

تأثیر محیط کشت، قند و تنظیم کننده های رشد گیاهی در ریزازدیادی پایه رویشی سنت جولین A (*Prunus domestica* spp. *Insititia*)

Effect of Medium, Sugar and Plant Growth Regulators on Micropropagation of Saint Julien A (*Prunus domestica* spp. *Insititia*) Rootstock

امید استادشریف^۱، قاسمعلی گروسی^{۲*}، رحیم حداد^۳ و اسماعیل نظامی^۴

تاریخ پذیرش: ۹۳/۰۲/۲۰

تاریخ دریافت: ۹۱/۰۸/۲۰

چکیده

پایه رویشی سنت جولین A به عنوان یکی از پایه های رویشی مهم نیمه پاکوتاه با سازگاری خوب با بیشتر ارقام میوه های هسته دار (به ویژه با آلو) به شمار می آید. در این پژوهش اثر ۵ نوع محیط کشت (MS، WPM، TK، GNH و mGNH)، اثر متقابل تنظیم کننده های رشدی (BAP) در غلظت های ۰/۲۵، ۰/۵ و ۱ میلی گرم بر لیتر و IBA در غلظت های ۰/۰، ۰/۰۵، ۰/۱ و ۰/۲ میلی گرم در لیتر، و همچنین اثر منبع کربوهیدرات (گلوکز و ساکارز) هر کدام به طور جداگانه در غلظت های صفر، ۱۰، ۲۰ و ۳۰ گرم در لیتر روی میزان نوساقه زایی پایه رویشی یاد شده مورد مطالعه قرار گرفت. برای تحریک ریشه زایی تأثیر دو روش مختلف کاربرد IBA و NAA (پیش-تیمار تدریجی و پالسینگ) نیز به طور مستقل مطالعه گردید. نتایج نشان داد که بیشترین تعداد نوساقه سالم (۲/۱۲۵) در هر ریزنمونه در محیط کشت MS به همراه ۰/۵ میلی گرم در لیتر BAP و ۰/۱ میلی گرم در لیتر IBA به دست آمد که اختلاف معنی داری در سطح $\alpha=0/05$ با سایر تیمارهای به کار برده شده داشت. هر چند نتایج بیانگر اثرات متقابل معنی دار ساکارز و گلوکز در سطح $\alpha=0/01$ برای هر دو صفت تعداد و طول نوساقه بود ولی بیشترین تعداد نوساقه سالم (۲/۶۶) با کیفیت رشد مناسب در محیط کشت MS حاوی ترکیبی از دو قند هر یک ۲۰ گرم بر لیتر و بلندترین نوساقه ها با میانگین طول ۸/۵ میلی متر در محیط کشت MS حاوی ۳۰ گرم در لیتر ساکارز مشاهده شدند که در سطح $\alpha=0/05$ اختلاف معنی داری با سایر تیمارها داشتند. نتایج به دست آمده از مرحله تحریک ریشه زایی بیانگر کارایی بالای روش پالسینگ (با ۷۷/۲۸ درصد ریشه زایی و ۱/۸۲ ریشه در هر ساقه) نسبت به روش معمولی و برتری NAA نسبت به IBA در افزایش راندمان ریشه زایی بود. گیاهچه های ریشه دار شده با ۶۰٪ موفقیت پس از سازگاری در مخلوط پیت ماس و پرلیت در اتاقک رشد به گلخانه منتقل شدند.

واژه های کلیدی: پایه رویشی سنت جولین، آلو، پرآوری، کربوهیدرات، پالسینگ

۱. دانشجوی کارشناسی ارشد گروه بیوتکنولوژی، دانشکده فنی و مهندسی دانشگاه بین المللی امام خمینی (ره)، قزوین

۲. استادیار گروه بیوتکنولوژی، دانشکده فنی و مهندسی دانشگاه بین المللی امام خمینی (ره)، قزوین

۳. دانشیار گروه بیوتکنولوژی، دانشکده فنی و مهندسی دانشگاه بین المللی امام خمینی (ره)، قزوین

۴. کارشناس ارشد گروه بیوتکنولوژی، دانشکده فنی و مهندسی دانشگاه بین المللی امام خمینی (ره)، قزوین

Email: agaroosi90@yahoo.com

* نویسنده مسوول

مقدمه

سطح زیرکشت محصولات باغی کشور اعم از باغ‌های بارور و غیربارده نونهال در سال ۱۳۸۷، حدود ۲/۶ میلیون هکتار و تولیدات باغی در این سال حدود ۱۳/۴ میلیون تن برآورد شده است (آمارنامه کشاورزی ۱۳۸۹) و همراه با محصولات کشاورزی حدود ۱۴-۱۵٪ از درآمد غیرنفتی ایران را تأمین می‌کنند. بدیهی است آن‌چه ضامن رشد و ترقی در این عرصه خواهد شد، توجه به عوامل ژنتیکی و محیطی مؤثر بر هر یک از محصولات و به‌کارگیری علم و امکانات روز جهت افزایش سهم محصولات کشاورزی و باغی در تولید ناخالص ملی است. سنت‌جولین پایه‌ای نیمه‌پاکوتاه و سازگار با ارقام مختلف هلو، شلیل، آلو و گوجه می‌باشد بوی‌هان و همکاران (Boyhan et al., 1995). پایه‌های رویشی درختان میوه، مانند سنت‌جولین نتیجه تکثیر گیاهان به روش‌های غیرجنسی هستند که می‌توانند از راه قلمه‌زدن، خوابانیدن، پاجوش و همچنین روش‌های نوین کشت بافت تکثیر شوند. در کشت بافت گیاه برای رشدونمو نیاز به محیط کشت، شامل نمک‌های معدنی و آلی، منبع کربن به‌همراه تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی دارد جورج و همکاران (George et al., 2008).

چانوتتا پیپات و همکاران (Channuntapipat et al., 2003) در یک بررسی جامع تأثیر محیط کشت‌های MS موراشیگ و اسکوگ (Murashige and Skoog, 1962)، WPM لوید و مک‌کاون (Lloyd and McCown, 1980)، TK تاباچنیک و کستر (Tabachnik and Kester, 1977) بر ریزازدیادی ارقام بادام (Nonpareil and Ne Plus Ultra) را مورد بررسی قرار داده و براساس نتایج به‌دست آمده محیط کشت MS انتخاب و در مراحل بعدی مورد استفاده قرار گرفت. در آزمایشی مشابه، محیط کشت GNH به‌عنوان محیط کشت منتخب جهت ریز ازدیادی پایه هیبرید GF677 معرفی شد نظامی و همکاران (Nezami et al., 2010).

