد و طول ریشه‌ها در هر شاخساره ریشه‌دار شده ارزیابی گردید.

سازگاری تدریجی گیاهچه‌های باززایی‌شده

گیاهچه‌های به‌خوبی ریشه‌دار شده از محیط‌کشت جدا شدند و ریشه‌های آنها برای حذف آگار به‌آرامی با آب شیر شسته شدند و به گلدان‌های پلاستیکی کوچک حاوی مخلوط کوکوپیت و پرلایت استریل منتقل گردیدند. گلدان‌ها برای حفظ رطوبت نسبی با کیسه‌های پلاستیکی پوشیده شدند و در اتاقک رشد با دمای ۱±۲۵ درجه سانتی‌گراد و نور مصنوعی برای ۴-۳ هفته نگهداری گردیدند. در طی این مدت گیاهچه‌ها با محلول غذایی یک پنجم غلظت WPM تغذیه و آبیاری می‌شدند. برای مقاوم ساختن گیاهان، کیسه‌های پلاستیکی به‌مدت چند دقیقه در وسط روز باز شدند و با افزایش این دوره تدریجاً در شرایط طبیعی قرار گرفتند. گیاهچه‌ها سپس به گلدان‌های بزرگ‌تر حاوی خاک و کمپوست به نسبت ۱:۱ منتقل و تحت شرایط سایه برای دو هفته دیگر نگهداری شدند و سرانجام به شرایط مواجهه با نور مستقیم خورشید انتقال یافتند. بررسی تعداد گیاهچه‌های زنده مانده حدود ۴۰ روز بعد از انتقال صورت گرفت.

آنالیز داده‌ها و اندازه گیری‌ها

برای مرحله‌ی پرآوری، آزمایش به‌صورت فاکتوریل و در قالب طرح کاملاً تصادفی با دو نوع محیط‌کشت (MS و WPM) و پنج غلظت کینتین انجام شد. برای آزمایشات ریشه‌زایی، یک طرح کاملاً تصادفی با هشت غلظت اکسین (IBA و NAA) به-کار برده شد. داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SAS 9.1 آنالیز شدند. مقایسات میانگین با استفاده از آزمون چنددامنه‌ای دانکن در سطح ۰/۰۵ مورد بررسی قرار گرفتند.

صفات مورد بررسی شامل تعداد شاخساره (با طول بیش از ۰/۵ سانتی‌متر)، طول شاخساره‌ها، تعداد گره، تعداد برگ، تعداد ریشه و طول ریشه‌ها بودند که حدود یک‌ماه بعد از کشت اندازه‌گیری شدند.

نتایج

محیط‌کشت اثر معنی‌داری بر صفات طول شاخساره، تعداد گره و تعداد برگ داشت، ولی تفاوت معنی‌داری در تعداد شاخساره مشاهده نشد، به‌علاوه هیچ‌گونه اثر متقابلی بین محیط‌کشت و کینتین مشاهده نشد (جدول ۱). محیط‌کشت WPM کارآمدتر از محیط‌کشت MS بود و گیاهچه‌های تولید شده در این محیط از نظر ظاهری قوی‌تر بوده و طول شاخساره بلندتری (۲/۱۶ سانتی‌متر) داشتند (جدول ۲) که یک صفت بسیار مهم در ریزازدیادی است. بنابراین، در مطالعات بعدی از محیط-کشت WPM جهت ریشه‌زایی استفاده شد.

