مطالعه تاثیر پکتین، نوع محیط کشت و تنظیم کننده های رشد گیاهی در ازدیاد پایه هیبرید GF677 در شرایط درون شیشه

اسمعیل نظامی آلانق[1]، قاسمعلی گروسی[2*]، رحیم حداد[2]، محمد بابایی[3]

[1] کارشناس ارشد گروه بیوتکنولوژی کشاورزی دانشگاه بین المللی امام خمینی (ره)
[2] عضو هیأت علمی گروه بیوتکنولوژی کشاورزی دانشگاه بین المللی امام خمینی (ره)
[3] کارشناس ارشد مؤسسه تحقیقات علوم دامی کرج

چکیده

پایه هیبرید رویشی GF677 یکی از پایه های رویشی مناسب برای بادام و هلو در دنیا بوده و تکثیر انبوه آن مورد نیاز مبرم می باشد. برای تکثیر آن در شرایط درون شیشه (*in vitro*) بیشتر از محیط کشت MS استفاده می شود که با برخی مشکلات از جمله نرخ پایین نوساقه زایی، شیشه ای و رزت شدن نوساقه ها همراه می باشد. به منظور حل مشکل مذکور، تاثیر 3 غلظت پکتین، 3 نوع محیط کشت و همچنین 3 نوع تنظیم کننده رشد گیاهی در غلظت های مختلف در قالب طرح فاکتوریل با تکرارهای متفاوت، تحت شرایط درون شیشه و با استفاده از جوانه های جانبی، روی میزان نوساقه زایی نابجا و کیفیت رشد آنها مورد مطالعه قرار گرفت. نتایج نشان داد که نرخ نوساقه زایی در محیط کشت های TK و WPM حاوی پکتین، بالا و در محیط کشت MS حاوی پکتین، پایین بوده ولی در مقابل سرعت و کیفیت رشد طبیعی نوساقه ها در آنها معکوس می باشد. تیمار 0/25 میلی گرم در لیتر BAP با 0/5 میلی گرم در لیتر ZR در محیط کشت MS حاوی 0/5%پکتین بهترین تیمار هورمونی در رابطه با میزان نوساقه زایی و رشد طبیعی را به نمایش گذاشت که در آن به نظر می رسد BAP بیشتر مسئول نوساقه زایی و رشد طبیعی برگها بوده و ZR مسئول رشد می انگره و افزایش طول نوساقه ها می باشد. به هرحال IBA نسبت به دو هورمون دیگر نقش معنی داری در رابطه با صفات مذکور از خود نشان نداد.

واژه های کلیدی: پکتین، *تنظیم کننده های رشد گیاهی*، *ریز ازدیادی*، *GF677*.

* نویسنده مسئول: قاسمعلی گروسی تلفن: 02818371468-9 Email: ghasemali1340@yahoo.com

مقدمه

پایه هیبرید رویشی GF677، هیبرید طبیعی بین بادام و هلو می باشد که توسط Bernhard در ایستگاه تحقیقاتی Ferrad فرانسه در سال 1965 تحقیقات بر روی آن شروع شد (Tsipouridis and Thomidis, 2003). دو رگه GF677 تجانس خوبی با هلو و بادام داشته و علاوه بر این که مقاوم به بیماری غربالی فوزیکوکوم بیماری ویروسی آبله ای است (Radnia, 1997)، در خاک های فقیر، آهکی و نیز زمی ن های خشک قابل کشت بوده و متحمل به کمبود آهن می باشد (Syrgiannidis, 1985; Antonopoulou, 2005). با وجود این، ازدیاد GF677 از طریق قلمه های علفی و نیمه خشبی در شرایط مه افشان و یا با استفاده از قلمه های خشبی به سختی قابل انجام است (Tsipouridis and Thomidis, 2003). اولین گزارش در مورد کشت درون شیشه ای این پایه رویشی توسط Kester در سال 1970 ارائه شد. سپس Tabachnik and Kester (1977) کشت درون شیشه ای بادام و دورگه های هلو و بادام را در شرایط درون شیشه ای مورد بررسی قرار دادند. به منظور ریزازدیادی این پایه رویشی محیط کشت های مختلفی از جمله MS[1]، TK[2] و WPM[3] مورد بررسی قرار گرفته است. استفاده از محیط کشت MS همراه با شیشه ای شدن نوساقه ها و کلروزگی بود (Tsipouridis and Thomidis, 2003; Kamali *et al*., 2002). میزان نوساقه زایی در محیط کشت TK برخلاف رشد نرمال سرعت رشد پایینی داشته (Kamali *et al*., 2002; Rugininand Verema, 1982) و WPM منجر به زردی و ریزش برگی در نوساقه های تولید شده در واکشت های بعدی گردید (Markafshi, 2007). در نوساقه زایی بادام Rugini and Verema (1982) بر پایه محیط کشت MS با استفاده از پکتین با مقدار ثابت (0/5 درصد) توانست تا حدودی مشکل شیشه ای شدن نوساقه ها را رفع نماید. در مرحله ازدیاد جنس Prunus در شرایط درون شیشه استفاده از BAP[4] (Wagner-Junior *et al*., 2003; Akba *et al*., 2009; ZOU, 2010; Nuri Nas *et al*., 2010) و هورمون های طبیعی همراه با غلظت های پایین اکسین استفاده می گردد. در این مطالعه به منظور دستیابی به ریزازدیادی نوساقه های نابجای مطلوب با رشد طبیعی، تاثیرمتقابل مقادیر مختلف پکتین و برخی از محیط کشت های رایج از جمله MS در دو غلظت(1/2 و کامل)، WPM و TK و همچنین تاثیرمتقابل دو نوع سیتوکنین ZR[5] و BAP (به ترتیب با منشا طبیعی و مصنوعی) در حضور IBA[6] روی کیفیت رشد رویشی و میزان نوساقه

