Archive of SID

Iranian Journal of Horticultural Science
Vol 50, No 3, Autumn 2019 (587-594)
DOI: 10.22059/ijhs.2018.249980.1378

علوم باغبانی ایران
دورهٔ ۵۰، شمارهٔ ۳، پاییز ۱۳۹۸ (ص ۵۹۴-۵۸۷)

تأثیر نوع محیط کشت و تنظیم‌کننده رشدی در کشت مریستم ارقام مختلف گیلاس

محمد اسماعیل نداف[۱]، غلامرضا ربیعی[۲*]، ابراهیم گنجی مقدم[۳] و عبدالرحمن محمدخانی[۴]

۱، ۲ و ۴. دانشجوی دکتری اصلاح و فیزیولوژی میوه، استادیار و دانشیار، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد، ایران

۳. دانشیار، بخش تحقیقات علوم زراعی و باغی، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی خراسان رضوی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، مشهد، ایران

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۱۱/۲ - تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۴/۹)

چکیده

تولید گیاه جدید از طریق کشت مریستم، روش کارآمدی برای به‌دست‌آوردن گیاهان سالم و عاری از ویروس است. این مطالعه به‌منظور بررسی تأثیر نوع محیط کشت و تنظیم‌کننده رشدی بر کشت مریستم در گیلاس در قالب آزمایش فاکتوریل بر پایه طرح کاملاً تصادفی انجام شد که فاکتور اول، رقم در هفت سطح (زرد، سیاه مشهد، دوم‌رس، بینگ، پیش‌رس، تکدانه و حاج یوسفی) و فاکتور دوم، تیمار در چهار سطح (M1R1: محیط نصف MS بدون تنظیم‌کننده رشد، M2R1: محیط کامل MS بدون تنظیم‌کننده رشد، M1R2: محیط نصف MS با تنظیم‌کننده رشد و M2R2: محیط کامل MS با تنظیم‌کننده رشد) بود. ریزنمونه‌های مریستمی از جوانه‌های نوک شاخه بعد از ضدعفونی جدا شدند و در محیط‌های مختلف آزمایش در شرایط کنترل‌شده کشت گردیدند؛ بعد از سومین واکشت، میزان زنده‌مانی و پس از ششمین واکشت، نرخ تکثیر و طول نوشاخه‌های تولیدی اندازه‌گیری شد. نتایج نشان داد که در تمامی شاخص‌ها، بین ارقام اختلاف معنی‌دار وجود ندارد، اما بین تیمارها و همچنین در اثرات متقابل رقم× تیمار این اختلاف، معنی‌دار بود. بیشترین درصد زنده‌مانی برای رقم حاج یوسفی (۴۲/۵ درصد)، نرخ تکثیر برای رقم دوم‌رس (۲/۲) و همچنین طول شاخه برای رقم بینگ (۷/۹ سانتی‌متر) در تیمار محیط کامل MS به‌همراه یک میلی‌گرم در لیتر BAP به‌دست آمد.

واژه‌های کلیدی: ریزازدیادی، زنده‌مانی، عاری از ویروس، نرخ تکثیر، نوک شاخه.

Effect of culture medium and growth regulator in meristem culture of sweet Cherry

Mohammad Esmaeil Naddaf[1], Gholam Reza Rabiei[2*], Ebrahim Ganji Moghadam[3], Abdorahman Mohammadkhani[4]
1, 2, 4. Ph.D. Candidate, Assistant Professor and Associate Professor, Department of Horticultural Science, Faculty of Agriculture, University of Shahrekord, Shahrekord, Iran
3. Associate Professor, Crop and Horticultural Science Research Department, Khorasan Razavi Agricultural and Natural Resources Research and Education Center, AREEO, Mashhad, Iran
(Received: Jan. 22, 2018 - Accepted: Jun. 30, 2018)