اثر تنظیم‌کننده‌های رشد

کینتین اثر بسیار معنی‌داری بر تمامی صفات مورد بررسی داشت (جدول ۱). جوانه‌های روی ریزنمونه‌ها روی محیط دارای کینتین یا بدون‌کینتین در مدت ۲-۱ هفته شروع به بازشدن و رشد کردند؛ ولی، قادر به طویل‌شدن روی محیط فاقد کینتین نبودند به‌طوری‌که طویل‌شدن شاخساره تنها روی محیط دارای کینتین صورت گرفت (جدول ۲). چندین شاخساره از ریزنمونه‌های کاشته شده روی محیط حاوی غلظت‌های مختلف کینتین (۲/۳، ۴/۷، ۹/۲ و ۱۸/۴ میکرومولار) همراه با ۰/۵۴ میکرومولار نفتالین‌استیک‌اسید رشد یافت. نتایج مربوط به مقایسات میانگین نشان داد که برای رقم رباب نیریز محیط‌کشت دارای ۹/۲ میکرومولار کینتین و ۰/۵۴ میکرومولار نفتالین‌استیک‌اسید برترین تیمار بوده و منجر به تولید گیاهچه‌های قوی‌تر با بیش‌ترین تعداد برگ (۱۰/۷۱)، تعداد گره (۴) و طول شاخساره (۳/۹۳ سانتی-متر) شد (جدول ۲، شکل ۱). بعد از تیمار ۹/۲ میکرومولار کینتین، به‌ترتیب غلظت‌های ۴/۷، ۱۸/۴ و ۲/۳ میکرومولار تأثیر بیشتری بر پرآوری نشان دادند (جدول ۲). در غلظت‌های

بالای کینتین (۱۸/۴ میکرومولار) شیشه‌ای‌شدن ریزنمونه‌ها مشاهد شد (داده‌ها نشان داده نشده).

جدول ۱: تجزیه واریانس نوع محیط‌کشت و غلظت‌های مختلف کینتین روی تکثیر درون‌شیشه‌ای رقم انار رباب نیریز

Table 1: Analysis of variance of culture medium and different concentrations of Kinetin on in vitro propagation of the pomegranate cultivar 'Rabab Neyriz'

منبع پراکنش source of distribution	درجه آزادی freedom degree	میانگین مربعات (Mean squares)			
		تعداد شاخساره Number of shoots	طول شاخساره Length of shoot (cm)	تعداد گره Number of node	تعداد برگ Number of leaves
تیمار Treat	9	4.247**	12.737**	19.030**	106.261**
محیط کشت Medium	1	0.057ns	0.252**	2.414**	1.728*
کینتین Kinetin	4	9.521**	28.574**	42.014**	238.285**
محیط × کینتین Medium × Kinetin	4	0.021ns	0.022ns	0.200ns	0.371ns
اشتباه آزمایشی Error	60	0.119	0.018	0.128	0.290

*، ** و ns: به‌ترتیب معنی‌دار (P<0.05)، بسیار معنی‌دار (P<0.01) و غیرمعنی‌دار

*, ** and ns: Significant (P<0.05), high significant (P<0.01) and no significant, respectively

جدول ۲: اثر غلظت‌های مختلف کینتین و نوع محیط‌کشت روی پرآوری درون‌شیشه‌ای شاخساره رقم انار رباب نیریز

Table 2: Effect of different concentrations of Kinetin and culture medium on in vitro shoot proliferation of the pomegranate cultivar 'Rabab Neyriz'

تیمارها Treatments	تعداد شاخساره Number of shoots	طول شاخساره (سانتی‌متر) Length of shoot (cm)	تعداد گره Number of node	تعداد برگ Number of leaves
محیط‌کشت Medium				
WPM	0.80±1.22	1.32a±2.16	1.68a±2.60	3.68a±6.62
MS	0.82±1.28	1.28b±2.04	1.53b±2.22	3.65b±6.54
کینتین (میکرومولار) Kinetin (µM)				
کینتین ۱ (۰) Kinetin 1 (0)	0.00e±0.00	0.00d±0.00	0.00e±0.00	0.00e±0.00
کینتین ۲ (۲/۳) Kinetin 2 (2.3)	0.10d±1.00	0.21c±1.95	0.42d±1.21	0.63d±6.35
کینتین ۳ (۴/۷) Kinetin 3 (4.7)	0.49c±1.35	0.16b±2.67	0.46b±3.71	0.77b±9.14
کینتین ۴ (۹/۲) Kinetin 4 (9.2)	0.42b±1.78	0.11a±3.93	0.39a±4.00	0.61a±10.71
کینتین ۵ (۱۸/۴) Kinetin 5 (18.4)	0.36a±2.14	0.14c±1.93	0.53c±3.14	0.46c±7.71