[1] Murashige and skoog
[2] Tabachnic and Kester
[3] Woody plant medium
[4] 6-benzylaminopurine
[5] Zeatin Ribosoid
[6] Indole-3-butyric acid

زایی هیبرید پایه رویشی یادشده مورد مطالعه قرار گرفت.

مواد و روشها

ضد عفونی و استقرار ریزنمونه در شرایط درون شیشه

به منظور تهیه ریزنمونه در اردیبهشت ماه از جوانه های جانبی و انتهایی شاخه های سال درختان 14 ساله پایه هیبرید GF677 (ایستگاه تحقیقاتی سهند، مرکز تحقیقات کشاورزی استان آذربایجان شرقی- ایران)، استفاده گردید. قطعات ساقه دارای 2-1 جوانه حدود 2 ساعت در زیر آب جاری شستشو، سپس با الکل 96 درصد به مدت 3-4 ثانیه، کلرید جیوه 0/05 درصد به مدت 3-4 دقیقه، هیپوکلریت سدیم 10 درصد حجمی (حاوی 5/25 درصد هیپوکلریت سدیم) به مدت 10 دقیقه ضدعفونی و نهایتا" 3 مرتبه با آب مقطر استریل شستشو شدند. ریز نمونه ها در محیط کشت TK و یا (به دلیل سرعت پایین رشد نوساقه ها در محیط کشت TK) ترجیحاً محیط کشت MS با 0/5 درصد پکتین (Rugini and Verema, 1982) همراه با 20 گرم در لیتر ساکارز، 1میلی گرم در لیتر BAP (Kamali *et al.*, 2002) و 0/7 درصد آگار، که پس از تنظیم pH= 5/7 اتوکلاو شده بود، کشت و در اتاق رشد تحت شرایط محیطی با دمای 25 ±2°c و 8 / 16 ساعت تاریکی/ روشنایی با لامپ های سرد- سفید فلوروسنت (65/5 $\mu mol/m^2/s$) نگهداری شدند. به منظور ازدیاد ریز نمونه، هر 25 روز و به مدت 3 ماه ساقه های به طول 0/5 تا 1 سانتی متر رشدیافته درهر دو محیط کشت، به قطعات کوچک حامل 1-2 جوانه تقسیم و در محیط کشت با ترکیبات یاد شده واکشت گردیدند. تمامی آزمایش ها در شرایط محیطی یاد شده صورت گرفته و در تمامی آزمایش ها یادداشت برداری ها بعد از یک مرتبه واکشت (25 روز به ازای هر واکشت) در تیمارهای مربوطه انجام گردید. تمامی آزمایش ها به صورت فاکتوریل با تکرارهای متفاوت و در قالب طرح کامل تصادفی مورد مطالعه قرار گرفت.

1- واکنش ریز نمونه های حاصل از محیط کشت های حاوی پکتین و بدون پکتین (به عنوان پیش تیمار) به محیط کشت های MS، 1/2MS، WPM و TK از نظرکیفیت رشد رویشی و میزان نوساقه زایی.

الف) نوساقه های رشد یافته در محیط کشت حاوی پکتین

در این بررسی از قطعات نوساقه حاوی 2-1 جوانه حاصل از نوساقه های رشد یافته در محیط کشت MS حاوی 0/5 درصد پکتین به عنوان منبع ریزنمونه با هدف بررسی تاثیر محیط کشت های MS (کامل و نصف غلظت)، WPM و TK همراه با BAP در دو غلظت صفر و 1

میلی گرم روی میزان نوساقه زایی و همچنین کیفیت رشد رویشی استفاده گردید. به ازای هر تیمار 10 ریزنمونه کشت و صفاتی از قبیل میزان نوساقه زایی، رشد طولی و وضعیت ظاهری رشد مانند شادابی، زردی، بدشکلی برگی مورد مطالعه قرار گرفت.

ب) ریز نمونه های رشد یافته در محیط کشت بدون پکتین

در این آزمایش از قطعات نوساقه حاوی 1-2 جوانه رشد یافته در نمک غذایی TK به عنوان منبع ریزنمونه با 10ریز نمونه برای هر تیمار استفاده گردید. شرایط آزمایش شبیه آزمایش 1-الف بود.

2- بررسی اثر متقابل پکتین و محیط کشت روی میزان نوساقه زایی و کیفیت رشد رویشی نوساقه ها

در این بررسی تاثیر پکتین با غلظت های 0/5، 0/75 و 1 درصد و محیط کشت های MS (کامل و نصف غلظت)، WPM و TK در شرایط هورمونی صفر و 1 میلی گرم در لیتر BAP با استفاده از قطعات نوساقه (حاوی 1-2 جوانه) رشد یافته در محیط کشت MS حاوی 0/5 درصد پکتین به عنوان منبع ریزنمونه (با 7 ریز نمونه به ازای هر تیمار) مورد مطالعه قرار گرفته و صفات ذکر شده در آزمایش 1-الف بعد از یک بار واکشت یادداشت برداری گردید.