ABSTRACT

Regeneration through meristem culture is an efficient way to obtain virus-free plants. This study was conducted to effect of the medium and growth regulator on meristem cultivation in sweet cherry cultivars with factorial experiment based on completely randomized design with seven cultivars (Zard, Siah-E-Mashhad, Dovomres, Bing, Pishres, Takdaneh and Hajyousefi) and type of treatment in four levels of medium and growth regulator (M1H1: half MS without growth regulator, M2H1: complete MS without growth regulator, M1H2: half MS with growth regulator, M2H2: complete MS with growth regulator). Meristem explants (less than 1 mm) were isolated from shoot tips and were cultured in MS medium under controlled conditions; after third subculture (sixth week), meristem survival and activation After sixth subculture (third month), the multiplication rate (production shoot to active sample) and length of the shoot were measured. The results showed that there was no significant difference in survival index as well as multiplication rate and shoot length between cultivars, but this difference was significant between treatments. The highest survival percentage was obtained for Hajyosefi (52.4%), multiplication rate for Dovomres (2.2) and shoot length for Bing (7.9 cm) cultivar in MS medium with 1mg.l-1 BA growth regulator.

Keywords: Multiplication rate, propagation, shoot tips, surviving rate, virus-free.

* Corresponding author E-mail: rabiei.hort@gmail.com

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

تولید گیاهان سالم، عاری از آلودگی و یکنواخت از ارقام مطلوب، در توسعه صنعت باغداری نقش مهمی دارد. گیلاس (*Prunus avium* L.) یکی از مهم‌ترین محصولات باغبانی است که ایران از نظر تولید در جایگاه سوم دنیا قرار دارد (FAO, 2015). در حال حاضر، استفاده از دانهال‌های بذری، به‌دلیل تفرق ویژگی‌های پایه و دیر باردهی و همچنین قلمه به‌خاطر مشکلات ریشه‌زایی، برای گیلاس به‌کلی منسوخ شده است، از این‌رو، تکثیر آنها بیشتر از طریق پیوند صورت می‌گیرد؛ اما روش‌های تکثیر پیوند نیز باعث توسعه عوامل آلودگی، خصوصا آلودگی ویروسی شده و موجب کاهش عملکرد، کاهش سیخک‌های بارده، ریزش میوه قبل از برداشت، زردی و ریزش برگ‌ها و بسیاری از مشکلات کمی و کیفی دیگر در محصول می‌گردد (Ganji Moghadam & Bouzari, 2009). با توجه به اهمیت تولید درختان میوه از جمله گیلاس و خسارات قابل‌توجه ناشی از بیماری‌ها، لزوم اجرای مدیریت صحیح در تولید مواد گیاهی عاری از ویروس ضروری است؛ تلاش‌های بسیاری برای استفاده از ترکیبات شیمیایی و کنترل ناقلین برای حذف عوامل ویروسی نیز هنوز نتایج موفقیت‌آمیزی نداشته است (Ivanicka & Pretova, 1986). از این‌رو، با وجود مشکلات تکثیر از طریق بذر و سایر روش‌های سنتی؛ تکثیر از طریق ریزازدیادی گیلاس می‌تواند منجر به تولید گیاهان کلونی سالم و یکنواخت در مدت زمان بسیار کمتری شود؛ با این‌حال، در روش‌های کشت بافت، ثبات ژنتیکی در انبوه گیاهان تولیدی در طول مدت ریزازدیادی تحت تأثیر عوامل زیادی قرار می‌گیرد؛ ولی مشخصاً مناسب‌ترین اندامی که باعث حفظ خصوصیات ژنتیکی رقم می‌گردد، مریستم جوانه‌هاست. استفاده از کشت مریستم، یکی از مؤثرترین روش‌های حذف عوامل بیماری‌زای ویروسی هست؛ چرا که عدم وجود بافت آوندی و فضاهای بین‌سلولی و سرعت بالای تقسیم سلولی، مانع از تکثیر عوامل ویروسی و شبه‌ویروسی می‌گردد.

