تکثیر پایه F ۱۲/۱ گیلاس به روش ریز ازدیادی

رضا گودرزی ، اسلام مجیدی، علیرضا طلائی و مصطفی مصطفوی

به ترتیب دانشجوی سابق کارشناسی ارشد دانشکده کشاورزی دانشگاه تربیت مدرس، محقق موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال بذر ، دانشیار دانشکده کشاورزی دانشگاه تهران و محقق موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال بذر

تاریخ پذیرش مقاله ۷۶/۲/۳۰

خلاصه

این بررسی به منظور تکثیر پایه F ۱۲/۱ گیلاس (Prunus avium.L) با روش ریز ازدیادی انجام گرفته است که در آن قسمت انتهایی شاخه (Shoot tip) به عنوان نمونه گیاهی انتخاب شده و توسط کلرید جیوه ضدعفونی سطحی شده است. در مرحله شاخه‌زایی از محیط LS استفاده شده است که حاوی املاح MS و ویتامینهای LS همراه‌باهورمونهای NAA و BA بوده است. بیشترین میزان شاخه‌زایی در ترکیب هورمونی ۰/۲۵ میلی‌گرم در لیتر NAA و ۱ میلی گرم در لیتر BA به دست آمده است. شاخه‌های تولید شده جهت ریشه‌زایی به محیط کشت LS تغییر یافته حاوی فلوروگلوسینول (Phloroglucinol) و هورمون IBA منتقل شده و بیشترین درصد ریشه‌زایی در محیط فوق با ۱ میلی گرم در لیتر IBA به دست آمده‌است. پس از این مرحله، به منظور رشد ریشه،گیاهچه‌ها به محیط MS بدون هورمون منتقل شده و پس از تکمیل رشد در طول یک ماه به‌گلدان منتقل شدند.

واژه‌های کلیدی : تکثیر پایه ،گیلاس و ریزازدیادی

مقدمه

درخت گیلاس با نام علمی (Prunus avium.L)متعلق به خانواده گلسرخیان [1] بوده و یکی از گیاهان مناطق معتدله می‌باشد. منطقه معتدله در عرض جغرافیایی ۳۰-۵۰ درجه و در هر نیمکره کره زمین واقع شده است و بخشی از کشور ما درنیمکره شمالی در این محدوده قرار گرفته است و جهت پرورش درخت گیلاس مناسب می‌باشد(۵). در حال حاضر ۱۱۵۱۳ هکتار[2] از این مناطق به باغهای گیلاس اختصاص دارد و سالانه ۹۱ هزار تن محصول از آنها برداشت می‌شود. گیلاس دارای ارقام زیادی می‌باشد، که برخی از آنها به علت دارا بودن صفاتی از جمله: سازگار بودن به محدوده وسیعی از خاکها، اندازه درخت ، مقاوم بودن به برخی آفات و بیماریها و سازگار بودن پیوند آنها با ارقام مختلف، به عنوان پایه شناخته شده‌اند (۱۳). به طور کلی در باغهای گیلاس ابتدا از پایه‌های بذری، چون مازارد و محلب استفاده می‌شد و اشکال این پایه‌ها این است که درختان حاصله فاقد یکنواختی از هر حیث بوده و از رشد غیریکنواختی برخوردار هستند. به طوری که ارتفاع برخی درختان به ۱۲-۲۰ متر می‌رسد و از طرف دیگر از نظر رسیدن محصول نیز غیریکنواخت می‌باشند،لذا اشکالات فوق متخصصان علوم باغبانی را برآن داشت تا پایه‌هایی که فاقد این اشکالات باشند تولید نمایند. بر همین اساس در ایستگاه تحقیقاتی ایست مالینگ انگلیس در سال ۱۹۳۳ تحقیقاتی توسط گروب‌انجام‌گرفت و پایه F ۱۲/۱ به عنوان پایه‌ای مناسب برای گیلاس معرفی شد. این پایه تنها کلون انتخابی‌از مازارد[3] می‌باشد که استفاده تجاری از آن در کشورهای تولید کننده گیلاس آغاز شده‌است. این پایه برای گیلاس و بسیاری از ارقام

1- Rosaceae 3 - Mazzard

۲ - آمار نامه وزارت کشاورزی ، شماره ۱۶ مرداد ۱۳۷۲.

آلبالو مناسب بوده و در خاکهای مختلفی از لومی تا لومی رسی سازگاری نشان داده است. همچنین این پایه به عنوان یک پایه عاری از ویروس سودمند می‌باشد(۱۱). ارقام پیوند شده روی این پایه نسبت به مازارد بذری از قدرت خوبی برخوردار هستند و در بعضی مناطق مرطوب تولید گیلاس ، به علت مقاومت به بیماری شانکر باکتریایی [1] که در اثر آلودگی توسط باکتری سودوموناس [2] به وجود می‌آید استفاده شده است. این گیاه به گال طوقه که در اثر آلودگی توسط باکتری آگروباکترویوم [3] به وجود می‌آید خیلی حساس می‌باشد(۱۳). در حال حاضر سطح ۱۱۵۱۳ هکتاری زیر کشت گیلاس در کشور ما را درختان بذری تشکیل داده‌اند که این باغها علاوه بر عدم یکنواختی درختان و همزمان نرسیدن محصول با مشکل برداشت محصول نیز مواجه هستند، چراکه درختان بذری بلند بوده و برداشت محصول را اغلب غیرممکن و یا پرهزینه می‌نماید و سوددهی لازم را ندارند آنچه که ضرورت این تحقیق و ادامه آن را آشکار می‌سازد این است که امروزه کشورهای عمده تولید کننده گیلاس به علت محاسن پایه‌های رویشی عمدتا از آنها استفاده می‌نمایند، بنابراین در کشور ما ضرورت دارد که برای احیای باغهای فعلی و یا احداث باغهای جدید، این پایه‌ها به کار گرفته شوند و چون پایه F ۱۲/۱ یک کلون است و ضرورت دارد که صفات آن حفظ شود، بنابراین تنها از طریق رویشی می‌توان آن را تکثیر نمود. روشهای رویشی تکثیر این پایه، تکثیر با قلمه و ریز ازدیادی می‌باشد. در کشور ما این پایه وارداتی است و برای جایگزینی در باغهای فعلی به تعداد بسیار زیادی از آن نیاز داریم که برای دست یافتن به این تعداد پایه یا باید از کشورهای تولید کننده وارد نمود و یا گیاهانی راکه قبلا وارد شده‌اند درداخل کشور تکثیر نمود، تکثیر این پایه‌ها از طریق ریز ازدیادی (کشت بافت) ، ضمن این که دارای مشکلات خاص خود می‌باشد. نسبت به تکثیر با قلمه ارجحیت دارد، زیرا در روش تکثیر با قلمه، با فرض صددرصد ریشه‌زایی و بهینه بودن سایر شرایط ظرف مدت سه ماه از یک قلمه فقط یک نهال به دست می‌آید، در حالیکه نتایج تحقیق حاضر نشان داده است که با استفاده از روش «کشت قسمت انتهایی شاخه» [4] به طور متوسط پنج شاخه ظرف مدت سه هفته به دست می‌آید و این روند به صورت تصاعدی افزایش می‌یابد، به طوری که پس از گذشت ٦ ماه صدها هزار گیاه می‌توان تولید نمود، به علاوه در این روش محدودیتهایی که تغییرات فصلی در روند تکثیر با قلمه ایجاد می‌نمایند وجود ندارند.

مواد و روشها

ریزنمونه‌های گیاهی [5] استفاده شده در این بررسی ۵/۰-۱ سانتیمتر از «قسمت انتهایی شاخه» [6] از سر شاخه‌های پایه F ۱۲/۱ موجود در ایستگاه تحقیقاتی کلار دشت برداشت شده است. به منظور کاهش هر چه بیشتر عوامل آلوده کننده، ابتدا ریز نمونه‌ها را به وسیله حرکت مماسی تیغ اسکالپل تراش داده تا پوششهای کوتیکولی روی بشره تا حد ممکن از بین بروند، سپس آنها را در یک بشر که درب آن را با توری سیمی بسته شده قرار داده و به مدت ۱ الی ۲ ساعت در معرض جریان آب شیر قرار گرفتند و پس از آن به اتاق کشت برده شده و با استفاده از محلول کلرید جیوه ضدعفونی سطحی شدند. از آنجا که ممکن است مقداری از ماده ضدعفونی کننده روی ریز نمونه‌ها باقی بماند و باعث نابودی آنها شود پس از ضدعفونی، ریز نمونه‌ها ۳-۵ مرتبه با آب مقطر ضدعفونی شده شستشو شده و آماده کشت می‌شوند.