3- مطالعه اثر تنظیم کننده های رشدی روی جنین زایی سماتیکی

با توجه به مناسب شناخته شدن نمک غذایی MS همراه با 0/5 درصد پکتین بر روی کیفیت رشد نوساقه ها در آزمایش های قبلی، در این مطالعه اثرات متقابل هورمون های BAP × IBA، Z R × IBA و BAP × ZR به صورت فاکتوریل در غلظت های متفاوت (جداول 1، 2 و 3) بر میزان پرآوری جوانه های نابجا بررسی گردید. بدین منظور از جوانه جانبی ساقه های رشد یافته در محیط کشت MS حاوی 0/5 درصد پکتین استفاده شده و به ازای هر تیمار 7 ریزنمونه کشت و صفات ذکر شده در آزمایش 1-الف بعد از یک بار واکشت یادداشت برداری گردید.

تجزیه تحلیل های آماری

آزمایش ها به صورت فاکتوریل در قالب طرح کامل تصادفی طراحی و انجام شدند. برای تجزیه و تحلیل داده ها از نرم افزارهای آماری SAS 9.1 استفاده شد و مقایسه میانگین ها با آزمون دانکن در سطح $\alpha=0/05$ بررسی گردید.

نتایج

واکنش نوساقه ها به محیط کشت های MS، 1/2MS، WPM و TK همراه با پیش تیمار پکتین و بدون پیش تیمار با پکتین

الف) تاثیر نوع محیط کشت روی کیفیت رشد رویشی و میزان نوساقه زایی بعد از پیش تیمار با پکتین

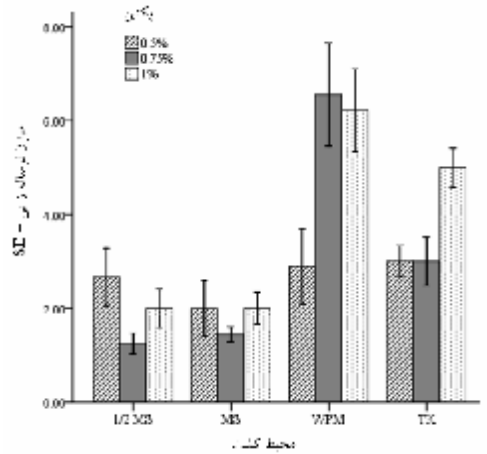
بعد از پیش تیمار نوساقه ها به مدت 3 دوره واکشت (هر دوره 25 روز) در محیط کشت MS حاوی 0/5 درصد پکتین، با واکشت مجدد آن ها در محیط کشت های مزبور بدون پکتین، نتایج جالب توجهی در کیفیت رشد رویشی به دست آمد. به طوری که در حضور 1 میلی گرم در لیتر BAP، اختلاف معنی داری ما بین محیط کشت های یاد شده روی میانگین نوساقه های تولید شده وجود نداشت و بیشتر نوساقه های تولید شده رشد نرمالی داشتند. با بازکشت مجدد نوساقه های رشد یافته در محیط کشت های مربوطه به جز نوساقه های رشد یافته در محیط کشت TK، نوساقه های رشد یافته در سایر تیمار ها شیشه ای شده و از بین رفتند و در محیط کشت TK علیرغم رشد طبیعی نوساقه ها از سرعت رشد پایینی برخوردار بودند. در شرایط بدون هورمونی، بیشتر نوساقه ها در محیط کشت MS علی رغم رشد رزت وار بیشترین رشد را داشته و برگ هایشان به طور کامل و طبیعی، توسعه یافته و همچنین از نظر میزان سبزینگی و شادابی در وضعیت بسیار مطلوبی قرار داشتند. میزان توسعه یافتگی برگی نوساقه ها در محیط کشت 1/2MS نسبت به محیط کشت MS کمتر و قابل مقایسه با دو نوع محیط کشت WPM و TK بوده و از نظر سبزینگی و شادابی شباهت زیادی با نوساقه های رشد یافته در محیط کشت MS داشت. نوساقه های رشد یافته در محیط کشت های WPM وTK به لحاظ کیفیت رشد رویشی مشابه هم بوده و سبزینگی و شادابی متعادلی را به نمایش گذاشتند. با بازکشت مجدد نوساقه ها در محیط کشت های مربوطه عاری از BAP رشد قابل ملاحظه ای دیده نشده و نهایتا از بین رفتند.