استفاده از مریستم انتهایی شاخساره، متداول‌ترین شیوه برنامه‌های عاری‌سازی ویروسی در گیاهان خصوصا درختان میوه می‌باشد (Ivanicka & Pretova, 1986)؛ مزایای عمده‌ای که کشت مریستم برای گیاهان فراهم می‌کند از جمله، تکثیر کلونال[1] در شرایط آزمایشگاهی با حداکثر پایداری ژنتیکی؛ پتانسیل بالا در حذف عوامل ویروسی، باکتری و قارچی؛ نگهداری و ذخیره‌سازی ژرم‌پلاسم؛ ریزازدیادی سریع، دقیق و حفظ مواد شیمری و حمل و نقل مواد گیاهی ایمن و سالم قرنطینه‌ای می‌باشد (Narender & Kutty, 1994). روش کشت مریستم، برای ارقام ریشه‌زا به‌صورت ریزپیوندی نیز صورت می‌گیرد که دارای تمامی ویژگی‌های کشت مریستم می‌باشد (Hussain *et al.*, 2014).

در درختان میوه به‌دلیل مشکلات متعدد، تکثیر و ریزازدیادی درون‌شیشه‌ای نسبت به گیاهان علفی دارای محدودیت زیادی است. ریزازدیادی کامل از کشت مریستم در بسیاری از گونه‌های چوبی، به‌منظور تولید گیاهان سالم در شرایط کشت بافت نیز مشکل می‌باشد؛ لذا ضروری است که شرایط کشت مریستم جهت تولید هرگونه گیاهی همواره بهینه‌سازی شود. گیاهانی که از کشت مریستم به‌دست می‌آید می‌توانند به‌طور مستقیم استفاده شوند، اما اغلب آنها به‌عنوان مواد گیاهی پایه برای تولید کلونی جدید مورد استفاده قرار می‌گیرند. موفقیت در کشت مریستم گیلاس مثل سایر گیاهان به نوع ژنوتیپ (Erbenova *et al.*, 2001). شرایط فیزیولوژیکی گیاه مادری از جمله اندازه و نوع ریزنمونه (Ivanicka & Pretova, 1986) و شرایط محیطی مثل زمان نمونه‌گیری (Mert & Soylu, 2010)، انواع محیط کشت و غلظت‌های تنظیم‌کننده‌های رشد (Zamanipour *et al.*, 2015) و سایر عامل بستگی دارد.

انواع محیط‌های کشت چون محیط کامل MS، یا رقیق‌شده آن با غلظت نصف نمک‌های ماکرو، محیط کشت گیاهان چوبی[2] و LS (Linsmaier & Skoog, 1965) برای کشت مریستم مورد استفاده قرار گرفته

1. Clonal
2. Woody Plant Medium (WPM)

www.SID.ir

Archive of SID

است؛ البته متداول‌ترین محیط کشت برای آن، MS می‌باشد (Narender & Kutty, 1994). رشد و تمایز مریستم‌ها در محیط کشت تحت کنترل تنظیم‌کننده‌های رشدی است و حضور آنها جهت استقرار ریز نمونه‌ها و رشد مطلوب بعدی آنها ضروری است. ترکیبات مختلفی چون سایتوکینین‌ها و جیبرلین‌ها به‌تنهایی یا همراه با اکسین با غلظت‌های مختلف جهت استقرار و پرآوری مریستم مورد استفاده قرار گرفته‌اند (Hu & Wang, 1983; Narender & Kutty, 1994).

باوجود گزارش‌های محدود در مورد کشت مریستم ارقام گیلاس، بهترین محیط کشت مریستم برای گیلاس رقم پیش‌رس مشهد، محیط MS کامل به‌همراه یک میلی‌گرم در لیتر BA بوده است (Zamanipour *et al.*, 2015). در کشت مریستم گیلاس در محیط کشت MS بیان شد که ترکیب دو میلی‌گرم در لیتر BA به‌همراه ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر IBA و NAA بیشترین درصد بقا و تعداد برگ را در برداشت و همچنین استفاده از آنتی‌اکسیدان ذغال‌فعال با غلظت دو میلی‌گرم در لیتر، روی درصد بقا تأثیر بهتری داشت؛ ولی پلی‌وینیل‌پروپیلن[1] در سطح یک میلی‌گرم در لیتر بر تعداد و اندازه برگ مؤثر بود و میزان قهوه‌ای شدن ریز نمونه‌ها را به‌میزان زیادی کاهش داد (Manuchehr *et al.*, 2009). در تولید پایه‌های سالم آلبالو و گیلاس با استفاده کشت مریستم، از محیط نصف MS (که عناصر ماکروی آن به نصف کاهش یافته بود) به‌همراه تنظیم‌کننده‌های رشدی BAP و GA_3 به‌ترتیب به‌میزان یک و ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر استفاده شد (Buzkan *et al.*, 1997).