معمولا در کشت بافتهای گیاهی و مخصوصا در کشت قسمت انتهایی شاخه مراحلی را باید اجرا نمود که عبارتند از:مرحله استقرار ، مرحله شاخه‌زایی، مرحله رشد طولی، مرحله ریشه‌زایی و مرحله انتقال و سازش (۳). هر یک از مراحل فوق دارای ویژگیهایی می‌باشند که توضیح داده خواهند شد. محیط کشت‌هایی که در مراحل ذکر شده استفاده شده‌اند؛ پس از تهیه ، در اتوکلاو و در دمای ۱۲۱ درجه سانتیگراد و فشار ۱۵ پوند بر اینچ به مدت ۱۲ دقیقه ضدعفونی شدند. شرایط محیطی در این آزمایشها از این قرار بوده است: دما در روز ۲۲ و در شب ۱۸ درجه سانتیگراد، رطوبت نسبی ۴۵ درصد، شدت تابش نور در مرحله استقرار ۱۲۵۰ لوکس ، در مرحله شاخه‌زایی ۴۵۰۰ لوکس و درمرحله ریشه‌زایی ۲۵۰۰ لوکس بوده است.

1- Bacterial canker
2- Pesudomonas
3- Agrobacterium tumefaciens
4- Shoot tip culture
5- Explant
6- Shoot tip

مرحله استقرار: هدف از اجرای این مرحله این است که اولاً درصد آلودگی مشخص شود ونمونه‌های سالم درمراحل بعدی استفاده شوند ثانیا مناسب بودن محیط کشت جهت رشد ریز نمونه‌ها مشخص شود. دراین مرحله از دو محیط کشت MS[1] و MMS[2] استفاده شده و ریز نمونه‌ها پس از ضدعفونی درمحیط‌های فوق کشت شده و به مدت یک هفته در این محیط‌ها باقی مانده‌اند.

مرحله شاخه‌زایی: نمونه‌های سالم و عاری از آلودگی به منظور شاخه‌زایی به محیط کشت LS[3] منتقل شده‌اند. این محیط حاوی املاح و ویتامینهای LS، فسفات سدیم، مقدار ۳۰ گرم در لیتر ساکارز و ۷/۲ گرم درلیتر آگار بوده و PH محیط روی ۵/۶ تنظیم شده است. دراین مرحله به‌منظور دست یافتن به بیشترین تعداد شاخه از یک ریز نمونه کشت شده، تیمارهایی بکار گرفته شدند که یکی از آن‌ها، تیمار هورمونی بوده است، تیمار هورمونی بکار گرفته شده در این مرحله شامل : نفتالن استیک اسید (NAA) با دو غلظت ۰/۱ و ۰/۲۵ میلی گرم در لیتر و بنزیل آدنین (BA) بوده که برای هر یک از مقادیر NAA مقادیر ۰/۵ ، ۱ ، ۲ و ۳ میلی گرم در لیتر BA استفاده شده است. آزمایش در قالب طرح آزمایشی فاکتوریل با ۸ تکرار اجراء شده و لوله‌های کشت شده به اتاقک رشد[4] منتقل و پس از سه هفته یادداشت برداری به عمل آمده است.

مرحله رشد طولی: هدف از اجرای این مرحله این است که شاخه‌های به‌دست آمده از مرحله قبل راوادار به رشد طولی بنماییم تا دارای توان واندازه لازم جهت ریشه‌دار شدن باشند برای نیل به این هدف از سه محیط کشت با ترکیبات هورمونی مختلف استفاده شده است، به‌طوری که دو محیط از آن همان محیط کشت مرحله شاخه‌زایی بوده که به ترتیب ۰/۲ و ۰/۵ میلی گرم در لیتر اسید ژیبرلیک (GA) به آنها افزوده شده و محیط کشت سوم، محیط کشت MS بدون هورمون (محیط صفر) بوده است. نمونه‌هایی که به محیط صفر منتقل شدند قبلا تحت تیمار ریشه‌زایی قرار گرفته سپس در این محیط کشت شده‌اند.

مرحله ریشه‌زایی: در این مرحله، از محیط کشت LS به اضافه هورمون اسید اندول بوتیریک (IBA) که نوعی اکسین می‌باشد استفاده شده است. در این آزمایش که نقشه آن در جدول ۱ نشان داده شده است، عواملی به عنوان تیمار بکار رفته‌اند که عبارتند از : مقدار هورمون IBA که با حرف A (a1 و a2 به ترتیب ۱ و ۲ میلی گرم در لیتر) ، تاریکی - روشنایی که با حرف B (b1 تاریکی و b2 روشنایی) و مدت زمانی که شاخه‌ها در محیط هورمون دار قرار گرفته‌اند، این مدت زمان با حروف c1 تا c6 به ترتیب ، ۲، ۴، ۶، ۸، ۱۰ و ۱۲ روز در جدول نشان داده شده‌اند.

آزمایش در قالب طرح آزمایشی کرتهای دوبار خرد شده[5] با سه تکرار اجراء شده است. نحوه اجراء بدین صورت بوده است که به عنوان مثال برای غلظت ۱ میلی گرم در لیتر IBA تعداد ۳۶ لوله آزمایش کشت شده به کار گرفته شده که ۱۸ عدد آن‌ها در تاریکی و ۱۸ عدد دیگر در روشنایی با شدت تابش ۲۵۰۰ لوکس قرار داده شدند، سپس با فاصله زمانی هر ۲ روز ، ۳ لوله از نمونه‌های موجود در روشنایی و ۳ عدد از لوله‌های واقع در تاریکی برداشته شده و گیاهچه‌های آنها به محیط بدون هورمون منتقل شدند و پس از ۴ هفته یادداشت برداری به عمل آمده است.

مرحله انتقال و سازگاری: در این مرحله گیاهچه‌ها که تاکنون در شرایط طبیعی قرار می‌گیرند. چون گیاهچه‌ها در داخل لوله آزمایش[6] از رطوبت بالایی برخوردار هستند، لذا لازم است که پس از انتقال تا مدتی این رطوبت بالا تأمین شود تا گیاهچه‌ها دچار تنش

جدول ۱ - نقشه آزمایش ریشه‌زایی گیاهچه‌های پایه F12/1

A	a_1= 1mgl^{-1}IBA												a_2 = 2mgl^{-1}IBA											
B	b_1 تاریکی						b_2 روشنایی						b_1 تاریکی						b_2 روشنایی					
C	c_1	c_2	c_3	c_4	c_5	c_6	c_1	c_2	c_3	c_4	c_5	c_6	c_1	c_2	c_3	c_4	c_5	c_6	c_1	c_2	c_3	c_4	c_5	c_6
روز	۲	۴	۶	۸	۱۰	۱۲	۲	۴	۶	۸	۱۰	۱۲	۲	۴	۶	۸	۱۰	۱۲	۲	۴	۶	۸	۱۰	۱۲

1- Murashige and skoog 2- Modified MS 3- Linsmaier and skoog

4- Growth chamber 5- split split plot 6- In vitro

رطوبتی نشوند، بدین منظور گیاهچه‌ها در زیر سرپوشهای شیشه‌ای مخصوصی قرار می‌گیرند که در سطح جانبی آنها سه سوراخ تعبیه شده است، این سوراخها در روز های اولیه به وسیله نوار چسب بسته می‌باشندو مقداری آب در داخل درب سرپوشها که گلدانها در آنها قرار دارند ریخته می‌شود تارطوبت مورد نیاز تأمین شود.