در رابطه با تنظیم‌کننده‌های رشد، غلظت‌های BAP ۰/۲۵ و IBA ۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر برای پرآوری پایه‌های آلو آمبروزیک ترک و همکاران (Ambrozic Turk et al., 1990)، IBA ۰/۱ و BAP ۱ میلی‌گرم بر لیتر جهت ریزازدیادی ارقام گیلان پروسکی و همکاران (Pruski et al., 2000)، BAP ۰/۵ و IBA ۰/۱ برای استقرار ریزنمونه‌های آلو نوک و همکاران (Nowak et al., 2004)، ۰/۵ و ۴ میلی‌گرم بر لیتر BAP و ۳ به‌عنوان ترکیب مناسب نوساقه‌زایی پایه‌های هیبرید زردآلو و آلو معرفی شدند آذر و همکاران (Azar et al., 2010). تاتاری و همکاران (Tatari et al., 2012) نیز در

آزمایشی محیط کشت MS حاوی ۱ و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر به‌ترتیب BPA و NAA را برای ریزازدیادی سنت‌جولین معرفی کردند، ولی به‌هرحال، بسته به شرایط ژنتیکی و محیطی ریزنمونه‌های مختلف واکنش‌های متفاوتی از خود نشان می‌دهند.

به‌علت قدرت فتوسنتزی کم بافت‌های درون شیشه حضور کربوهیدرات‌ها به‌عنوان منبع انرژی و پیش‌ماده کربنی برای بیوسنتز، و تنظیم خاصیت اسمزی محیط کشت ضروری است. هرچند ساکارز قند عمده به‌کارگرفته شده در کشت بافت است ولی سایر قندها نظیر گلوکز، سوربیتول و مانیتول نیز در برخی موارد به‌عنوان منبعی مفید در کشت تعداد زیادی از گیاهان چوبی از جمله خانواده Rosaceae و Olea به‌کار رفته است گارسیا و همکاران، نوک و همکاران (Nowak et al., 2004)؛ مارینو و همکاران (Marino et al., 2002)؛ Garcia et al., 2002). اثر ساکارز و سوربیتول را بر ریزازدیادی دو رقم زردآلو (*Prunus armeniaca* L.) در غلظت‌های مختلف را مورد بررسی قرار دادند که نتایج از برتری سوربیتول در غلظت ۱۱۶/۸ میلی‌مولار برای نوساقه‌زایی و کیفیت مناسب رشد ریشه‌ها حکایت داشت. یونس و همکاران (Younas et al., 2007) در مطالعه خود ترکیب گلوکز و ساکارز به‌نسبت ۱/۵ / ۱/۵٪ را برای تکثیر ساقه و ۰/۲٪ گلوکز را برای رشد طولی نوساقه‌ها در پایه GF677 مناسب تشخیص دادند.

روش‌های متداول ریشه‌زایی در شرایط درون‌شیشه شامل القای ریشه‌زایی توسط اکسین به‌مدت چند روز در محیط حاوی اکسین و سپس انتقال به محیط بدون هورمون جهت تکمیل مراحل رشد ریشه، پیش از انتقال به خاک است مانت و همکاران (Mante et al., 1989). در روش دیگر، نوساقه از محل پایه با محلول حاوی اکسین با غلظت بالا در مدت زمان کوتاهی تیمار (تیمار به روش پالسینگ) و بلافاصله پس از آن به محیط غذایی فاقد هورمون برای تکمیل مراحل بعدی ریشه‌زایی و رشد ریشه منتقل می‌شود. روش فوق روی تعدادی از گیاهان شامل *Prunus avium* با استفاده از پالس ۵۰ میلی‌گرم بر لیتر IBA پولک-کوزلینا و جلاسکا (Pevalek-Kozlina and Jelaska, 1985)، پایه رویشی Gisela5 با ۴ گرم بر لیتر IBA و IAA ترسو و همکاران (Tereso et al., 2008)، ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر IBA به‌مدت ۵ دقیقه جهت ریشه‌زایی ارقام *Prunus dulcis* استفانسیس و همکاران (Štefančič et al., 2007)، ۲ گرم بر لیتر IBA برای ریشه‌زایی قلمه‌های گونه‌های پرونوس ریگارد و لوریتی (Reighard and Loreti, 2008) و پالس ۲ گرم

طول و تعداد نوساقه به عمل آمد. همچنین در آزمایشی مستقل تأثیر هورمون GA_3 بر پرآوری در غلظت‌های ۰، ۰/۵، ۱ و ۲ میلی‌گرم در محیط MS حاوی بهترین ترکیب هورمونی آزمایش قبل (۰/۵ و ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر به ترتیب BAP و IBA) مورد مطالعه و پس از یک‌بار کشت، در دوره زمانی مشابه صفات یاد شده یادداشت‌برداری گردید.

به‌منظور مطالعه اثر گلوکز و ساکارز و اثر متقابل آن‌ها بر نوساقه‌زایی و طول نوساقه‌ها، ۱۶ تیمار ترکیبی آن‌ها، هریک در غلظت‌های ۰، ۱۰، ۲۰ و ۳۰ گرم بر لیتر در محیط MS حاوی ۰/۵ و ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر به ترتیب BAP و IBA مورد استفاده قرار گرفت.