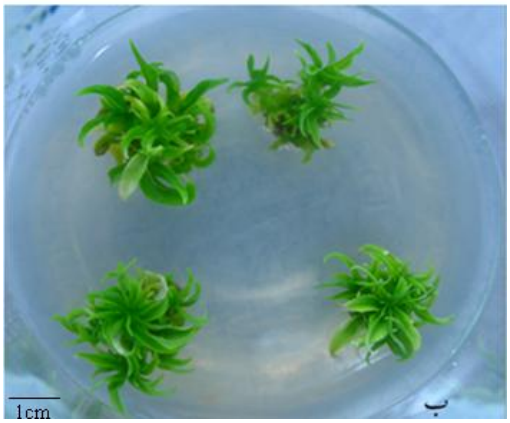
ب) تاثیر نوع محیط کشت روی کیفیت رشد رویشی و میزان نوساقه زایی بدون پیش تیمار با پکتین

در محیط های حاوی BAP، با توجه به حساس بودن نوساقه ها به نوع محیط کشت، در محیط کشت MS، 1/2MSو WPM نوساقه ها زرد، بدشکلی و شیشه ای شده و نهایتا از بین رفتند. در نمک TK نیز رشد گیاهچه ها طبیعی ولی کند بوده و بعد از چندین دوره واکشت به منظور ازدیاد، 30 تا 40 درصد بدشکلی برگی قابل ملاحظه بود. در محیط های حاوی BAP بیشتر نوساقه ها رشد ضعیف همراه با زرد شدگی را نشان داده که در بازکشت مجدد همگی از بین رفتند.

بررسی اثر متقابل پکتین و محیط کشت روی میزان نوساقه زایی و کیفیت رشد رویشی نوساقه ها

نوساقه های رشد یافته در محیط کشت های 1/2MS و MS حاوی 0/5 درصد پکتین در غیاب BAP کیفیت رشد رویشی مطلوبی داشته و با افزایش غلظت پکتین از کیفیت رشد رویشی نوساقه ها کاسته شد. همچنین در محیط کشت های WPM و TK بین 3 غلظت پکتین تفاوت رشدی قابل ملاحظه ای مشاهده نگردید و در مقایسه با محیط کشت MS رشد سطح برگی کاهش نشان داد (داده ها نشان داده نشده است). در حضور BAP بیشترین میزان نوساقه زایی در محیط کشت WPM همراه با 0/5 و 0/75 درصد پکتین دیده شد (شکل-1 الف) ولی میزان رشد و توسعه یافتگی برگی در این تیمار ها کم، و بیشتر شان ریز و کلروزه شده بودند. کیفیت نوساقه های رشد یافته در محیط کشت های 1/2MS و MS حاوی 0/5 درصد پکتین با وجود میزان نوساقه زایی پایین با هم قابل مقایسه بوده و نوساقه های تولید شده در نمک MS با 0/5 درصد پکتین نسبت به سایر تیمارها از کیفیت رشد رویشی مطلوبی برخوردار بودند (شکل 1ب). نوساقه های رشد یافته در محیط کشت TK با وجود رشد طولی و نوساقه زایی بالا در تمامی سطوح پکتین، منجر به تولید برگ های ریز و شیشه ای گردید.





شکل 1- تاثیر متقابل نوع محیط کشت و پکتین روی نوساقه زایی GF677. الف) غلظت های مختلف پکتین در حضور 1 میلی گرم در لیتر BAP، ب) محیط کشت MS حاوی 0/5 درصد پکتین و1 میلی گرم در لیتر BAP.

Figure 1- The reciprocal effect of medium type and pectin on GF677 shoots regeneration. a) different concentrations of pectin in presence of 1 mg/l BAP, b) Shooting on MS medium supplemented with 0.5% pectin and 1mg/l BAP.

اثر تنظیم کننده های رشد روی نوساقه زایی

در بررسی تاثیر هورمون های IBA و BAP روی نوساقه زایی، همان طور که در جدول 1 دیده می شود بیشترین میزان نوساقه زایی، با 0/98±5/5 نوساقه و بیشترین تعداد جوانه، با 2/69±25/5 جوانه به ازای هر ریز نمونه در تیمار به ترتیب 0/75 و صفر میلی گرم در لیتر هورمون های BAP و IBA به دست آمد. در تیمار مذکور نوساقه هایی با رشد نرمال و برگ های توسعه یافته و پهن تولید گردید. با افزایش غلظت هورمون BAP نه تنها میزان ساقه زایی کاهش یافت، بلکه نوساقه ها شیشه ای شدند. از نظر میزان رشد سطح برگی، بیشترین رشد در تیمار شاهد (بدون هورمون) دیده شد که بیانگر تاثیر منفی این هورمون ها در رشد سطح برگی است. بیشترین رشد طولی تا 0/5 سانتی متر در تیمار هورمونی 0/5 میلی گرم در لیتر BAP به دست آمده و در سایر تیمار ها نوساقه ها رشد رزت گونه داشتند. در ارتباط با تاثیر هورمون های IBA و ZR روی نوساقه زایی غالب نوساقه ها رشد تک ساقه داشته و اختلاف معنی داری بین غلظت های مختلف هورمونی مشاهده نگردید (داده های جداول تجزیه واریانس ارایه نشده است). با این حال، بیشترین تعداد جوانه (2/29±15/25) در تیمار 1 میلی گرم در لیتر ZR همراه با 0/1 میلی گرم در لیتر IBA تولید گردید که اختلاف معنی داری با سایر تیمارها داشت. رشد طولی تا 0/7 سانتی متر در سطوح مختلف هورمون ZR به دست آمد (جدول 2). مطالعه اثر متقابل ZR با BAP در غلظت های مختلف آنها نشان داد که مقادیر مختلف ZR در سطوح پایین از هورمون BAP (0/25 میلی گرم در لیتر)، تاثیر قابل توجهی روی نوساقه زایی دارد، به طوری که بیشترین میزان نوساقه زایی با میانگین 1/58±5/66 و 0/84 ± 5/5 در ترکیب BAP و ZR با غلظت های به ترتیب 0/25 با 0/5 و 0/5 با 1 میلی گرم در لیتر و بیشترین تعداد جوانه (3/07±25/5) در ترکیب هورمونی BAP و ZR به ترتیب با 0/7 و صفر میلی گرم در لیتر حاصل گردید. همان طور که در جدول 3 مشاهده می شود، بر خلاف BAP نقش ZR به تنهایی در نوساقه زایی کمتر می باشد. در ارتباط با تاثیر متقابل این هورمون ها روی نوساقه زایی، رشد رزت وار در غالب تیمارها وجود داشته و رشد طولی تا 0/7 سانتیمتر در سطوح مختلف ZR تولید گردید (جدول 3).