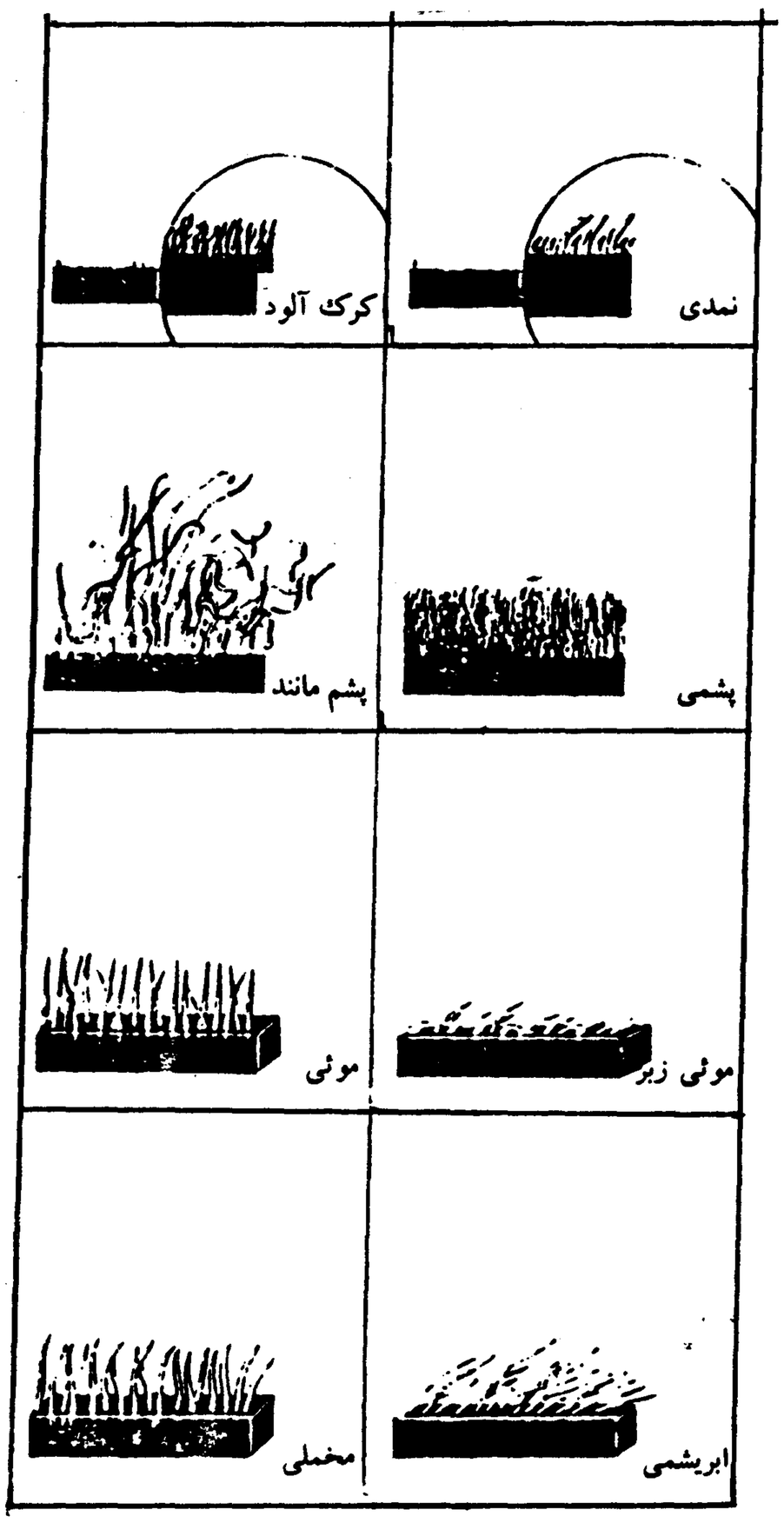
گیاهچه‌ها از لوله آزمایش خارج شده و به وسیله آب مقطر، ریشه‌های آنها شستشو داده می‌شوند تا بقایای محیط کشت از لابلای ریشه‌ها از بین برود، چون بقایای محیط کشت ، بستر مناسبی جهت رشد باکتریها و قارچها بوده و گیاهچه‌ها را از بین می‌برد، سپس گیاهچه‌ها به گلدانهای حاوی پیت و ماسه که قبلا اتوکلاو شده بودند منتقل شده و زیر سرپوشهای مخصوص قرار داده شدند. هر روز به مدت ۱۵ تا ۳۰ دقیقه سرپوشها را به منظور تهویه برداشته و هر سه روز یکی از سوراخهای سرپوشهای شیشه‌ای باز می‌شوند و زمانیکه بخار آب به صورت میعان روی جدار داخلی سرپوشها تشکیل نشود به طور کلی سرپوشها برداشته می‌شوند. در این مدت جهت تغذیه گیاهان از محلول غذایی هوگلند که غلظت آن به $\frac{1}{4}$ کاهش یافته بود استفاده شده و بعد از آن از همان محلول غذایی به ترتیب با غلظت $\frac{1}{2}$ و کامل استفاده شد و سرانجام بعد از سه هفته گیاهان به گلدانهای حاوی خاک منتقل و در گلخانه قرار داده شدند.

نتایج و بحث

گیاهان مختلف پوششهای کوتیکولی مختلفی دارند(شکل ۱). وجود این پوششهای کوتیکولی از یک طرف وکشش سطحی آب از طرف دیگر مانع از تماس ماده ضدعفونی کننده با بشره ریز نمونه می‌شود،و در نتیجه عوامل آلوده کننده کاملا از بین نرفته و تولید آلودگی می‌نمایند، لذا حرکت مماسی تیغ اسکالپل باعث حذف این پوششها و در نتیجه تماس بیشتر ماده ضدعفونی کننده با بشره شده و درصد آلودگی راکاهش می‌دهد.

مرحله استقرار: مشاهده نمونه‌های کشت شده در محیط MMS نشان داده است که این نمونه‌ها دچار کمبود مواد غذایی شده وعلایم کمبود در برگها نمایان شده بود، به همین دلیل از محیط MS استفاده شد و علایم کمبود نیز رفع گردید.

مرحله شاخه‌زایی: صفات اندازه‌گیری شده در این مرحله متوسط تعداد و طول شاخه بوده است. نتایج تجزیه واریانس نشان داده



شکل ۱ - انواع پوششهای فوق کوتیکولی در گیاهان (نقل از منبع شماره ۲)

است که بین تیمارهای مختلف تفاوت معنی‌دار وجود دارد و گروه‌بندی میانگین‌ها با آزمون دانکن در سطح ۱% نشان می‌دهد که دو مقدار ۰/۱ و ۰/۲۵ میلی‌گرم در لیتر هورمون نفتالن استیک اسید(NAA) در دو گروه متفاوت قرار دارند (شکل ۲) و مقدار ۰/۲۵ میلی گرم در لیتر ، تأثیر بیشتری در شاخه‌زایی داشته است، همچنین بر اساس گروه‌بندی میانگین‌ها با آزمون دانکن در سطح ۱% غلظتهای مختلف بنزیل آدنین (BA) نیز در گروههای متفاوتی قرار گرفته‌اند. بالاترین میانگین تعداد شاخه مربوط به غلظت ۱ میلی گرم و پایین ترین تعداد متعلق به غلظت ۳ میلی‌گرم در لیتر بنزیل آدنین بوده است و در این مرحله ، شاخه‌زایی سیر نزولی داشته است، ولی