تحریک ریشه‌زایی به دو روش انجام شد. در روش اول (روش معمول) نوساقه‌های ۴۵ روزه تکثیر یافته در محیط پرآوری به طول ۳-۴ سانتی‌متر ابتدا به مدت ۵ روز در محیط MS جامد حاوی ۱ میلی‌گرم در لیتر به‌طور مستقل از هر یک از هورمون‌های IBA و NAA در تاریکی کشت نموده و سپس به محیط MS بدون هورمون حاوی ۳۰ گرم بر لیتر ساکارز و ۷ گرم بر لیتر فیتوآگار در اتاقک رشد با دوره نوری ۸/۱۶ ساعت روشنایی/ تاریکی و دمای $25 \pm 2^\circ C$ منتقل شدند. در روش دیگر (روش پالسینگ Pulsing) ۰/۵ سانتی‌متر ابتدایی پایه نوساقه‌های مشابه در محلول ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر به‌طور مستقل از هریک از هورمون‌های بالا با $pH=5/7$ در تیمارهای زمانی ۳ ثانیه، ۵، ۱۰ و ۲۰ دقیقه قرار داده شدند. ریزنمونه‌ها را پس از خشک کردن با کاغذ صافی اتوکلاو شده به محیط MS فاقد هورمون منتقل و به مدت ۵ روز در معرض تاریکی قرار گرفت و سپس به روشی با شرایط بالا انتقال یافتند. بعد از ۴۵ روز درصد ریشه‌زایی و تعداد ریشه در هر دو روش یادداشت‌برداری شد. در پایان نوساقه‌های ریشه‌دار شده به مخلوط پرلیت، پیت ماس به نسبت ۳ به ۱ منتقل شدند.

آزمایش‌های تعیین محیط‌کشت مناسب، غلظت بهینه اکسین و سایتوکینین، تأثیر منبع کربن و ریشه‌زایی به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی و آزمایش تأثیر GA_3 در قالب طرح کاملاً تصادفی اجرا گردید. آزمایش محیط‌کشت با ۵ مشاهده در ۴ تکرار و سایر آزمایش‌ها شامل ۴ مشاهده در ۴ تکرار انجام شد پیش از تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار آماری SAS نسخه ۹/۲، نرمال بودن داده‌های گسسته بررسی شد و در صورت نرمال نبودن پس از نرمال‌سازی مورد استفاده قرار گرفتند؛ در صورت نیاز برای داده شمارشی از تبدیل لگاریتمی و برای داده‌های مربوط به درصد ریشه‌زایی از تبدیل زاویه‌ای (آرک سینوس) استفاده گردید و میانگین‌ها با

بر لیتر IBA جهت ریشه‌زایی گیلاس (*P. mahleb L.*) آزمایش و نتایج موفقیت‌آمیزی گزارش شده است.

زمان و هزینه صرف شده در تکثیر گیاهان دو عامل بسیار مهم و تأثیرگذار در هر پروژه به‌شمار می‌رود و به‌کار گرفتن روشی که صرفه‌جویی در این دو فاکتور را در نظر داشته باشد، همواره در ارجحیت است. در تحقیق حاضر تأثیر محیط‌کشت، منبع کربوهیدرات و تنظیم‌کننده‌های رشد بر ریزازدیادی و نحوه تیمار دو نوع اکسین بر ریشه‌زایی پایه سنت‌جولین A (*Prunus domestica spp. Insittia*) مورد مطالعه قرار گرفته است.

مواد و روش‌ها

به‌منظور تهیه ریزنمونه، گلدان‌های حاوی نهال پایه سنت‌جولین A (*Prunus domestica spp. Insittia*) از دانشگاه تربیت مدرس تهران تهیه شده و شاخه‌ها به قطعات کوچک دارای ۱ جوانه برش داده و به حدود ۱ ساعت در زیر آب لوله‌کشی شهری شستشو شدند. ریزنمونه ساقه سپس با الکل ۹۶٪ به مدت ۴ ثانیه، کلریدجیوه ۰/۰۵ درصد به مدت ۴ دقیقه و هیپوکلریدسدیم ۱۰ درصد حجمی (حاوی ۵/۲۵ درصد هیپوکلریدسدیم) به مدت ۱۰ دقیقه ضدعفونی و جهت استقرار و تهیه نوساقه درون شیشه (*In vitro*)، به‌عنوان ریزنمونه برای آزمایش‌های اصلی به محیط‌کشت MS حاوی BAP و IBA به ترتیب با غلظت‌های ۰/۶ و ۰/۲ میلی‌گرم بر لیتر، ۲۰ گرم بر لیتر ساکارز، $pH=5/7$ و ۷ گرم بر لیتر فیتوآگار به‌عنوان جامدکننده منتقل و سپس در اتاق رشد در دمای $25 \pm 2^\circ C$ و شرایط نوری ۱۶/۸ ساعت (تاریکی/ روشنایی) با لامپ‌های سرد- سفید (با قدرت روشنایی $65/5 \mu mol.m^{-2}.S^{-1}$) قرار گرفتند. جهت تعیین بهترین محیط‌کشت، ریزنمونه‌های به دست آمده از نوساقه‌های تکثیرشده به محیط‌های کشت MS موراشیگ و اسکوگ (Murashige and Skoog, 1962)، WPM (Woody Plant Medium)، TK تاباچنیک و کستر (Tabachnik and Kester, 1997)، GNH گروسی، نظامی و حداد (Garoozi, Nezami and Hadad, 2010) و mGNH (GNH تغییر یافته) حاوی ترکیب هورمونی مشابه مرحله استقرار منتقل شدند.

به‌منظور تعیین بهترین ترکیب هورمونی اکسین و سایتوکینین، BAP در غلظت‌های ۰/۲۵، ۰/۵ و ۱ میلی‌گرم و IBA در غلظت‌های صفر، ۰/۰۵، ۰/۱ و ۰/۲ میلی‌گرم بر لیتر در محیط‌کشت منتخب آزمایش قبل استفاده و پس از یک‌بار واکشت ۴ هفته پس از اعمال تیمار، یادداشت‌برداری شامل

استفاده از آزمون چنددامنه دانکن در سطح ۵ درصد با یکدیگر مقایسه شدند.

نتایج و بحث

تأثیر محیط کشت

نتایج حاصل از تجزیه واریانس داده های به دست آمده از آزمایش محیط کشت نشان داد که تأثیر محیط کشت بر صفات طول و تعداد نوساقه در سطح یک درصد معنی دار می باشد

(جدول ۱). مقایسه میانگین ها نشان داد بیشترین تعداد نوساقه در محیط کشت MS (شکل ۱- a) و بیشترین طول نوساقه در محیط کشت GNH (شکل ۱- b) به دست آمده است.