در کشت درون‌شیشه‌ای مریستم زردآلوی رقم Bakuohگزارش شد که محیط کشت گیاهان چوبی به‌همراه سایتوکینین، بهترین نتیجه را در میزان بقای مریستم و رشد طولی شاخساره‌ها به‌همراه داشت (Murai *et al.*, 1997). درکشت مریستم زردآلو برای رقم El-Hamavey بهترین محیط استقرار، محیط کشت گیاهان چوبی با یک میلی‌گرم در لیتر زآتین و ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر IAA در حضور ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر اسید آسکوربیک و ۱۵۰ میلی‌گرم در لیتر اسید سیتریک بود (Soliman, 2012). درکشت مریستم آلو رقم Jubileu نیز محیط MS حاوی ۰/۷ میلی‌گرم در لیتر BA و ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر IBA باعث افزایش میزان زنده‌مانی نمونه‌ها شده است (Jakab *et al.*, 2008). محیط کشت MS با غلظت ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر IBA و یک میلی‌گرم در لیتر BA در ارقام زردآلو بیشترین تکثیر شاخه را داشت (Pérez-Tornero & Burgos, 2000). بهترین محیط کشت برای ریزازدیادی ارقام توت‌فرنگی نیز محیط MS حاوی یک میلی‌گرم در لیتر BA، ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر GA3 و ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر IBA گزارش شده است (Mozafari & Bahramnejad, 2010).

این مطالعه با هدف بررسی تأثیر نوع محیط کشت و تنظیم‌کننده رشدی بر موفقیت شاخص‌های کشت مریستم در هفت رقم مختلف گیلاس در شرایط درون‌شیشه‌ای انجام شده است.

مواد و روش‌ها

در این آزمایش، جهت بررسی کشت مریستم گیلاس از یک آزمایش دو فاکتوره در قالب طرح کاملاً تصادفی در شش تکرار، شامل هفت ریز نمونه، اجرا شد که شامل فاکتور اول: ارقام گیلاس در هفت سطح (زرد: Zard، سیاه مشهد: Siah، دوم‌رس: Dovomres، بینگ: Bing، پیش‌رس: Pishres، تکدانه: Takdaneh، حاج یوسفی: Hajyousefi) و فاکتور دوم: نوع تیمار کشت در چهار سطح از نوع محیط و تنظیم‌کننده رشدی (M1R1: محیط نصف MS بدون تنظیم‌کننده رشد، M2R1: محیط کامل MS بدون تنظیم‌کننده رشد، M1R2: محیط نصف MS کامل با تنظیم‌کننده رشد، M2R2: محیط MS با تنظیم‌کننده رشد) انجام شد.

مواد گیاهی و آماده‌سازی ریزنمونه‌ها

برای به‌دست آوردن ریز نمونه‌های مریستمی، قلمه‌هایی از نوک شاخساره‌های درختان بالغ هفت رقم گیلاس از ایستگاه تحقیقات گلمکان مشهد به طول