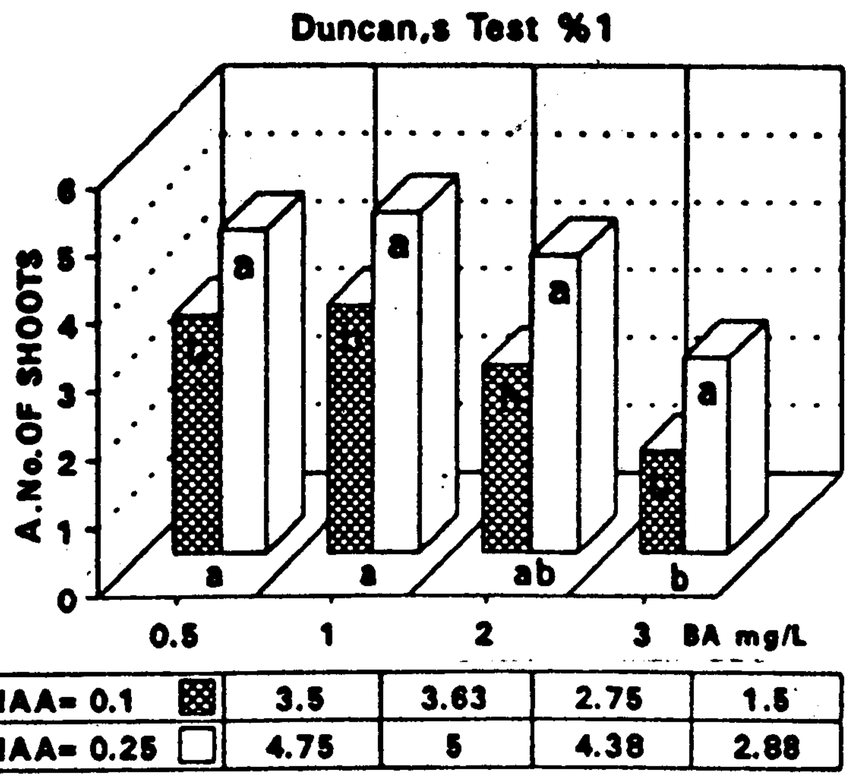
تولید کالوس در انتهای ریز نمونه‌ها افزایش یافته است.

این نتایج از آنجا ناشی می‌شود که به طور کلی یکی از اصلی‌ترین اعمال سیتوکینین‌ها در کشت بافت، تولید شاخه‌های نابجا می‌باشد، همچنین سیتوکینین‌ها قادرند که جوانه‌های جانبی را از تاثیر غالبیت انتهایی[1] جوانه انتهایی رها سازند(۷). افزایش تولید کالوس با افزایش غلظت بنزیل آدنین قبلا نیز در ریز نمونه‌های کشت شده (Pinus strobus) گزارش شده است(۷).

غلظتی از BA که در آن حداکثر تعداد شاخه تولید می‌شود به عواملی بستگی دارد از جمله: ریخته ارثی گیاه[2]، ترکیب هورمونی محیط کشت و میزان هورمون درونی گیاه که در مورد هر گونه گیاهی لازم است تجربه شود. در این بررسی مقدار ۱ میلی‌گرم در لیتر BA توام با ۰/۲۵ میلی گرم در لیتر NAA نتیجه مطلوبی داده است، ولی برای تأیید غلظت ۱ میلی گرم BA در آزمایشهای دیگری ترکیب هورمونی NAA و BA تغییر داده شده و همان طور که در شکل ۳ نشان داده شده، در هر سه ترکیب هورمونی، غلظت ۱ میلی گرم در لیتر BA توام با هر سه غلظت NAA بیشترین تعداد شاخه را تولید کرده است.

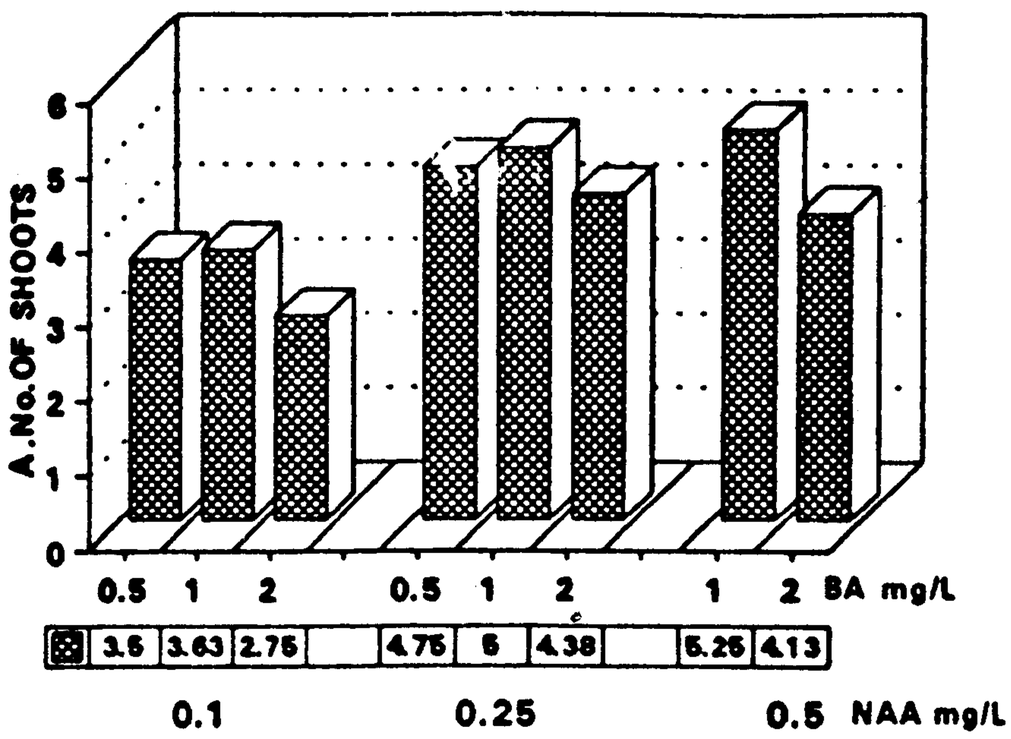
چرنتر و همکاران گزارش کرده‌اند که بیشترین تعداد شاخه برای پایه F ۱۲/۱ را در غلظت ۲/۳ میلی‌گرم BA و ۴۵ گرم ساکارز به دست آورده‌اند (۱۵). جونز و هاپگودنیز گزارش کرده‌اندکه فلورو گلوسینول (PG) در شاخه‌زایی F۱۲/۱ تأثیری نداشته است (۶). در بررسی مانیز این گزارش تأیید شده است. شکل ۴ متوسط تعداد شاخه‌های به دست آمده در بهترین تیمار هورمونی درمرحله شاخه‌زایی رانشان می‌دهد و شکل ۵ تعدادی از نمونه‌های رشد یافته در محیط فوق را نشان می‌دهد.

مرحله رشد طولی: نتایج مشاهده‌ای نشان داد که در دو محیط حاوی اسید ژیبرلیک، علیرغم اثری که این هورمون در رشد طولی گیاهان دارد در رشد طولی گیاهچه‌ها مؤثر نبوده است. و نمونه‌های کشت شده در محیط بدون هورمون که قبلا تیمارهای ریشه‌زایی را دریافت داشته‌اند علاوه بر اینکه از رشد ریشه خوبی برخوردار بوده‌اند رشد طولی ساقه نیز تأمین شده است. عدم تأثیر هورمون اسید ژیبرلیک در رشد طولی، علیرغم اینکه اسید ژیبرلیک به صورت فیلتر شده به محیط افزوده شده و اتوکلاو نشده است احتمالا به علت