براساس مشاهدات به عمل آمده نوساقه ها در محیط کشت های MS، GNH و mGNH از نظر کیفی وضعیت مطلوبی داشتند؛ با این وجود محیط کشت MS در هردو واکنش عملکرد یکسانی داشت.

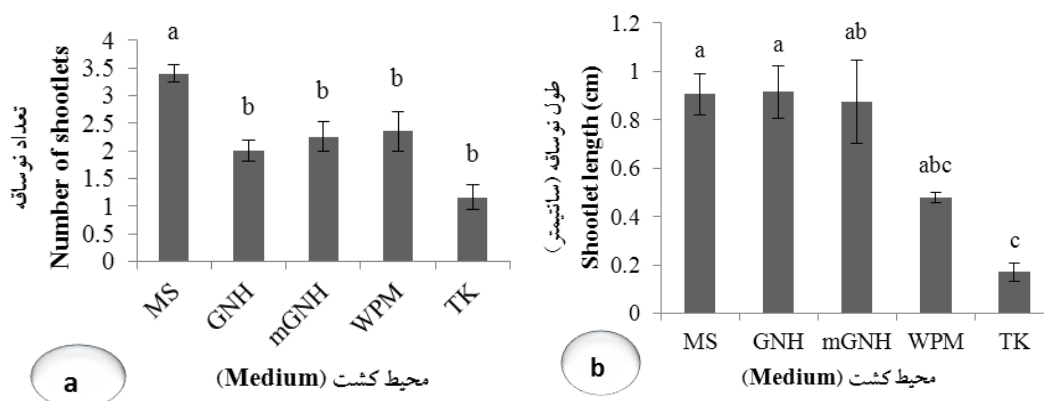
جدول ۱: تجزیه واریانس تأثیر محیط کشت، منبع کربوهیدرات و تنظیم کننده های رشد بر صفات اندازه گیری شده

Table 1: ANOVA analysis for the effect of media, sugar and PGRs on measured characters

منبع تغییرات S.O.V.	درجه آزادی df	میانگین مربعات (MS)	
		تعداد نوساقه Shootlet Number	طول نوساقه Shootlet Length
محیط کشت (Medium)	4	0.479**	2.640**
خطای نمونه برداری (Sampling error)	80	0.104 ^{ns}	0.012 ^{ns}
خطای کل (Total error)	99	0.097	0.006
ضریب تغییرات.٪ (CV)	-	16.180	11.497
BAP	2	0.339**	28.029**
IBA	3	0.293**	20.154**
BAP×IBA	6	0.116**	10.548 ^{ns}
خطای نمونه برداری (Sampling error)	36	0.014	4.619
خطای کل (Total error)	144	0.020	4.046
ضریب تغییرات.٪ (CV)	-	5.818	23.315
GA ₃	3	0.071 ^{ns}	0.013 ^{ns}
خطای نمونه برداری (Sampling error)	8	0.043	0.012
خطای کل (Total error)	43	0.036	0.009
ضریب تغییرات.٪ (CV)	-	11.67	9.71
ساکارز (Sucrose)	3	0.055**	142.269**
گلوکز (Glucose)	3	0.072**	29.333**
ساکارز×گلوکز (S×G)	9	0.063**	38.282**
خطای کل (Total error)	192	0.011	4.272
خطای نمونه برداری (Sampling error)	48	0.012	2.971
ضریب تغییرات.٪ (CV)	-	9.244	27.277

***: معنی دار در سطح احتمال ۱٪، ns: عدم وجود اختلاف معنی دار

***: Significant at 1% probability level, ns: Non significant



شکل ۱: تأثیر محیط کشت بر (a) تعداد نوساقه در هر ریزنمونه و (b) طول نوساقه

Fig. 1: Effect of media on, a) Shootlet number per explants and b) Shootlet length

جنس پرونوس از جمله پایه رویشی سنت-جولین A معرفی کردند. به هر حال محیط MS به عنوان محیط مناسب برای پایه مورد استفاده تشخیص داده شده و از آن به عنوان محیط پایه در مطالعات بعدی مورد استفاده قرار گرفت.

تأثیر تنظیم‌کننده‌های رشد

تأثیر IBA و BAP

نتایج تجزیه واریانس نشان داد که IBA و BAP در سطح یک درصد معنی‌داری بر تعداد و طول نوساقه مؤثر بوده و اثر متقابل BAP در IBA در تعداد نوساقه نیز در سطح یک درصد معنی‌دار می‌باشد (جدول ۱).

میانگین تعداد نوساقه تحت تأثیر هر یک از غلظت‌های BAP در سطوح IBA با یکدیگر مقایسه شد (جدول ۲). با توجه به نتایج به دست آمده، بیشترین تعداد نوساقه (۲/۱۲۵) در هر ریزنمونه) در کلیه غلظت‌های IBA همراه با ۰/۵ میلی-گرم بر لیتر BAP و کمترین آن در غلظت‌های ۰/۲۵ و ۱ میلی-گرم بر لیتر BAP تولید شدند. داسیلوا و همکاران (da Silva et al., 2008) در پژوهش خود تأثیر منبع سایتوکینین بر تکثیر یکی از پایه‌های پرونوس (Capdeboscq) را مورد بررسی قرار دادند و BAP را به عنوان منبع مناسب سایتوکینین انتخاب و تأثیر آن بر تعداد نوساقه، معنی‌دار گزارش نمودند. گرچه با افزایش مقدار BAP به تنهایی، تعداد نوساقه افزایش می‌یابد ولی با اضافه شدن IBA به عنوان منبع اکسین علاوه بر افزایش در تعداد نوساقه (جدول ۲)، کیفیت نوساقه‌ها نیز به طرز چشمگیری افزایش یافت به طوری که در کلیه تیمارهای فاقد IBA علائم زردرنگی و بدشکلی در نوساقه‌ها مشاهده شد که با اضافه شدن IBA به محیط این مشکل رفع گردید. با این همه در صفات تعداد و طول نوساقه بین غلظت‌های ۰/۱، ۰/۰۵ و ۰/۲ میلی‌گرم بر لیتر IBA اختلاف زیادی مشاهده نشد. روزیچ