مقادیر نشان‌دهنده‌ی میانگین ± انحراف استاندارد می‌باشد Values represent the mean ± SD

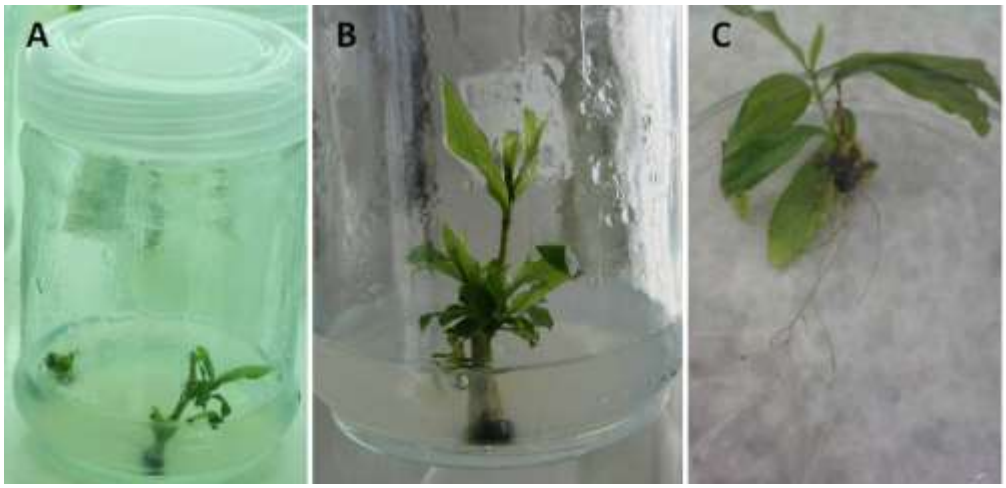
میانگین‌های دارای حروف مشابه در یک ستون در سطح خطای کمتر از ۰/۰۵ آزمون چنددامنه‌ای دانکن دارای تفاوت معنی‌داری با همدیگر نیستند

Mean values followed by the similar letters within a column are not significantly different from each other at P ≤ 0.05 (Duncan's multiple range test)

ریشه‌زایی درون‌شیشه‌ای و سازگاری تدریجی گیاهچه‌ها

محیط WPM فاقد نفتالین‌استیک‌اسید یا ایندول‌بوتیریک‌اسید قادر به تحریک ریشه‌زایی نبود و ریشه‌زایی تنها در محیط دارای اکسین مشاهده شد (جدول ۳). نفتالین‌استیک‌اسید نسبت به ایندول‌بوتیریک‌اسید اثر مشخص‌تری روی ریشه‌زایی شاخساره‌ها داشت. در بین تیمارهای آزمایش شده، محیط نصف غلظت WPM حاوی ۵/۴ میکرومولار نفتالین‌استیک‌اسید بیش‌ترین اثر را در ریشه‌زایی شاخساره‌ها نشان داد. (شکل ۱ و جدول ۳). بعد از تیمار ۵/۴ میکرومولار نفتالین‌استیک‌اسید، به‌ترتیب غلظت‌های ۴/۹ میکرومولار ایندول‌بوتیریک‌اسید، ۱۰/۸ میکرومولار نفتالین‌استیک‌اسید و ۹/۸ میکرومولار ایندول‌بوتیریک‌اسید تأثیر بیش‌تری بر ریشه‌زایی نشان دادند (جدول ۳). به‌طورکلی ریشه‌زایی شاخساره موقعی که از نفتالین استیک‌اسید استفاده شد، اندکی بیشتر بود.