1. PVP

www.SID.ir

Archive of SID

۱/۵ تا ۲ سانتی‌متر در اواخر دوره رشد تهیه شدند. جوانه‌های نوک شاخه پس از جداسازی از قلمه‌ها، به‌مدت ۱۰ دقیقه در مایع ظرف‌شویی تواین قرار گرفته و سپس سه بار با آب مقطر شستشو شدند. بعد از آن، ریز نمونه‌ها در دو نوبت، قبل از استریلیزاسیون سطحی و همچنین حین زمان کشت در محلول ۱۰۰ میلی‌لیتر اسید آسکوربیک و ۱۵۰ میلی‌لیتر اسید سیتریک، به‌مدت ۱۰ دقیقه برای جلوگیری از قهوه‌ای‌شدن بافت‌ها غوطه‌ور شدند. استریل سطحی با اتانول (۷۰ درصد) به‌مدت ۳۰ ثانیه و سپس ضدعفونی کامل با استفاده از هیپوکلریت سدیم (۲۰ درصد) به‌مدت ۱۰ دقیقه انجام شد و در نهایت ریزنمونه‌ها با آب مقطر استریل، سه بار شستشو شدند. بعد از حذف فلس‌های برگ‌های آغازی از جوانه‌های نوک ساقه، ریز نمونه‌های مریستمی به ابعاد کمتر از ۰/۵ میلی‌متر زیر استریو میکروسکوپ (SZ6045TR، Olympus .Optical Co. Ltd، Tokyo، Japan) جدا شدند؛ تمامی مراحل در شرایط استریل و زیر هود انجام گردید (Hu & Wang, 1983).

کشت و انکوباسیون ریزنمونه‌ها

ریز نمونه‌های مریستمی در محیط‌های متفاوت کشت آزمایش شامل محیط پایه MS (Murashige & Skoog, 1962)، با تنظیم‌کننده رشد بهینه (یک میلی‌گرم در لیتر BAP) و بدون آن همراه با ۳۰ گرم در لیتر ساکارز و ۲/۸ گرم فایتوژل که pH آن روی ۵/۷ تنظیم شده بود، کشت شدند. کشت ریز نمونه‌های مریستمی برای اطمینان از رطوبت نسبی بالا در لوله‌های کشت ۲۵ × ۱۵۰ میلی‌متری که با کلاهک‌های غشایی پوشیده‌شده بودند و در دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۲۰ دقیقه استریل شده بودند، انجام شد. برای هر تیمار ۴۲ نمونه (شش تکرار با هفت ریزنمونه) استفاده شد. ریز نمونه‌های کشت-شده برای جلوگیری از تداخل ترکیبات فنلی، ابتدا به-مدت یک هفته در شرایط کم‌نور ۱۰۰ لوکس و سپس در شرایط دمای ۲۵-۲۲ درجه سانتی‌گراد و نور ۲۰۰۰ لوکس و تناوب نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی در اتاقک رشد نگهداری شدند.

تحلیل آماری

شاخص‌های تعیین‌کننده در موفقیت کشت مریستم، در هر کدام از گیاهچه‌های ریز پیوندی اندازه‌گیری شد. شاخص‌های درصد زنده‌مانی موفق (تعداد مریستم‌های فعال به کل تعداد ریز نمونه، چهار هفته بعد کشت)؛ نرخ تکثیر (تعداد شاخه تولیدی به مریستم‌های فعال شش هفته پس از کشت) و میزان رشد ریز نمونه (اندازه‌گیری طول قسمت رشد کرده شش هفته پس از کشت) ثبت گردید و اطلاعات به‌دست آمده توسط نرم‌افزار آماری SPSS 17 تجزیه و تحلیل و میانگین‌ها توسط آزمون چنددامنه‌ای دانکن در سطح احتمال یک و پنج درصد مقایسه شدند (Snedecor & Cochran, 1986) همچنین نمودارها با نرم‌افزار Excel 2010 ترسیم شد.

نتایج و بحث

نتایج تجزیه واریانس آزمایش نشان داد که در تمامی شاخص‌های کشت مریستم از جمله درصد زندمانی، نرخ تکثیر و رشد طولی شاخه، تفاوت معنی‌داری بین ارقام وجود ندارد؛ اما اختلاف بین تیمارها و همچنین اثرات متقابل رقم و تیمار تنها در سطح احتمال پنج درصد معنی‌دار بود (جدول ۱).