بر اساس مشاهدات به عمل آمده نوساقه‌ها در محیط کشت-های MS، GNH و mGNH از نظر کیفی وضعیت مطلوبی داشتند. در حالی که نوساقه‌های کشت شده در دو محیط GNH و mGNH در واگشت دوم به سبز کم‌رنگ تغییر رنگ داده و میزان نوساقه‌زایی در آن‌ها نسبت به محیط MS پایین‌تر بود. به نظر می‌رسد این پاسخ ناشی از نصف شدن مقادیر آمونیوم و نیترات در محیط کشت‌های GNH و mGNH در مقایسه با محیط MS باشد. به طوری که مقادیر بالای این عناصر علاوه بر اثرات سمی منجر به مهار سنتز سایتوکینین یا جلوگیری از انتقال آن در محور ساقه شده نوک و همکاران (Nowak et al., 2007) و حذف یا کاهش مقدار آمونیوم و نیترات نیز تأثیر منفی بر رشد و ریخت‌زایی خواهد داشت رعب و تری (Raab and Terry, 1994). پاسخ گیاه به دو محیط WPM و TK کاملاً متفاوت بود، به طوری که نوساقه‌های کشت شده در محیط WPM در واگشت اول به شکل روزت و در واگشت دوم علائم شیشه‌ای شدن در آن‌ها مشاهده شد. ریزنمونه‌های قرار گرفته در محیط TK در ۴ هفته اول تنها موفق به جوانه‌زنی شده و پس از واگشت تغییر چندانی در رشد آن‌ها حاصل نشد. به-طور کلی به نظر می‌رسد پس از هر واگشت علائم کمبود عناصر غذایی قابل ملاحظه‌تر خواهد بود. اندرو و مارین (Andreu and Marín, 2005) در بررسی خود روی پایه ادسوتو (Adesoto) ترکیب محیط کشت را عاملی بسیار تأثیرگذار بر پرآوری معرفی کردند و پس از ۹ واگشت در محیط مشابه، محیط کشت QL کواپین و لپوویو (Quoim and Lepoivre, 1977) در مقایسه با محیط‌های WPM و MS تعداد نوساقه کمتری تولید کرد. آن‌ها نتایج مشابهی دال بر تأثیر مثبت محیط کشت MS در مقایسه با سایر محیط‌ها بر نوساقه‌زایی را گزارش نمودند. تاتاری و همکاران (Tatari et al., 2012) نیز در مطالعه خود محیط-کشت MS را به عنوان محیط کشت مناسب جهت پرآوری ۳ پایه

همراه اکسین ها نقش خود را در کنترل چرخه سلولی ایفا می کنند و اغلب وجود تعادلی بین این دو دسته از تنظیم کننده های رشد جهت شکل گیری مریستم های ساقه و ریشه ضروری به نظر می رسد و غلظت بهینه هر یک بسته به نوع گیاه، شرایط کشت و ترکیبات مورد استفاده متفاوت است جورج و همکاران (George *et al.*, 2008).

طول نوساقه نیز الگوی مشابهی را نشان داد؛ به طوری که بیشترین طول (۶/۱۸۷ میلی متر) در محیط MS حاوی BAP با غلظت ۰/۵ میلی گرم بر لیتر مشاهده شد و حضور IBA تأثیر مثبتی از خود را بر طول نوساقه ها نشان داد (جدول ۲).

بر اساس نتایج این آزمایش BAP و IBA به ترتیب با غلظت های ۰/۵ و ۰/۱ میلی گرم بر لیتر، با بیشترین طول (۶/۱۸۷ میلی متر) و بیشترین تعداد نوساقه (۲/۱۲۵ در هر ریز- نمونه) به عنوان غلظت بهینه اکسین و سایتوکینین جهت پرآوری پایه سنت جولین معرفی و در مراحل بعدی مورد استفاده قرار گرفت.

و ووجوویچ (Ružić and Vujović, 2008) گزارش مشابهی مبنی بر نقش اصلی و تعیین کننده سایتوکینین بر پرآوری و تأثیر مثبت حضور IBA در محیط را ارائه کردند. در آزمایش انتخاب محیط کشت مشاهده شد که تعداد نوساقه در محیط استقرار MS حاوی BAP و IBA به ترتیب با غلظت ۰/۶ و ۰/۲ میلی گرم در لیتر، با کیفیت رویشی مشابه بیشتر از نتایج این آزمایش می باشد که ضمن اثبات تأثیر مثبت IBA، نشان دهنده اثر متقابل نسبی این دو هورمون در نوساقه زایی و کیفیت رویشی آن ها دارد. بنابراین، تیمار ترکیبی از این دو هورمون با دامنه وسیع و فاصله افزایشی کم غلظت، با رعایت نوع و وضعیت ریزنمونه برای تعیین غلظت بهینه اجتناب ناپذیر می باشد. با این حال، ذولفقار و همکاران (Zulfiqar *et al.*, 2009) در آووکادو، سنودن و همکاران (Snowden *et al.*, 2005) که در گیاهان متفاوت و بسته به جایگاه جوانه ها در روی ساقه با نسبت های متفاوتی از سایتوکینین ها و اکسین ها فعال می شوند و سطح بالای اکسین های درون زا می توانند به عنوان بازدارنده ساقه زایی عمل کنند. بنابراین سایتوکینین ها به

جدول ۲: جدول مقایسه میانگین تأثیر تنظیم کننده های رشد بر میانگین تعداد و طول نوساقه

Table 2: Effect of plant growth regulators on mean number and length of shootlet

غلظت هورمون (mg) Hormone concentration		تعداد نوساقه Shootlet Number	طول نوساقه (mm) Shootlet Length
BAP	IBA		
0.25	0	0.250±0.118f	2.250±0.281d
0.25	0.05	1.500±0.158abcd	4.062±0.432bc
0.25	0.1	1.687±0.176 abc	5.312±0.545ab
0.25	0.2	1.750±0.170 abc	4.750±0.445abc
0.5	0	1.375±0.286bcd	4.562±0.632abc
0.5	0.05	2.125±0.221a	5.062±0.469abc
0.5	0.1	2.125±0.286a	6.187±0.659a
0.5	0.2	2.00±0.258ab	5.312±0.560ab
1	0	0.937±0.213ed	4.250±0.608bc
1	0.05	1.375±0.179 bcd	4.937±0.495abc
1	0.1	1.312±0.236cd	4.687±0.530abc
1	0.2	0.437±0.128f	3.375±0.314cd