سازگاری تدریجی گیاهچه‌های ریشه‌دار شده به‌طور موفقیت‌آمیزی صورت گرفت و گیاهان در خاک مستقر شدند. درصد گیاهچه‌های زنده‌مانده حدود ۸۰٪ بود. گیاهچه‌های مستقر شده هیچ‌گونه تضادی با گیاهان مادری از نظر شکل ظاهری نشان ندادند.



شکل ۱: A: نمو شاخساره از قطعات گره‌ای انار رقم رباب نیریز ۱۰ روز بعد از کشت روی محیط WPM حاوی ۹/۲ µM کینتین و ۰/۵۴ µM نفتالین‌استیک‌اسید، B: نمو چندین شاخساره بعد از ۳۰ روز کشت روی همان محیط، C: نمو ریشه در شاخساره کاشته شده روی محیط نصف غلظت WPM دارای ۰/۵۴ µM نفتالین‌استیک‌اسید

Fig. 1: A: Shoot development from nodal segments of pomegranate cultivar ‘Rabab’ after 10 days of culture on WPM medium containing 9.2 µM kinetin + 0.54 µM NAA, B: Development of multiple shoots after 30 days of culture on the same medium, C: Root development in shoot cultured on half strength WPM medium containing 5.4 µM NAA

بحث

مشکلات عمده‌ای که معمولاً در کشت‌بافت درختان میوه مشاهده می‌شود، آلودگی بالا، سخت ریشه‌زایی درختان بالغ، شیشه‌ای‌شدن و قهوه‌ای‌شدن محیط‌کشت یا ریزنمونه‌ها به‌خاطر نشت مواد فنلی می‌باشند *کریشنا و سینگ* (Krishna and Singh, 2007). در مطالعه حاضر، از قطعات گره‌ای و نوک شاخساره گیاهان دو ساله پرورش یافته در گلخانه به‌عنوان ریزنمونه استفاده شد. عکس‌العمل بهتر ریزنمونه‌های تهیه شده از گیاهان جوان به محیط‌کشت در گونه‌های مختلف توسط محققین گزارش شده است *کهریزی* و همکاران؛ *دالال و رای*؛ *چاندراسخار* و همکاران؛ *شوکلا* و همکاران (Kahrizi *et al.*, 2011؛ Chandrasekhar *et al.*, 2005؛ Dalal and Rai, 2004؛ Shukla *et al.*, 2008). قهوه‌ای‌شدن ریزنمونه‌ها به‌خاطر تراوش مواد فنلی به‌عنوان یک مشکل جدی در استقرار کشت‌های گونه‌های درختی گزارش شده است. اما در مطالعه موجود، به‌دلیل اینکه ریزنمونه‌ها از گیاهان جوان گرفته شدند، این مشکل مشاهده نگردید. این مسأله شاید به‌دلیل این است که گیاهان جوان مواد فنلی کمتری سنتز می‌کنند *رای* و همکاران (Rai *et al.*, 2009).

در انار، انواع مختلف ریزنمونه همانند قطعات گره‌ای و نوک شاخساره *مورکات* و همکاران (Murkute *et al.*, 2004)، جنین‌های زیگوتی از بذرهای بالغ *کانوار* و همکاران، (Kanwar *et al.*, 2010)، گلبرگ *ناتاراجا و نیلامبیکا* (Nataraja and Neelambika, 1996) و قطعات برگ، کوتیلدون و هیپوکوتیل *جیدکا و مهرا* (Jaidka and Mehra, 1986) جهت تکثیر درون‌شیشه‌ای استفاده شده است. ولی، قطعات گره‌ای و نوک شاخساره در مقایسه با سایر ریزنمونه‌ها واکنش بهتری به کشت‌بافت نشان دادند. نتایج به‌دست آمده از این تحقیق نیز نشان می‌دهد قطعات گره‌ای و نوک شاخساره ریزنمونه‌های مناسبی برای تکثیر درون‌شیشه‌ای انار هستند.