جدول ۱. نتایج تجزیه‌ی واریانس ویژگی‌های مورد بررسی در کشت مریستم گیلاس

Table 1. Results of analysis of variance characteristics studied in meristem culture of sweet cherry

S.O.V	df	MS		
		Surviving (%)	Multiplication rate	Shoot length
Varity	6	0.52 ^{ns}	0.27 ^{ns}	0.01 ^{ns}
Treat	3	13.29*	5.68*	29.58*
Varity × Treat	18	10.23*	1.77*	14.68*
C.V. (%)	-	14.74	6.79	7.64

**، * و ns: وجود اختلاف معنی‌دار آماری در سطح احتمال ۱ درصد و ۵ درصد و نبود اختلاف معنی‌داری.

**, *, ns: Significant at 1% and 5% of probability levles, and non-significant, respectively.

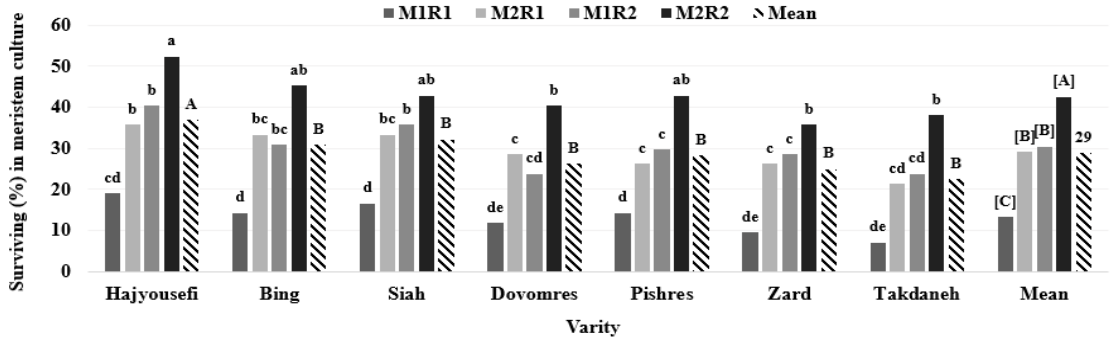
در صفت درصد زنده‌مانی در سومین واکشت، مریستم‌های کشت-شده در محیط MS حاوی یک میلی‌گرم در لیتر BA در تمامی ارقام بیشترین میزان موفقیت (میانگین ۴۲/۵ درصد) و مریستم‌های کشت‌شده در محیط MS نصف بدون تنظیم‌کننده

www.SID.ir

Archive of SID

رشد، کمترین درصد موفقیت (۱۳/۳ درصد) را دارا بودند و بین ارقام نیز بیشترین میانگین درصد زنده‌مانی در رقم حاج یوسفی (۳۶/۹ درصد) و کمترین میانگین آن در رقم تکدانه (۲۲/۶ درصد) به‌دست آمد و میانگین کل درصد زنده‌مانی در تمامی ارقام و تیمارها ۲۸/۹ درصد مشاهده شد (شکل ۱).

میانگین نرخ تکثیر که از نسبت تولید شاخه‌های جانبی در هر واکشت در ریز نمونه‌های کشت مریستم اندازه‌گیری شد، سه ماه پس از کشت در واکشت ششم ثبت گردیدند، در واکشت‌های اول، این نرخ پایین و با افزایش روند واکشت این ضریب افزایش یافت. بیشترین میزان نرخ تکثیر در واکشت ششم نمونه‌های کشت مریستمی نیز مانند سایر شاخص‌ها مربوط به تیمار محیط MS حاوی یک میلی‌گرم در لیتر BA (۱/۹) در کل ارقام بود و بهترین نتیجه مربوط به میانگین رقم دوم‌رس (۱/۸) و کمترین میانگین آن مربوط به رقم تکدانه (۱/۵) بود و همچنین میانگین کل نرخ تکثیر در تمامی ارقام و تیمارها ۱/۶ به‌دست آمد (شکل ۲).