جدول 1- تاثیر BAP و IBA روی نوساقه زایی GF677*.

IBA (mg/l)	BAP (mg/l)	میانگین تعداد نوساقه تولید شده به ازای هر ریز نمونه±SE Mean number of produced shoo-let/expant± SE	میانگین تعداد جوانه به ازای هر ریزنمونه±SE Mean number of produced bud /explant± SE	رشد طولی نوساقه (سانتی متر) Shoot-let growth length (cm)
0	0	0.0±0.0[c]	6.67±2.68[d]	-
0	0.5	1.83±0.53[bc]	8.67±2.68[cd]	0.5
0	0.75	5.50±0.98[a]	25.50±2.69[a]	-
0	1	3.33±0.55[ab]	15.00±2.68[bc]	-
0	2	3.60±0.84[ab]	13.20±2.94[bcd]	-
0.01	0.5	2.66±0.62[b]	12.00±3.80[bcd]	-
0.01	0.75	4.0±0.98[ab]	25.20±2.94[a]	-
0.01	1	4.16±0.16[ab]	18.50±2.68[ab]	-
0.01	2	2.20±0.44[b]	8.80±2.94[cd]	-
0.1	0.5	3.66±0.55[ab]	18.67±2.68[ab]	-
0.1	0.75	2.66±0.76[b]	15.50±2.68[bc]	-
0.1	1	4.00±0.76[ab]	15.00±2.94[bc]	-
0.1	2	3.00±0.81[b]	8.50±4.60[cd]	-

*مقادیر با حروف مختلف در هر ستون نشان دهنده اختلاف معنی دار بر اساس روش دانکن در سطح α=0/05 است.

Table 1- The effect of BAP and IBA on shoot regeneration of GF677*.

*Values with different letters in the same column indicate significant difference based on Douncan method at α=0.05.

بحث و نتیجه گیری

در این مطالعه ابتدا به منظور تعیین محیط کشت پایه مناسب، تاثیر نمک های پایه 1/2MS، MS، WPM و TK و همچنین غلظت های مختلف پکتین در رشد ریزنمونه های GF677 بررسی گردید و در مرحله دوم تاثیر دو نوع سیتوکنین (با منشا طبیعی و مصنوعی) و همچنین اثرات متقابل این دو نوع هورمون همراه با غلظت های متفاوت

IBA برای تکثیر پایه رویشی یاد شده مطالعه شد. نتایج نشان داد که با توجه به حساسیت GF677 به نوع محیط کشت، وجود پکتین برای رشد طبیعی برگ ها ضروری است و در صورت عدم استفاده از پکتین گیاهان فقط در محیط کشت TK رشد نسبتا نرمالی داشتند. در مطالعه Tsipouridis and Thomidis (2003) در استفاده از محیط کشت MS در تکثیر GF677 مشکلاتی از قبیل شیشه ای شدن ساقه ها، درصد پایین ریشه زایی و رزت ماندن گیاهچه ها (بعد از سازگاری) نیز مشاهده گردید. همچنین استفاده از محیط کشت MS در تکثیر بادام رقم Bakuoh junlyou باعث نکروزه و شیشه ای شدن ساقه ها بعد از واکشت های متعدد گردید (Marino *et al.*, 1993).

جدول 2- تاثیر IBA و ZR روی نوساقه زایی GF677*.

IBA (mg/l)	ZR (mg/l)	تعداد نوساقه تولید شده به ازای هر ریز نمونه±SE Mean number of produced shoo-let/expant± SE	تعداد جوانه به ازای هر ریزنمونه±SE Mean number of produced bud /explant± SE	رشد طولی نوساقه (سانتی متر) Shoot-let growth length (cm)
0.0	0.0	0.0±0.0[b]	4.50±1.96[e]	-
0.0	0.50	1.33±0.37[a]	10.16±1.96[abcde]	0.3
0.0	0.75	1.40±0.40[a]	11.00±2.15[abcd]	0.3
0.0	1.00	1.66±0.37[a]	11.67±1.96[abc]	0.7
0.0	2.00	1.00±0.40[ab]	6.60±2.15[bcde]	-
0.01	0.50	1.16±0.37[a]	7.33±1.96[cde]	-
0.01	0.75	2.16±0.37[a]	12.33±1.96[ab]	-
0.01	1.00	1.16±0.37[a]	7.33±1.97[abcde]	-
0.01	2.00	1.29±0.34[a]	6.14±1.83[cde]	-
0.10	0.50	1.33±0.52[a]	5.00±2.77[de]	-
0.10	0.75	1.33±0.52[a]	5.67±2.77[cde]	-
0.10	1.00	1.40±0.40[a]	15.25±2.29[a]	0.3
0.10	2.00	2.00±0.40[a]	12.80±2.15[ab]	0.7

*مقادیر با حروف مختلف در هر ستون نشان دهنده اختلاف معنی دار بر اساس روش دانکن در سطح α=0/05 است.