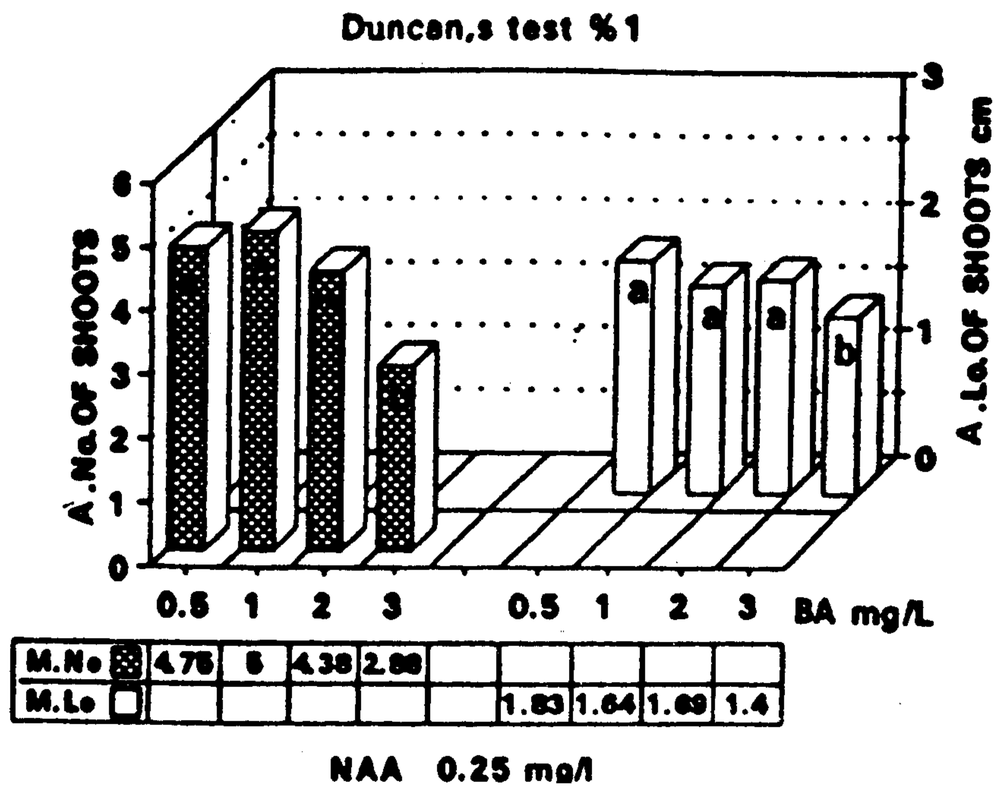


شکل ـ۲ مقایسه تعداد شاخه در دو غلظت NAA توام با چهار غلظت BA

(A. N = Average Number)

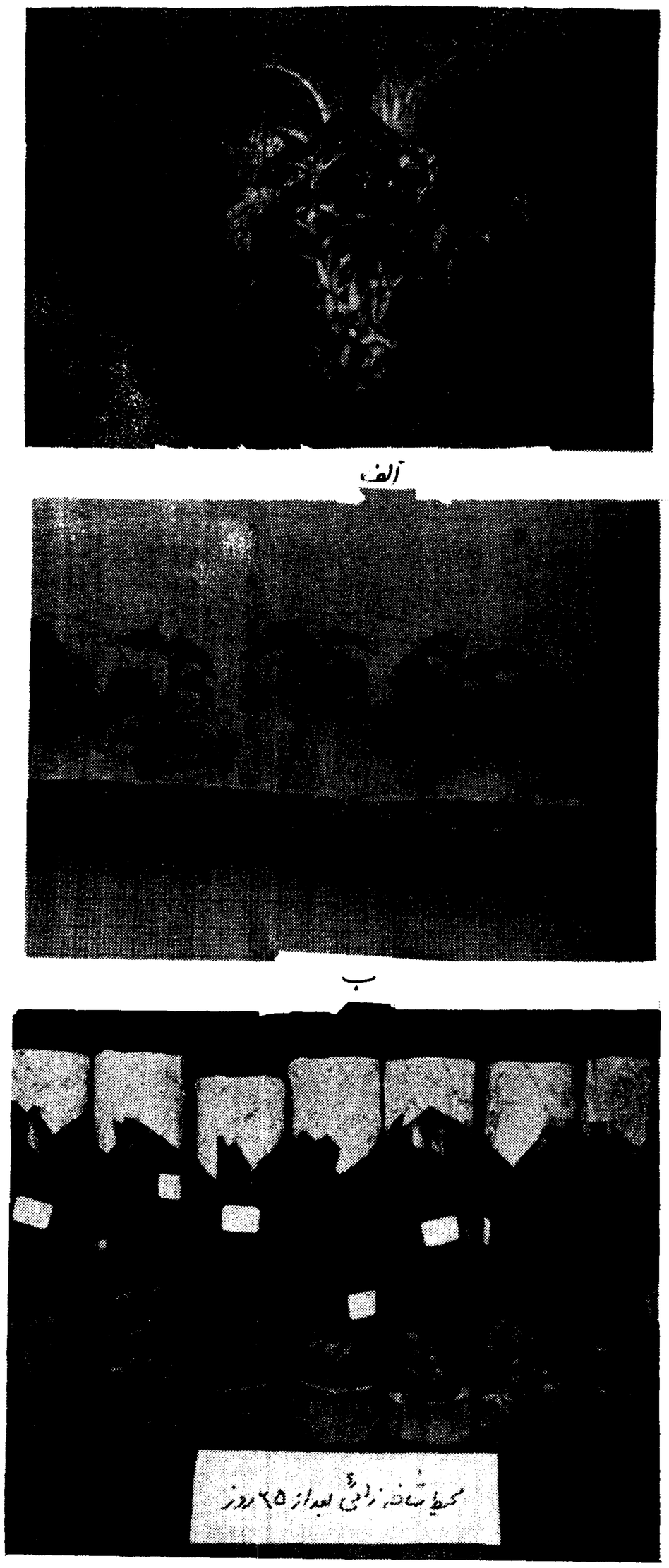


شکل ـ۳ نمایش غلظت بهینه BA توام را مقادیر مختلف NAA در شاخه‌زایی



شکل ۴ - نمایش تعداد ومتوسط طول شاخه در ۰/۲۵ میلی گرم NAA و چهار غلظت BA (A.Lo=Average long)

1- Apical dominance 2- Genotype



شکل ۵- تعدادی از نمونه‌های کشت شده در محیط حاوی ۰/۲۵ و ۱ میلی گرم در لیتر به ترتیب NAA و BA در مرحله شاخه‌زایی

الف- نمونه‌ها در داخل لوله آزمایش

ب- تعداد شاخه‌های تولید شده از یک نمونه در مرحله شاخه‌زایی

ج-شاخه‌های تولیدشده‌ازنمونه‌اولیه‌به‌صورت‌مجاز(تفکیک‌شکل‌ب)

اثر متقابل دیگر هورمونهای موجود در محیط کشت بوده است، زیرا هورمونهای گیاهی ، علاوه بر اثرات مستقلی که در پدیده‌های متابولیسمی گیاهان دارند، نسبت به هورمونهای دیگر دارای دو اثر همیاری [1] و رقابت [2] نیز می‌باشند (۱۷)، بنابراین در کشت بافت گیلاس به این مرحله به عنوان مرحله‌ای با ترکیب هورمونی خاص نیاز نمی‌باشد.

مرحله ریشه‌زایی: صفات اندازه‌گیری شده در این مرحله، درصد ریشه‌زایی، متوسط تعداد و طول ریشه بوده است. بررسی درصد ریشه‌زایی (شکل ٦) نشان داده است که درصد ریشه‌زایی در تیمار ۱ میلی گرم در لیتر IBA نسبت به ۲ میلی گرم بیشتر بوده است و در این غلظت درصد ریشه‌زایی تحت تأثیر تاریکی یا روشنایی قرار نگرفته است، ولی تاریکی در غلظت ۲ میلی گرم در لیتر IBA بهتر عکس العمل نشان داده است و زمانهای مختلفی که ریز نمونه‌ها در معرض هورمون بوده‌اند، در هر یک از سطوح هورمون و تاریکی - روشنایی نیز تفاوت نشان داده‌اند (شکل ٦ - ج).

برای بررسی درصد ریشه‌زایی در تیمارهای مختلف c_1 تا c_6 (مدت زمان تیمار هورمونی) از زمانهای واقع در روشنایی و غلظت ۱ میلی گرم در لیتر IBA استفاده شد، زیرا در بررسی طول ریشه، این تیمارها برتر از سایر تیمارها بوده و از طرفی نمونه‌های رشد یافته در تاریکی در زمانهای بیشتر از ۸ روز تیمار هورمونی، علایم اتیوله شدن (رویش در تاریکی) نشان داده‌اند، به طوری که قسمتهایی از گیاه که در تاریکی به وجود آمده بودند به علت عدم ساخته شدن کلروفیل، به رنگ سفید در آمده و از رشد ضعیفی برخوردار بودند.