جدول ۳: اثر مقادیر مختلف ایندول‌بوتیریک‌اسید (IBA) و نفتالین‌استیک‌اسید (NAA) روی ریشه‌زایی شاخساره‌های رقم رباب نیریز
Table 3: Effect of different concentrations of IBA and NAA on rooting of shoots of Rabab'

تیمارها Treatments	تعداد ریشه Number of root	طول ریشه (سانتی‌متر) Length of root (cm)
اکسین (میکرومولار) Auxin (µM)		
(0) NAA	0.00d±0.00	0.00g±0.00
(2.7) NAA	0.69c±2.14	0.32e±3.58
(5.4) NAA	0.48a±5.71	0.37a±6.67
(10.8) NAA	0.53b±3.57	0.13c±4.37
(0)IBA	0.00d±0.00	0.00g±0.00
(2.5) IBA	0.57c±2.00	0.30f±3.18
(4.9) IBA	0.53a±5.4	0.12b±6.07
(9.8) IBA	0.48b±3.28	0.12d±3.88

مقادیر نشان‌دهنده میانگین ± انحراف استاندارد می‌باشد. Values represent the mean ± SD

میانگین‌های دارای حروف مشابه در یک ستون در سطح خطای کمتر از ۰/۰۵ آزمون چند دامنه‌ای دانکن دارای تفاوت معنی‌داری با همدیگر نیستند

Mean values followed by the similar letters within a column are not significantly different from each other at $P \leq 0.05$ (Duncan's multiple range test)

ارقام انار توانایی باززایی مختلفی دارند که دلیل آن نیازهای متفاوت هر رقم برای تنظیم‌کننده‌های رشد است *نیک و چاند* (2011). به‌علاوه، تفاوت‌ها در میزان طویل‌شدن شاخساره ممکن است مرتبط با تفاوت در عناصر غذایی پرمصرف باشد *روبلاکیس-آنگلاکیس و زیوانویچ* (Roubelakis-Angelakis and Zivanovitc, 1991).

استفاده از تنظیم‌کننده‌های رشد در کشت‌بافت انار اهمیت اساسی دارد. مطالعات زیادی به‌منظور شناسایی ترکیب مطلوبی از تنظیم‌کننده‌های رشد برای باززایی گیاه انار صورت گرفته است *کانوار* و همکاران؛ *تراکامی* و همکاران (2007, 2010). به‌طور کلی اضافه‌کردن سیتوکنین‌ها به محیط‌کشت برای پرآوری شاخساره ضروری است (*نیک و چاند*، 2011)؛ در آزمایش حاضر پرآوری و طویل‌شدن شاخساره‌ها در محیط حاوی کینتین و فاقد اکسین کاهش یافت (داده‌ها نشان داده نشده).

بنزیل‌آدنین (BA)، بنزیل‌آمینوپورین (BAP)، کینتین، زآتین‌ریبوزاید (ZR) و تیدیازورون (TDZ) معمول‌ترین تنظیم‌کننده‌های رشد هستند که به‌تنهایی یا همراه با غلظت کمی از اکسین برای پرآوری استفاده شده‌اند (*نیک و چاند*، 2011). استفاده از اکسین همراه با سیتوکنین در محیط‌کشت برای پرآوری شاخساره در برخی از ارقام مثل نانا ضروری است، درحالی‌که برخی از ارقام دیگر مثل گانش جهت پرآوری نیازی به اکسین ندارند *نیک و چاند* (2011). در برخی از گیاهان، موقعی که مراکز بیوسنتز اکسین در ریزنمونه‌ها فعال هستند، نیازی به آن برای پرآوری ریزنمونه‌ها نیست *ایبانز* و همکاران (Ibáñez *et al.*, 2005). در رقم رباب نیریز که نیاز به اکسین دارد ممکن است این مراکز غیرفعال باشند.