Table 2- The effect of ZR and IBA on shoot regeneration of GF677*.

*Values with different letters in the same column indicate significant difference based on Douncan method at α=0.05.

جدول 3- تاثیر BAP و ZR روی نوساقه زایی GF677*.

BAP (mg/l)	ZR (mg/l)	میانگین تعداد نوساقه تولید شده به ازای هر ریز نمونه±SE Mean number of produced shoo-let/expant± SE	میانگین تعداد جوانه به ازای هر ریزنمونه±SE Mean number of produced bud /explant± SE	رشد طولی نوساقه (سانتی متر) Shoot-let growth length (cm)
0.0	0.00	0.00 ± 0.00^{h}	4.50 ± 0.307^{h}	-
0.0	0.25	1.20 ± 0.17^{fgh}	9.60 ± 3.37^{gh}	0.5
0.0	0.50	1.33 ± 0.33^{fgh}	10.17 ± 3.07^{gh}	0.3
0.0	0.75	1.40 ± 0.22^{fgh}	11.00 ± 3.36^{fgh}	0.3
0.0	1.00	1.66 ± 0.66^{fgh}	11.67 ± 3.07^{efgh}	0.6
0.25	0.00	2.00 ± 0.62^{defgh}	14.71 ± 2.84^{cdefgh}	0.7
0.25	0.25	2.71 ± 0.83^{cdefg}	14.29 ± 2.84^{cdefg}	-
0.25	0.50	5.66 ± 1.58^{a}	22.17 ± 3.07^{abc}	-
0.25	0.75	4.71 ± 0.60^{abc}	22.14 ± 2.82^{abc}	-
0.25	1.00	1.85 ± 0.43^{defgh}	9.00 ± 2.84^{gh}	-
0.50	0.00	1.71 ± 0.51^{efgh}	7.86 ± 2.84^{gh}	0.5
0.50	0.25	1.33 ± 0.2^{0fgh}	7.33 ± 3.07^{gh}	-
0.50	0.50	1.00 ± 0.00^{gh}	8.25 ± 3.76^{gh}	-
0.50	0.75	4.14 ± 0.54^{abcd}	19.86 ± 2.84^{abcde}	-
0.50	1.00	5.50 ± 0.84^{ab}	24.00 ± 3.07^{ab}	-
0.75	0.00	5.50 ± 0.98^{ab}	25.50 ± 3.07^{a}	-
0.75	0.25	5.20 ± 0.44^{ab}	21.00 ± 3.63^{abcd}	-
0.75	0.50	4.00 ± 0.88^{abcde}	19.00 ± 3.76^{abcdef}	-
0.75	0.75	4.16 ± 0.60^{abcd}	20.50 ± 3.07^{abcd}	-
0.75	1	4.33 ± 0.88^{abc}	24.33±3.07ab	-
1.00	0.00	4.28 ± 0.51^{bcdefg}	15.00 ± 2.84^{cdefg}	-
1.00	0.25	2.60 ± 0.73^{cdefg}	12.40 ± 3.36^{defg}	-
1.00	0.50	2.42 ± 0.65^{cdefg}	13.00 ± 2.84^{defg}	-
1.00	0.75	3.50 ± 1.02^{abcdef}	16.17 ± 3.07^{bcdefg}	-
1.00	1.00	4.00 ± 0.36^{abcdef}	14.00 ± 3.07^{cdefg}	-

*مقادیر با حروف مختلف در هر ستون نشان دهنده اختلاف معنی دار بر اساس روش دانکن در سطح α=0/05 است.

Table 3- The effects of ZR and BAP on shoot regeneration of GF677*.

*Values with different letters in the same column indicate significant difference based on Douncan method at α=05.