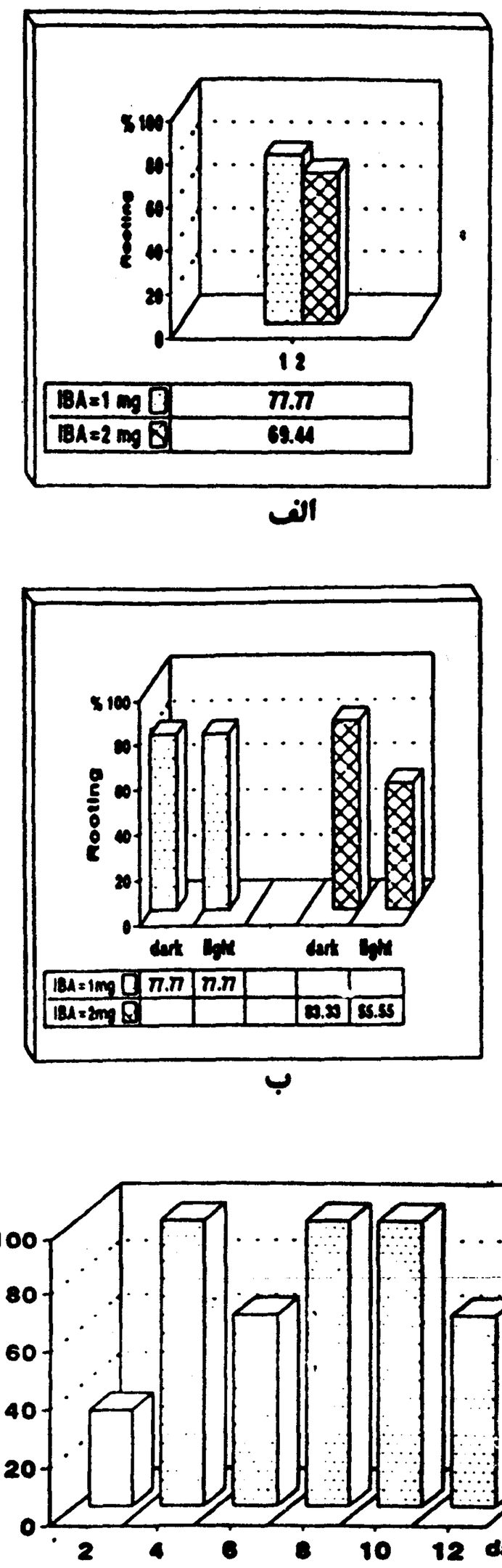
نتایج تجزیه واریانس برای صفت متوسط طول ریشه (شکل ۷) نشان داده است که بین تأثیر دو مقدار ۱ و ۲ میلی‌گرم در لیتر IBA بر طول ریشه گیاهچه‌های F۱۲/۱ تفاوت معنی‌دار وجود دارد. گروه‌بندی تیمارها با آزمون دانکن در سطح ۱٪ نشان داده است که دو غلظت IBA در گروههای متفاوتی قرار گرفته‌اند و غلظت ۱ میلی گرم در لیتر نسبت به ۲ میلی گرم برتر بوده است (شکل ۷ - الف) ، همچنین نتایج نشان می‌دهند که بین تیمارهای تاریکی و روشنایی تفاوت معنی دار وجود دارد و گروه‌بندی تیمارها برای صفت طول ریشه با آزمون دانکن در سطح ۱٪ نشان داده است که تیمارهای تاریکی و روشنایی در غلظت ۱ میلی‌گرم در لیتر IBA

1- synergism 2- Antagonism

در گروههای متفاوتی قرار گرفته اند ولی در غلظت ۲ میلی گرم در لیتر هم‌گروه بوده‌اند. بنابراین و همان طور که در (شکل ۷ - ب) نشان داده شده است، تیمار روشنایی در غلظت ۱ میلی گرم در لیتر نسبت به سایر تیمارها برتر بوده است. با توجه به شواهد فوق ، تیمار مدت زمان حضور گیاهچه‌ها در محیط هورمون دار در غلظت ۱ میلی گرم درلیتر IBA و روشنایی بررسی شده است. نتایج تجزیه واریانس نشان می‌دهند که بین زمانهای مختلفی که گیاهچه‌ها در محیط هورمون دار بوده‌اند، تفاوت معنی‌دار وجود دارد و گروه‌بندی تیمارها برای صفت طول ریشه با آزمون دانکن در سطح ۱ % نشان می‌دهد که قرار دادن گیاهچه‌ها به مدت ۴ روز در محیط هورمون دار بهترین تیمار بوده است در (شکل ۷ -د) مقایسه‌ای بین میانگین طول ریشه به دست آمده در غلظت ۱ میلی گرم در لیتر IBA ، روشنایی و ۴ روز تیمار هورمونی (منحنی شماره ۱) با میانگین سایر تیمارها (منحنی شمارهٔ ۲) انجام گرفته است.

همان طور که در شکل مشهود است ، در همه حالات بیشترین طول ریشه درمدت زمان ۴ روز تیمار هورمونی به دست آمده است و این مقایسه نشان می‌دهد که ریشه‌زایی با تیمارهای ذکر شده از الگوی خاصی پیروی می‌کندبه طوری که در ۴ روز بیشترین طول ریشه به دست آمده است. در تیمارهای بهینه ، گیاهچه‌ها ضمن این که از رشد زیاد ریشه برخوردار بودند، تعداد زیادی ریشه فرعی نیز تولید نموده و ساقه‌ها نیز رشد طولی خوبی داشته اند (شکل ۸) اکسین‌ها اعمال زیادی در گیاهان انجام می‌دهند، از جمله : سبب تحریک تقسیم سلولی و طویل شدن سلولها می‌شوند. اکسین‌ها در غلظتهای بالا سبب رشد طولی شاخه شده و برعکس از رشد طولی ریشه جلوگیری می‌کنند، اما در غلظتهای پایین سبب رشد طولی ریشه می‌شوند(۱۴). جونز و هاپگود گزارش کرده‌اند که فلورو گلوسینول (PG) نه تنها در شاخه‌زایی، بلکه در ریشه‌زایی پایه F ۱۲/۱ نیز نقشی ندارد (۹)، در حالیکه در بررسی ما مشخص شده است که این ماده در شاخه‌زایی تأثیر ندارد، ولی در ریشه زایی نقش بسزایی داشته است و آزمایشی نیز به همین منظور انجام گرفت (نتایج آورده نشده است). همچنین آنها از غلظت ۳ میلی گرم در لیتر IBA برای ریشه‌زایی استفاده کرده‌اند، در حالیکه در بررسی ما ۱ میلی گرم در لیتر IBA بهترین نتایج را دارا بوده است.