ترکیبات محیط نقش کلیدی در اندام‌زایی دارند. محیط-کشت MS در غلظت کامل معمول‌ترین محیط‌کشت پایه‌ای است که برای ریزازدیادی انار استفاده شده است، در حالی محیط‌کشت نصف غلظت MS، WPM و B5 در برخی از ارقام مفید بوده‌اند *نیک و چاند* (2011). در این مطالعه محیط‌کشت WPM مؤثرتر از محیط‌کشت MS بوده است.

ریشه‌زایی شاخساره‌های به‌وجود آمده از کشت‌های درون‌شیشه‌ای یک پیش شرط اساسی برای استقرار آنها در خاک است. نفتالین‌استیک‌اسید و ایندول‌بوتیریک‌اسید معمول‌ترین اکسین‌های استفاده شده برای القاء ریشه‌زایی در شاخساره‌های باززایی‌شده درون‌شیشه‌ای انار هستند. نوع اکسین ریشه‌زایی ریزنمونه‌ها را شدیداً تحت تأثیر خود قرار می‌دهد *هلویر* و همکاران (Heloir *et al.*, 1997). غلظت‌های بالای نفتالین‌استیک‌اسید ممکن است سبب ایجاد حالت سمیت در ریزنمونه‌ها شود *دکلرک* و همکاران (De Klerk *et al.*, 1997). نتایج مشابهی در این مطالعه در موقع استفاده از غلظت‌های بالای هر دو اکسین مشاهده شد. در انار بیش‌تر از محیط‌کشت‌های نصف غلظت MS و WPM برای ریشه‌زایی استفاده شده است *نیک و چاند* (2011). در مطالعه حاضر، محیط‌کشت نصف غلظت WPM به‌اندازه کافی برای القاء ریشه‌زایی مؤثر بود. غلظت‌های نسبتاً کم نمک در محیط‌کشت نصف غلظت، ریشه‌زایی شاخساره‌ها را در چندین گونه گیاهی

افزایش داده است (*رای* و همکاران، 2010). در برخی از ارقام، انتقال شاخساره‌های ریشه‌دار شده به محیط فاقد اکسین برای طویل‌شدن ریشه‌ها ضروری است (*نیک و چاند* Naik and Chand, 2003). در این تحقیق، ریشه‌ها بدون انتقال به محیط فاقد اکسین قادر به طویل‌شدن بودند.

حدود ۴۰ روز بعد از مقاوم‌سازی گیاهان، هیچ‌گونه مشکلی از نظر بقاء مشاهده نشد. میزان زنده‌ماندن گیاهچه‌های انتقال داده شده به مخلوط کوکوپیت و پرلایت و سپس به خاک مرتبط با نوع و غلظت اکسین بود. غلظت و نوع اکسین در مرحله ریشه‌زایی به‌شدت گیاهان را بعد از سازگاری تدریجی متأثر می‌کند (*کریستیانسن* Kristiansen, 1992). در انار، مواد بستر مختلف جهت سازگاری تدریجی گیاهچه‌های ریشه‌دار شده استفاده گردید و درصد گیاهچه‌های زنده مانده از ۱۰۰-۶۰٪ متغیر بوده است (*سینگ و خاوال*؛ *نیک* و همکاران Singh and Khawale, 2006؛ Nail *et al*., 1999 and 2000).

نتایج به‌دست آمده از این تحقیق، یک پروتکل ریزازدیادی موفق را برای تکثیر رقم رباب نیریز به‌عنوان یکی از ارقام انار مهم ایرانی ارائه می‌نماید.

جهت مطالعه منابع به صفحه‌های ۱۸-۱۹ متن انگلیسی مراجعه شود.