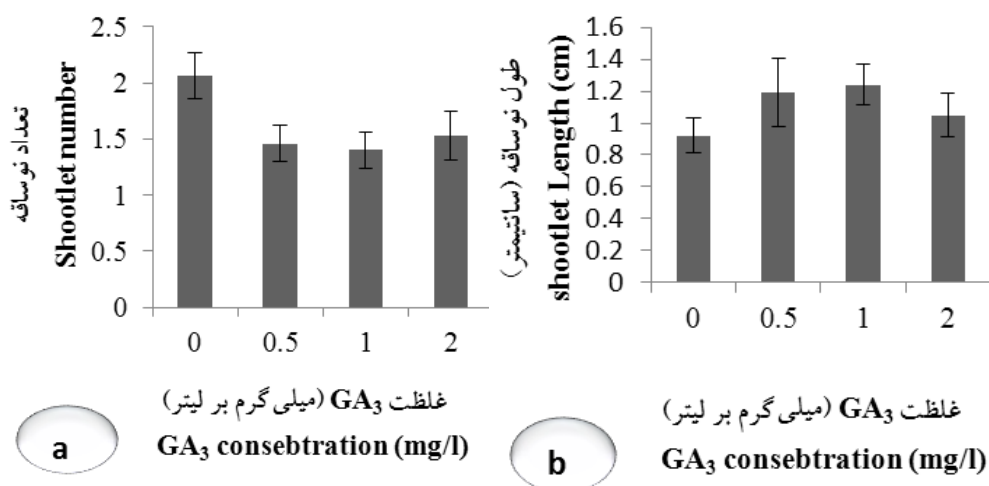
حروف مشابه نشانگر تفاوت معنی دار در سطح ۵٪ توسط آزمون دانکن

Same letters are non significant at 5% by Duncan test

حسینی و همکاران (Hosseini *et al.*, 2011) نیز در بررسی خود اثر GA_3 روی پرآوری *P. mahleb* را منفی گزارش کردند. اندرسون و همکاران (Anderson *et al.*, 1982) در پژوهش خود به بررسی تأثیر تنظیم‌کننده‌های رشد بر ریزازدیادی توت‌فرنگی پرداختند. نتایج آن‌ها با مشاهدات به‌دست آمده این آزمایش مبنی بر کاهش تعداد نوساقه (شکل ۲-ا) و کاهش طول آن‌ها (شکل ۲-ب) در اثر به‌کارگیری جیبرلیک‌اسید مطابقت دارد. به‌ر حال نتایج این آزمایش نشان داد که GA_3 هورمون مؤثری بر پرآوری تعداد نوساقه و افزایش طول آن‌ها در پایه رویشی سنت‌جولین نمی‌باشد. با توجه به امکان وجود اثر متقابل هورمون‌ها بر یکدیگر، شایسته است سه هورمون در ترکیب با هم نیز مورد مطالعه قرار گیرد.

تأثیر جیبرلیک‌اسید

با توجه به طول نسبتاً کوتاه نوساقه‌ها در محیط حاوی غلظت بهینه BAP و IBA، تأثیر اسیدجیبرلیک بر صفات طول و تعداد نوساقه مورد مطالعه قرار گرفت. تجزیه واریانس داده‌ها نشان‌دهنده‌ی عدم اختلاف معنی‌دار در غلظت‌های مختلف GA_3 در صفات یاد شده در مقایسه با شاهد (محیط فاقد GA_3) بود (جدول ۱). میانگین داده‌ها نشان داد که بلندترین نوساقه‌ها (۱/۲۴ سانتیمتر) در محیط حاوی ۱ میلی‌گرم GA_3 و بیشترین تعداد نوساقه ($2/06 \pm 0/20$) در محیط فاقد GA_3 حاصل به‌دست آمد و افزایش هورمون موجب کاهش اندازه هر دو صفت شد (شکل ۲-ا و b). پروسکی و همکاران (Pruski *et al.*, 2000) در مطالعه‌ای روی ارقام گیلاس نتایج مشابهی مبنی بر تأثیر بازدارنده این هورمون بر ساقه‌زایی گزارش کردند.



شکل ۲: تأثیر جیبرلیک‌اسید بر میانگین (a) تعداد نوساقه و (b) طول نوساقه در محیط MS حاوی BAP و IBA به‌ترتیب ۰/۵ و ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر

Fig. 2: Effect of GA_3 on, a) shootlet Number per explants and b) shootlet Length on MS containing BAP and IBA at concentration of 0.5 and 0.2 mg/l respectively

میلی‌متر) در محیط‌کشت حاوی ۳۰ گرم در لیتر ساکارز مشاهده شدند. یونس و همکاران (Younas *et al.*, 2007) نیز خود ترکیبی از گلوکز و ساکارز به‌نسبت ۱/۱۵ / ۱/۱۵ را برای تکثیر ساقه با کیفیت مناسب را در پایه GF677 تشخیص دادند، ولی آن‌ها در مطالعه رشد طولی بیشینه نوساقه‌ها را در محیط حاوی ۲۰٪ گلوکز مشاهده کردند. ابو ریا و همکاران (Abou Rayya *et al.*, 2011) در مطالعه انفرادی قندهای متفاوت، به‌ترتیب قندهای گلوکز، ساکارز و فروکتوز را در پرآوری ساقه و طول بادام تلخ مناسب گزارش کردند، درحالی‌که در بین آنها ساکارز تأثیر بهتری در کیفیت رشد داشت.