رانجیت و همکاران درصد ریشه‌زایی را بین‌صفر تا ۳۰

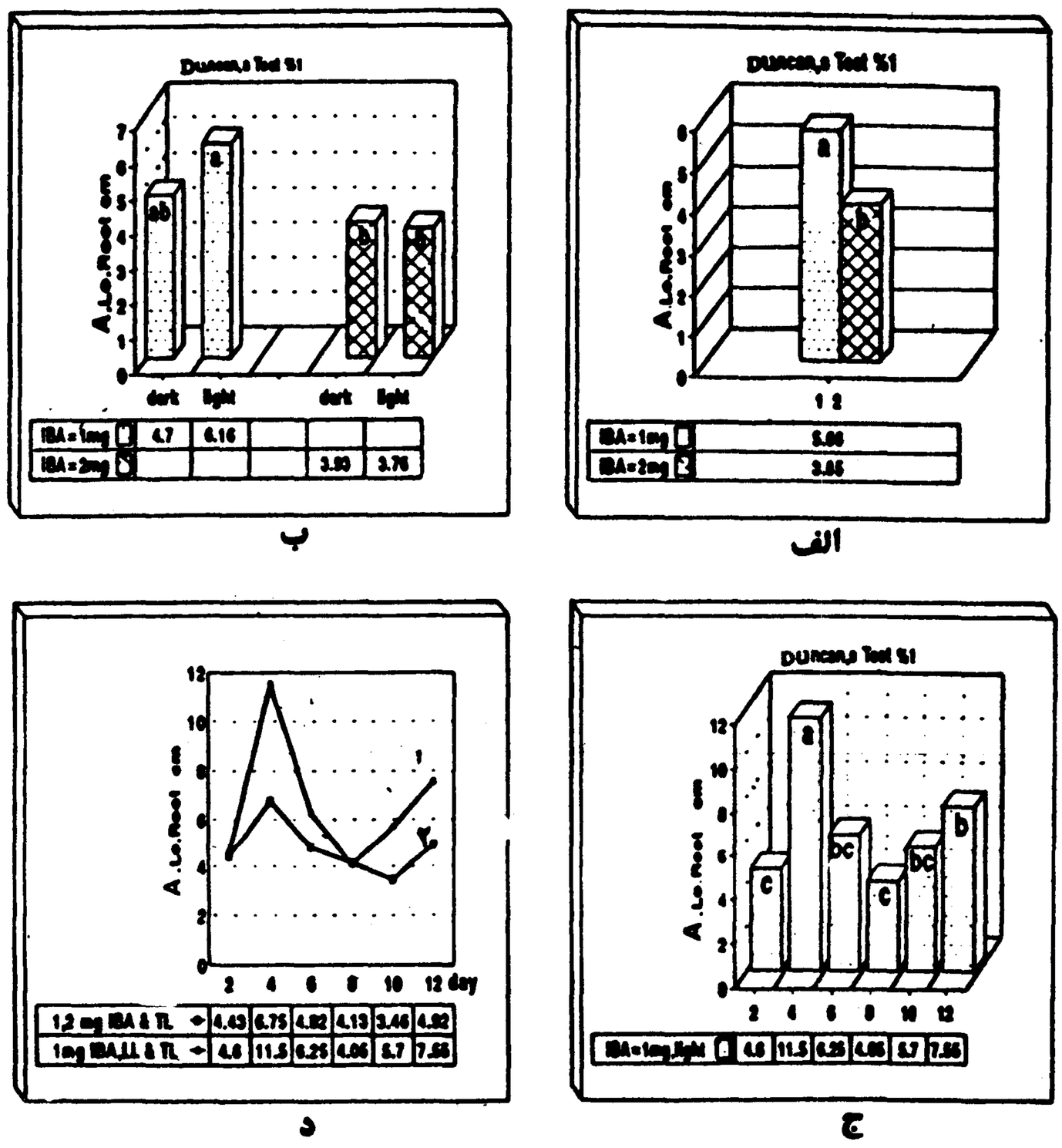


شکل ٦ - نمودار تأثیر تیمارهای مختلف بر درصد ریشه‌زایی گیاهچه‌های F12/1

الف - غلظت او ۲ میلی گرم IBA

ب - تیمار تاریکی - روشنایی در هر دو غلظت IBA

ج - مدت زمان تیمار هورمونی



شکل ۷ - نمودار تأثیر تیمارهای مختلف بر طول ریشه گیاهچه‌های F12/1

الف - غلظت ۱و ۲ میلی گرم IBA

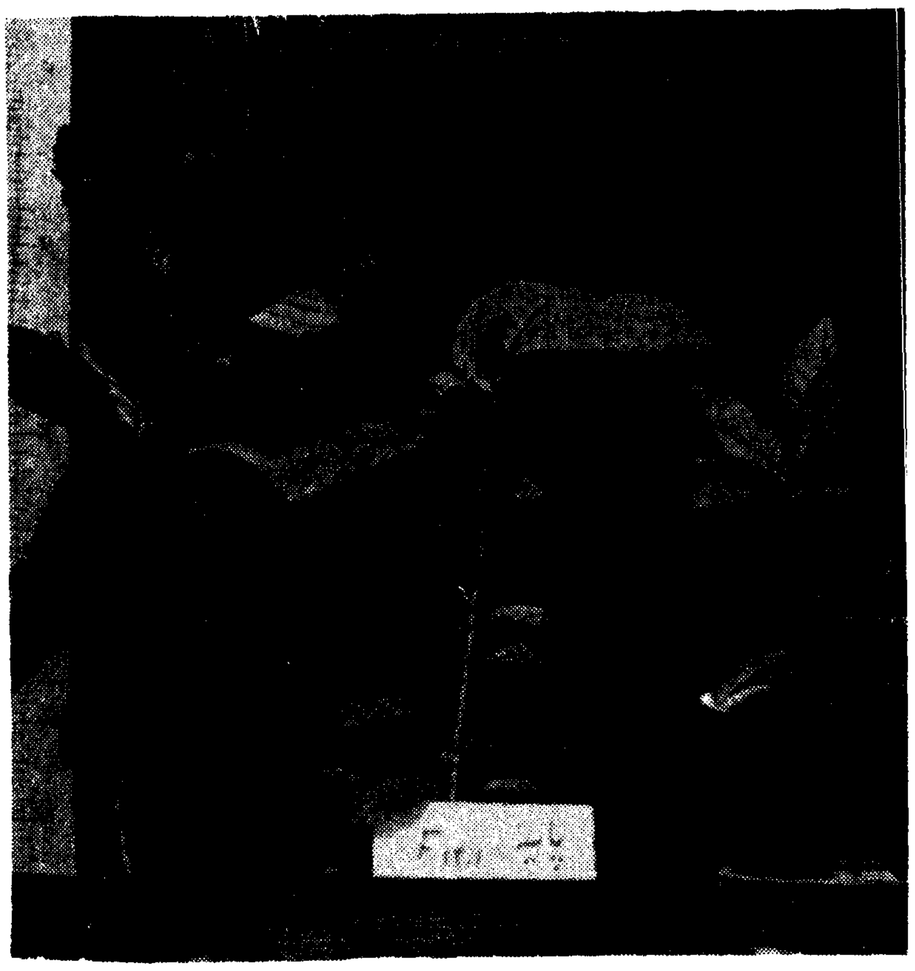
ب - تیمارتاریکی - روشنائی در هر دو غلظت IBA

ج - مدت زمان تیمار هورمونی

د - نمایش مقایسه‌ای تیمارها

درصد با میانگین ۱۵ و تعداد ۲-۴ ریشه برای هر گیاهچه ذکر کرده‌اند (۱۲)، ولی در بررسی ما در برخی تیمارها صددرصد ریشه‌زایی به دست آمده و تعداد ریشه بین ۲ تا ۱۹ ریشه در هر گیاهچه بوده است. اثر اکسین در تشکیل ریشه به طور روشن باید از تأثیر آن در طویل شدن ریشه متمایز گردد. به طور کلی غلظت لازم برای تشکیل ریشه خیلی بیشتر از غلظتی است که برای طویل شدن ریشه لازم است(۱) و بر همین اساس بیشترین طول ریشه در آزمایش فوق در غلظت و مدت زمان تیمار هورمونی پایین به دست آمده است. غلظت مناسبی از هورمون که در آن هر دو هدف تشکیل ریشه و رشد طولی ریشه تأمین شود برای هر گونه گیاهی فرق می‌کندو لازم است از طریق آزمایش مشخص شود. تشکیل ریشه در شاخه‌ها طی دو مرحله شکل می‌گیرد: مرحله اول تشکیل مریستم که طی آن مریستم‌های ریشه تشکیل می‌شوند. مرحله دوم رشد و طویل شدن ریشه، که طی آن نوک ریشه به طرف خارج رشد کرده و سرانجام از بشره ساقه بیرون می‌آید. مرحله اول خود شامل دو مرحله است، یکی مرحله فعال اکسینی که طی آن بایستی به طور مرتب اکسین مورد نیاز ، یا توسط خود گیاه تولید و یا از طریق افزودن به محیط کشت در اختیار گیاه قرار بگیرد. مرحله دیگر، مرحله غیر فعال اکسینی است که طی آن حضور اکسین اثر نامطلوبی بر روی تشکیل ریشه ندارد(۶) و نتایج آزمایشهای ما نشان می‌دهد که در شرایط آزمایشی ما مرحله فعال اکسینی برای پایه F ۱۲/۱ ۴ روز بوده، که در این مدت گیاهچه‌ها هورمون لازم را از محیط کشت جذب نموده و پس از انتقال به محیط بدون هورمون، ریشه‌ها ظاهر شده و رشد طولی را آغاز کرده‌اند. زمانهای بیشتر از ۴ روز سبب جذب بیشتر