Rugini and Verema (1982) در نوساقه زایی بادام رقم Ferragness بر پایه محیط کشت MS با استفاده از پکتین با مقدار ثابت (0/5 درصد) توانستند مشکل شیشه ای شدن نوساقه ها را رفع نمایند. Murai و همکاران (1997) علت مناسب نبودن محیط کشت MS برای تکثیر ساقه های زرد آلو را زیاد بودن سطوح نیتروژن آن دانستند. George (1993)با تنظیم نسبت NO^-_3/NH^+_4 تا میزان زیادی بر این مشکل فائق آمد. در مطالعات دیگر، استفاده از محیط کشت WPM برای تکثیر زردآلو رقم Canino (Snir, 1984) و بادام رقم Bakuoh junlyou (Murai *et al.*, 1997) مناسب شناخته شد. در مقابل Perez-Tornero *et al.* (2000) در تکثیر زرد آلو رقم canino در استفاده از محیط کشت WPM با مشکلات متعددی، از جمله علائم کمبود نمک در برگ ها و مرگ بیشتر جوانه های کشت شده مواجه شدند که این مشکل را با دو برابر کردن عناصر پر مصرف محیط کشت WPM و کاهش مقدار SO^{2-}_4، با حذف K_2SO_4 بر طرف نمودند. Rugini and Verema (1982) علت مناسب نبودن محیط TK برای تکثیر بادام را کمبود عناصر معدنی آن بویژه K^+ و همچنین منابع نیتروژن دانستند که علاوه بر پایین بودن سرعت رشد، ریشه زایی نیز به علت عدم تولید گیاهان قوی، با مشکل روبرو بود؛ لذا محیط کشت MS حاوی 0/5 درصد پکتین را برای ازدیاد سریع و تولید نوساقه های قوی و سالم توصیه کردند. در مطالعه حاضر نیز با استفاده از محیط کشت MS حاوی 0/5 درصد پکتین نوساقه های خوب و سالمی تولید شد. با کشت ریز نمونه های حاصل از این نوساقه ها در محیط کشت های مورد مطالعه عاری از پکتین، نوساقه های جدید در تمامی محیط های کشت، به جز محیط کشت TK از بین رفتند. در مطالعه اثرات متقابل غلظت های مختلف پکتین و انواع محیط کشت روی میزان نوساقه زایی و کیفیت رشد رویشی، اختلاف معنی داری بین محیط کشت و غلظت های مختلف پکتین وجود داشت. به طوری که، در غلظت های بالا پکتین در محیط WPM منجر به تولید ساقه های بیشتر با رشد غیر طبیعی گردید؛ ولی در محیط MS حاوی 0/5 درصد پکتین نوساقه های کمتر با رشد متعادلی تولید شد (شکل 1). در این مطالعه تاثیر IBA و دو نوع سیتوکنین ZR و BAP بر پایه محیط کشت MS حاوی پکتین روی نوساقه زایی مورد بررسی قرار گرفت. بر اساس نتایج به دست آمده، احتمال وجود اختلاف در جذب سیتوکنین ها توسط سلول ها یا مکانیسم عمل سیتوکنین ها در سلول امری بدیهی است. با توجه به نتایج به دست آمده که با گزارش های Ruzic and vujovic (2008) مطابقت داشت، نقش BAP روی نوساقه زایی نسبت به ZR محسوس تر بود (جدول 3). آن ها استفاده از مقادیر بالای سیتوکنین آدنین

دار نسبت به سیتوکنین های با منشا طبیعی را در ازدیاد *Prunus avium* ضروری دانسته بودند. استفاده از مقادیر مختلف هورمون ZR تاثیر ناچیزی در افزایش نوساقه زایی را نشان داد (جداول 2 و 3). چنین نتیجه ای را Kadota and Ruzic Nimi (2003); Murai *et al.*, (1997) و Ansar *et al.*, and Vujovic (2008); (2009) نیز در خصوص تأثیر سایتوکنین های طبیعی در ریز ازدیادی گیاهان چوبی به ترتیب زردآلو (*Prunu armenica*)، ارقام گلابی، رقم Lapins گیلاس (*Prunus avium*) و رقم Moraiolo زیتون مشاهده نمودند. همانطور که در جدول 3 مشاهده می شود کاربرد ZR در غلظت های بالا در حضور غلظت های نسبتاً پایینBAP منجر به افزایش نرخ نوساقه زایی گردید که با نتایج Ansar Ali *et al.* (2009) در مطالعه تاثیر متقابل هورمون های زآتین و BAP روی زیتون مطابقت داشت. با توجه با استفاده از پکتین، به عنوان ترکیب ثابت محیط کشت، به نظر می رسد یکی از عوامل اصلی ممانعت از رشد طولی نوساقه ها را می توان به پکتین نسبت داد؛ زیرا در شرایط مشابه با حذف پکتین رشد طولی نوساقه ها تا 2 سانتی متر دیده شد (نتایج نشان داده نشده است). کاربرد IBA نیز نقش معنی داری در صفات مورد مطالعه نسبت به دو هورمون دیگر نداشت (جداول 1 و 2). با توجه به مجموع مطالعات انجام شده توسط دیگران و نتایج این تحقیق به نظر می رسد بهینه نمودن ترکیب عناصر غذایی محیط کشت فاکتور اصلی در نرخ ریزازدیادی و رشد طبیعی شاخ و برگ نوساقه ها بوده و پکتین را علیرغم داشتن نقش مهم در به تعادل رساندن رشد طبیعی، می توان به عنوان یک عامل کمکی در نظر گرفته و میزان هورمون های رشد گیاهی نیز پس از بهینه نمودن ترکیب عناصر غذایی و تعیین محیط کشت مناسب، بهینه شود.

سپاسگزاری

در این جا لازم است از جناب آقای دکتر جلیل دژم پور و همکاران ایشان در ایستگاه تحقیقاتی سهند بخاطر همکاری صمیمانه در تهیه مواد گیاهی تشکر و قدردانی گردد.

منابع

Akba F, Isıkalan C, Namlı S, Ak BE (2009). Effect of plant growth regulators on *in vitro* shoot multiplication of *amygdalus communis* L. cv. Yeltainki. African Journal of Biotechnology 8: 6168-6174.

Ansar A, Touqeer A, Nadeem AA, Eshfaq AH (2009). Effect of different media and growth regulators on *in vitro* shoot proliferation of olive cultuvar 'Moraiolo'. Pakistanian Journal of Bottany 41:783-795.