تأثیر نوع منبع کربن بر پرآوری و طول نوساقه

تجزیه آماری داده نشان داد که اثرات مستقل و متقابل هر دو قند ساکارز و گلوکز در سطح ۱٪ معنی‌دار می‌باشد (جدول ۱). در محیط حاوی ترکیبی از دو قند با غلظت برابر (۲۰ گرم در لیتر) بیشترین متوسط تعداد نوساقه در هر ریزنمونه ($2/23 \pm 0/23$) مشاهده شده شد (جدول ۳). هرچند که این تعداد با متوسط تعداد نوساقه‌ها به‌دست آمده در محیط حاوی ۲۰ میلی‌گرم در لیتر گلوکز و یا به‌طور نسبی با سایر تیمارها تفاوت معنی‌داری نداشت ولی کیفیت رشد نوساقه‌ها در این تیمار به‌مراتب بهتر از سایر تیمارها بود. بلندترین نوساقه‌ها ($8/50$)

ریزازدیادی نوساقه در زیتون دیده شد که به ترتیب مانیتول و ساکارز بیشترین تعداد نوساقه را تولید کرده ولی محیط حاوی ساکارز نوساقه‌های سالم‌تری تولید می‌کند گارسیا و همکاران، قانع گلمحمدی و همکاران (Garcia et al., 2002) و Ghane (Golmohammadi et al., 2012). زارعی و همکاران (Zarei et al., 2012) نیز در مطالعه تأثیر انواع منابع کربوهیدرات در ریزازدیادی پایه گزیلا ۶ (Gesila6) بیشترین تعداد و طول نوساقه‌ها به ترتیب در محیط‌های حاوی ۳۰ گرم در لیتر شکر معمولی و ساکارز مشاهده کردند: ولی ناچوا و گرچوا (Nacheva and Gercheva, 2009) در پرآوری پایه رویشی Gisela5 ترکیب ساکارز با سوربیتول به نسبت ۲ به ۱ را در بیشترین نرخ تکثیر و طول نوساقه مؤثر دانستند. بنابراین به نظر می‌رسد که گیاهان واکنش‌های متفاوتی نسبت به منابع کربوهیدرات، به ویژه ترکیب آن‌ها با ساکارز به عنوان منبع انرژی از خود نشان می‌دهند که باید بیشتر مورد بررسی قرار گیرد.

تحریک ریشه‌زایی

نتایج کیفی نشان داد که شادابی گیاهچه‌ها در روش پالسینگ به مراتب بالاتر از روش معمولی بوده و IBA مؤثرتر از NAA در تحریک ریشه‌زایی عمل می‌کند. لذا در اینجا تنها داده‌های مربوط به پیش تیمار IBA ذکر شده است. نتایج تجزیه واریانس نشان داد که مدت زمان پیش تیمار IBA در هر دو صفت تعداد و درصد ریشه‌زایی در سطح ۱٪ معنی‌دار می‌باشد (جدول ۴). بیشترین تعداد ریشه ($1/82 \pm 0/06$) در تیمار زمانی ۲۰ دقیقه و کمترین مقادیر در تیمارهای ۵ ثانیه و ۵ دقیقه مشاهده شد (شکل ۳-ا). افزایش تعداد ریشه در تیمار IBA ممکن است به علت تغییر در فعالیت بافت کامبیوم در پاسخ به تیمار IBA باشد دیگی و وانگرم (Digby and Wangermann, 1965). ولاندر (Welander, 1983) افزایش تعداد ریشه را در به کارگیری IBA نتیجه افزایش قابلیت ارتجاعی بافت کامبیوم و افزایش سرعت تقسیم سلولی در ریزنمونه‌های به کار گرفته شده بیان کرد. در تیمار با NAA بیشترین تعداد ریشه (۲/۴۳) در مدت زمان ۵ دقیقه مشاهده شد و با افزایش زمان پالسینگ کاهش یافت. بیشترین درصد ریشه‌زایی (۰/۷۷/۲۸) در تیمار IBA با ۱۰ دقیقه پالسینگ (شکل ۳-ب) و در تیمار NAA به ۲۰ دقیقه پالسینگ (۰/۷۵) اختصاص یافت. تحقیقات نشان می‌دهد که مدت زمان تیمار اکسین در آزمایش‌های ریشه‌زایی به دلیل تأثیر اکسین بر شکل‌گیری ساختارهای اولیه ریشه امری حیاتی است که اثر آن بر ریشه‌زایی تا یک دوره زمانی

افزایشی و از آن به بعد به عنوان عامل محدودکننده ریشه‌زایی به شمار می‌رود ترسو و همکاران (Tereso et al., 2008). مشاهده‌ها نشان داد که نوساقه‌های تیمار شده با IBA کاملاً سالم و از نظر کیفی وضعیت مطلوبی داشتند (شکل ۴-ب) در حالی که تیمار NAA با افزایش مدت زمان تأثیر نامطلوبی بر شکل ظاهری و رشد طبیعی نوساقه‌ها داشت (شکل ۴-ا). به نظر می‌رسد که علائم فوق به علت خارج کردن نوساقه از داخل محیط کشت و قرار دادن در محلول ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر NAA، علاوه بر افزایش خطر آلودگی گیاه، به علت شوک وارد شده به گیاه ناشی از تغییر محیط، همچنین تأثیر سمی NAA در غلظت‌های بالا باشد که علاوه بر کاهش عملکرد ریشه‌زایی لین (Lane, 1979) بر کیفیت نوساقه‌ها نیز تأثیر می‌گذارد.

گیاهچه‌های ریشه‌دار شده با وضعیت مطلوب کیفی و رشد مناسب ریشه (شکل ۴-ج) جهت سازگاری انتخاب و به گلدان‌های حاوی مخلوط پرلیت/پیت‌ماس، به نسبت ۱/۳ در داخل اتاقک سازگاری با رطوبت بالا و شرایط نوری مشابه اتاق رشد منتقل شدند. پس از گذشت ۱ هفته به تدریج رطوبت اتاقک رشد را در طول ۳ هفته کاهش داده تا پس از تشکیل لایه کوتیکول بر سطح بافت به تدریج در معرض نور طبیعی خورشید قرار گرفتند. چهار هفته پس از شروع عملیات سازگاری نهال‌ها به طور کامل از اتاقک سازگاری خارج و در گلخانه مستقر شدند (شکل ۴-د). راندمان سازگاری در گذر از مراحل فوق معادل ۶۰٪ به ثبت رسید.