شکل ۸ - تعدادی از گیاهچه‌های ریشه‌دار شده قبل از انتقال



شکل ۹ - تعدادی از گیاهان منتقل شده به گلدان

هورمون شده و ریشه تشکیل شده ، اما رشد طولی کم شده است. مناسب بودن اکسین در مدت ۴ روز ، علاوه بر رشد طولی ریشه سبب رشد طولی ساقه نیز شده است، زیرا در این حالت اکسین مورد نیاز برای رشد طولی ساقه نیز تامین می‌شود. گیاهچه‌های خارج شده از محیط هورمون دار ، هر قدر که بیشتر در محیط بدون هورمون باقی می‌ماندند رشد طولی ریشه نیز بیشتر شده و به تناسب ، ساقه نیز رشد می‌نماید، زیرا محیط کشت به علت استفاده از آگار حالت نیمه جامد دارد و مولکولهای مواد غذایی درون این محیط به‌راحتی محیط سیال حرکت نمی‌کنند، بنابراین با تأمین رشد طولی، ریشه‌ها به نقاط بکر بیشتری درمحیط کشت می‌رسند و تغذیه بهتر صورت می‌گیرد.

مرحله انتقال و سازگاری: با توجه به نتایج مشاهده‌ای، مواد و روشهای به کار گرفته شده در این مرحله بر روی پایه F۱۲/۱ مناسب بوده ، به طوری که شستن ریشه گیاهچه‌ها پس از خروج از لوله فعالیت‌باکتریهای خاکزی‌ازبین برودوعلاوه بر این برای حذف آزمایش به منظور جلوگیری از آلودگی باکتریایی سبب شد که زمینه کامل عوامل آلوده کننده قارچی و باکتریایی از بنومیل و استرپتومایسین نیز استفاده شد (۸) و نتایج بسیار مطلوب بوده است. بستر کشت در گلدانها و زمان ضدعفونی کردن آنها نیز مناسب بوده و گیاهچه‌ها به خوبی در آنها استقرار یافتند. در این مرحله باحذف کامل عوامل آلودگی و ایجاد شرایط محیطی مناسب، می‌توان کلیه گیاهان ریشه‌دار شده را تبدیل به نهال کرد. سرانجام گیاهچه‌ها به گلدانهای بزرگتر حاوی خاک منتقل (شکل ۹) و به گلخانه برده شده و آماده انتقال به زمین شدند.

سپاسگزاری

برخود لازم می‌دانیم از کلیه کسانی که در انجام این تحقیق باما همکاری نموده‌اند تشکر بنماییم، در این خصوص از همکاریهای صمیمانه و بیدریغ اعضاء واحد کشت بافت و واحد فیزیولوژی بخش بیوتکنولوژی گیاهی مؤسسه تحقیقات، اصلاح و تهیه نهال و بذر وزارت کشاورزی صمیمانه تشکر می‌نماییم.

مراجع مورد استفاده

REFERENCES

۱ - الف. مایر،فراتیان ،ب.،۱۳٦۷. مبانی فیزیولوژی گیاهی. ترجمه حسین لسانی و مسعود مجتهدی ، چاپ دوم ، تهران : انتشارات دانشگاه تهران.

۲ - الف. مصطفی.۱۳٦۷. راهنمای طرح فلور ایران. چاپ اول ، تهران، انتشارات وزارت کشاورزی، مؤسسه تحقیقات و جنگلها و مراتع.

۳ - ح. ن. حسن، ر.،۱۳۷۳.ریزازدیادی. چاپ اول ،تهران، انتشارات مؤسسه تحقیقات و جنگلها ومراتع.

۴ - د. جان اچ و همکاران.،۱۳۷۳. تجربیاتی در زمینه کشت بافتهای گیاهی.ترجمه قدیر نوری قنبلانی ،تبریز، انتشارات دانشگاه تبریز .

۵ - و.ام.ان.، ۱۳۷۰. میوه کاری در مناطق معتدله. ترجمه یوسف رسول زادگان ، چاپ اول ، اصفهان ، انتشارات دانشگاه صنعتی اصفهان.

٦ - هـ. هادسون. تی و دیل ای، ک. ۱۳۷۰. ازدیاد نباتات.ترجمه مرتضی خوشخوی ، جلد سوم ، چاپ اول ، شیراز ، مرکز نشر دانشگاه شیراز.

7 - Bonga.J.M. 1992. In vitro Culture of Tress Kluwer Academic Publishers Netherlands.

8 - Cornu, D,M.F,Michel, 1987 Bacteria Contaminats in shoot Culture of Prunus avium L.Choice and Phytotoxicity of Anibiotics, Acts Horticulturae 212: 83- 86.

9 - Jones, O.P & Margaret.E Hopgood 1979. The Successful Propagation in Vitro of Two Rootstocks of Prunus. The Rootstock Pixy (P.insititia) and the (Cherry Rootstock F 12/1 (P.avium). J.of Hort. Scien. 45 (1): 63-66.

10- Pierik, R.L.M,1987. In vitro Culture of Higher Plant. Martinus Nijhoff Publishers. Dordrecht Netherlands.

11- Randhawa, S.S; 1991. Cherries in: Temperate Fruits (ed. Mitra, S.K et al). Horticulture and Allied Publishers. Calcutta.

12- Ranjit. M:D.E, Kester & W.C. Micke; 1988. Micropropagation of Cherry Rootstocks; 1-Response to Culture. J.Amer. Soc. Hort. Sci. 113: 146-149.

13- Rom. Roy. C.& Robert. F.Carlson 1987. Rootstocks for Fruit Crops. John Wiley & Sons Publication. U.S.A.P:217- 265.

14- Russel, R,S; 1982. Plant Root System; Mc Graw- Hill Book Company (Uk) Limited.

15- Tchernets, A.M;V.A, Smirnos; N.M Abramenko; 1987 Study on Effect of Some Nutrient Medium Factors on The Fevelopment of Cherry and Sweet Cherry Rootstocks In vitro .Acta. Hort.212: 595-599.

16- Torrers , Kenneth. C; 1957. Tissue Culute Techinqes for Horticultural Crops. Van Nostrand Reinhold, NowYork.

17- Weavar, R.J; 1972. Plant Growth Substances in Agiculture W.H. Freeman and Company: San Francisco.

18- Wikins, C.P & J.H, Dodds; 1982. Effect of Various Growth Regulators on Growth in Vitro of Cherry Shoot tips. Plant Growth Regulation. 1: 209-216.

Iranian J.Agric. Sci. Vol. 28 No. 3 1997

Micropropagation of Cherry Rootstock (Prinus Avium CV F12/1) by Shoot Tip Culture

R.GOUDARZI, A. MAJEDI, A.R.TALAIE AND M.MOSTAFAVI

Former Graduate Student, College of Agriculture, University of Tarbiat Modarres , Researcher , Seed and Plant Improvement. Institute , Associate professor, College of Agriculture University of Tehran and Researcher, Seed and Plant Improvement Institute.

Accepted 20 May 1997

SUMMARY

This study was made to propagation cherry rootstock (P.avium cv F12/1) through micropropagation. The explants used in the study were taken from shoot tips and then were surface sterilized by mercuric chloride solution. In propagation stage, Ls medium containingMS salts and LS vitamins along with NAA and BA were used. The most proliferation occurred in hormon mixture of 0.25mg/LNAA and 1 mg/LBA The plantlets were then transferred to a modified rooting medium (LS modified) containing phloroglucinol (PG) and IBA. The highest amount of rooting was witnessed when plantlets were exposed to LS medium with 1 mg/L IBA Next, for the roots to grow, the plantlets were transferred to MS medium without hormones. After a month , when the plantles were fully grown, they were moved to pots.