Antonopoulou C, Dimassi K, Therios I, Chatzissavvidis C, Tsirakoglou V (2005). Inhibitory effects of riboflavin on *in vitro* rooting and nutrient concentration of explants of peach rootstock GF677. Scientia Horticulturae 106: 268-272.

George EF (1993). Plant propagation by tissue culture. Part 1: George EF (Eds) The technology.Exegetics Ltd, Edington, Wilts, UK.

Kadota M, Nimi Y (2003). Effect of cytokinin types and their concentration on shoot proliferation and hyperhydicity in *in vitro* pear cultivar shoots. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 72: 261-265.

Kamali K, Majidi I, Zaghami R (2001). Determination the most suitable medium and growth condition for micropropagation of GF677 rootstock. Plant and seed 17: 234-243.

Kester DE (1970). Growth *in vitro* of tissue of almond hybrids and some other prunus. Horticulture Science 5: 349.

Marino G, Bertazza G, Magnanini E, Altan AD (1993). Comparative effects of sorbitol and sucrose in micropropagation of apricot. Plant cell, Tissue and Organ culture 34: 235-44.

Merkafshi A (1998). The effect of different concentration of auxin and cytokinin on shooting from Almond × peach hybrid (GF677) leaf explants, M.Sc thesis, Tabriz University, Iran.

Murai Y, Harada H, and Yamashita H. (1997). *In vitro* propagation of apricot (*Prunus armenica* L.) cv. 'BakuohJunkyou'. Journalof the Japanese Society for Horticultural Science 66: 475-80.

Nuri Nas M, Bolek Y, Sevgin Y (2010). The effects of explant and cytokinin type on regeneration of *Prunus microcarpa*. Scientia Horticulturae 126:88-94.

Perez-Tornero O, Lopez JM, Egea J, Burgos L (2000). Effect of basal mediaand growth regulators on the in vitro propagation of apricot (*Prunus armenica* L.) cv. Canino. Journal of Horticultural Science and Biotechnology 75: 283-286.

Radnia H (1996). Rootstock of fruit trees. Agriculture education publisher, Tehran, Iran.

Rugini E, Verma D C (1982). Micropropagation of Ferranges almond (*Prunus amygdalus*) IPC technical paper series. Number 122.

Ruzic DJV, Vujovic TI (2008). The effect of cytokinin types and their concentration on *in vitro* multiplication of sweet cherry cv. Lapins (*Prunus avium* L.). Horticultural Science 35:12-21.

Snir I (1984). *In vitro* propagation of 'Canino' apricot. Horticultural Science 19: 229-30.

Syrgiannidis G (1985) Control of iron chlorosis and replant diseases in using the GF677 rootstock. Acta Horticulture 173: 383-38.

Tabachnik L, Kester DE (1977). Shoot culture for almond and almond-peach hybrid clones in *in vitro*. Horticultural Science 12: 545-547.

Tsipouridis C, Thomidis T (2003). Methods to improve the in vitro culture of GF677 (Peach×Almond) peach root stock. New Zealand journal of Crop and Horticultural Science 31: 361-364.

Wagner JA, Couto M, Quezada A (2003). *In vitro* multiplication of plum rootstocks 'Julior'. Revista Brasilera Fruticulturae 9: 121-124.

Zou YN (2010). Micropropagation of Chinese Plum (*Prunus salicina* indl.) Using Mature Stem Segments.Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Clj-Napoca 38: 214 - 218.

Study the effects of pectin, medium type and plant growth regulators (PGRs) on micropropagation of GF677 under *in vitro* condition

Nezami A.E.[1], Garoosi G.A.[*2], Haddad R.[2] , Babaei M.[3]

[1] MSc of Dept. of Agricultueral Biotechnology, Imam Khomeini International University (IKIU),Qazvin, Iran
[2] Academic member of Agricultueral Biotechnology, Imam Khomeini International University (IKIU),Qazvin, Iran
[3] MSc of Animal Science Research Institute (ASRI), Karaj, Iran.

Abstract

GF677 hybrid is one the suitable somaclone rootstock for almond and peach in worldwide, and its mass-propagation is demanded highly. For its *in vitro* micro-propagation MS medium is used, in which it critically involves with the some problems such as low shooting efficiency, vitrification and rosetting growth. In order to overcome to these problems the effects of three concentrations of pectin, three types of media and three plant growth regulators (PGRs) at different concentration on the rate of adventitious shooting and quality using the axial buds and factorial experimental design under in vitro condition was investigated. The results indicated that the rate of adventitious shoot regeneration on TK and WPM media contain pectin is high and on MS contain pectin is low; but on contrary, the rate and quality of normal growth of shootlets was vice versa. The combination of 0.5mg/l ZR and 0.25 mg/l BAP on MS contain 0.5% pectin exhibited as the best treatment for the shooting rate and normal growth of shootlets, in which it seems that the BAP mostly responsible for shoot regeneration and normal leaves development and the ZR responsible for inter node growth and increasing shoot length. However, IBA has no significance effect on mentioned characters in comparison with other PGRs in this context.

Key words*: GF677, pectin, plant growth regulators (PGRs), micropropagation.*

[*]Corresponding author: G. A. Garoosi Tel: 02818371468-9 Email: ghasemali1340@yahoo.com