جدول ۳: جدول مقایسه میانگین تأثیر منبع کربن بر میانگین تعداد و طول نوساقه

Table 3: Effect of carbon source on mean number and length of shootlet

غلظت منبع کربن (g/l)		تعداد نوساقه	طول نوساقه (mm)
Carbon source concentration		Shootlet Number	Shootlet Length
گلوکز (glucose)	ساکارز (sucrose)		
0	0	1.00b	1.50±0.18d
	10	1.38±0.13ab	2.88±0.20c
	20	1.99±0.13a	5.63±0.52b
	30	1.75±0.14ab	8.50±0.71a
10	0	1.25±0.11b	3.33±0.57c
	10	1.500±0.20ab	5.56±0.75b
	20	1.60±0.13a	7.13±0.52a
	30	1.82±0.18a	6.18±0.44ab
20	0	2.13±0.20ab	6.38±0.35b
	10	1.63±0.15bc	5.44±0.34c
	20	2.66±0.23a	7.81±1.52a
	30	1.44±0.13c	5.19±0.26c
30	0	1.69±0.15a	4.44±0.46b
	10	1.56±0.20a	5.00±0.52b
	20	1.60±0.13a	8.13±0.65a
	30	1.65±0.17a	5.71±0.60b

حروف مشابه نشانگر تفاوت معنی دار در سطح ۵٪ توسط آزمون دانکن

Same letters are non significant at 5% by Duncan test

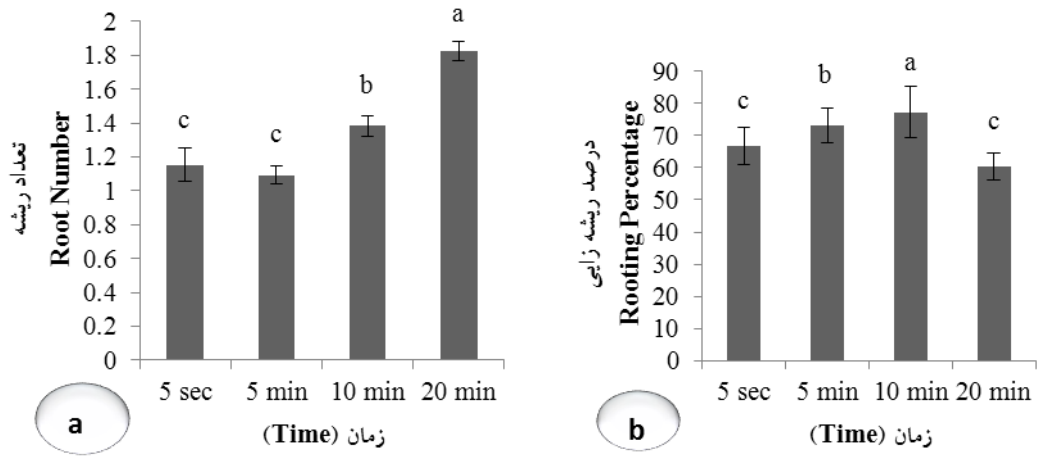
جدول ۴: تجزیه واریانس در روش پالسینگ IBA در ریشه‌زایی

Table 4: Analysis of variance for the effect of IBA pulsing method on rooting.

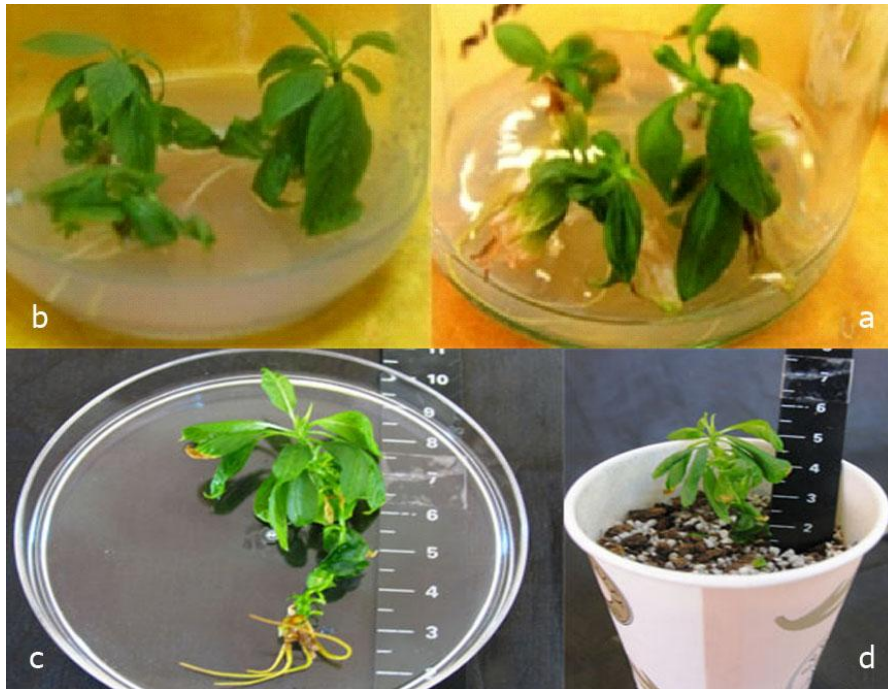
منبع تغییرات S.O.V.	درجه آزادی df	میانگین مربعات (MS)	
		درصد ریشه‌زایی Rooting percentage	تعداد ریشه Root Number
زمان پالس (Pulse time)	3	0.033**	1.760**
خطای نمونه‌برداری (Sampling error)	12	0.053	0.043
خطای کل (Total error)	48	0.059	0.098
ضریب تغییرات (CV)٪	-	3.39	23.003

** : معنی دار در سطح احتمال ۱٪.

** : Significant at 1% probability level respectively



شکل ۳: تأثیر مدت زمان پیش تیمار IBA بر (a) تعداد ریشه و (b) درصد ریشه زایی
 Fig. 3: Effect of IBA pretreatment time on, a) Root Number and b) Rooting Percentage



شکل ۴- (a) گیاهچه ریشه دار شده با NAA، (b) گیاهچه ریشه دار با IBA، (c) گیاهچه ریشه دار انتخاب شده جهت سازگاری، (d) گیاهان سازگار شده انتقال یافته به گلخانه

Fig. 4: a) Rooted explants by NAA, b) Rooted explants by IBA, c) Rooted explants selected for acclimatization and d) acclimatized plants transferred to greenhouse

منابع:

جهت ملاحظه منابع به صفحه های ۳-۵ متن انگلیسی مراجعه شود.