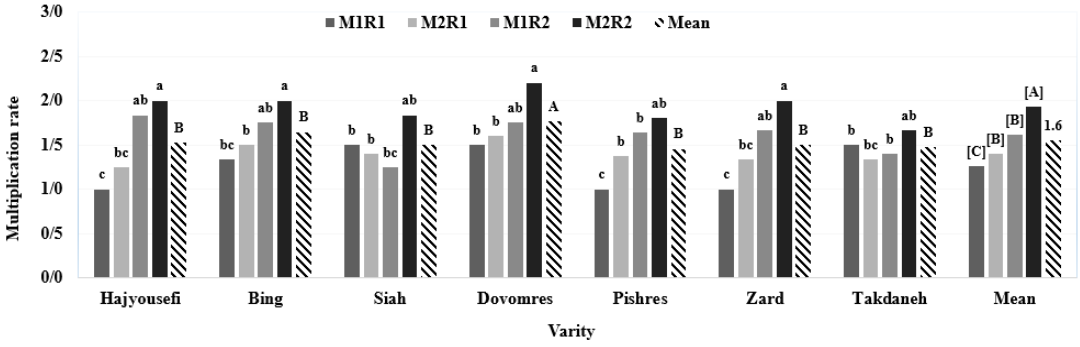


شکل ۱. تأثیر محیط کشت و تنظیم‌کننده رشدی بر درصد زنده‌مانی درکشت مریستم ارقام مختلف گیلاس.

(M1R1: محیط نصف MS، M2R1: محیط MS، M1R2: محیط نصف MS با تنظیم‌کننده رشد، M2R2: محیط MS با تنظیم‌کننده رشد)

* میانگین‌ها با حروف مشابه، تفاوت معنی‌داری در سطح احتمال ۵٪ ندارند.

Figure 1. Effect of medium and growth regulator on surviving (%) in meristem culture of sweet cherry. (M1R1:1/2MS; M2R1: MS; M1R2:1/2MS with growth regulator and M2R2: MS with growth regulator)
* Means with same letters are not significantly different at p< 0.05.



شکل ۲. تأثیر محیط کشت و تنظیم‌کننده رشدی بر نرخ تکثیر درکشت مریستم ارقام مختلف گیلاس.

(M1R1: محیط نصف MS، M2R1: محیط MS، M1R2: محیط نصف MS با تنظیم‌کننده رشد، M2R2: محیط MS با تنظیم‌کننده رشد)

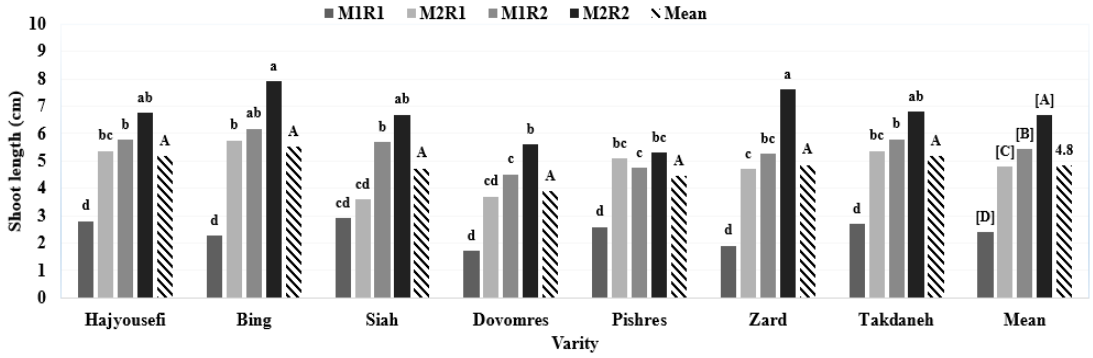
* میانگین‌ها با حروف مشابه، تفاوت معنی‌داری در سطح احتمال ۵٪ ندارند.

Figure 2. Effect of medium and growth regulator on multiplication rate in meristem culture of sweet cherry. (M1R1:1/2MS; M2R1: MS; M1R2:1/2MS with growth regulator and M2R2: MS with growth regulator)
* Means with same letters are not significantly different at p< 0.05.

www.SID.ir

Archive of SID

برای محاسبه میزان رشد طولی نمونه‌های کشت مریستم، طول قسمت رشدکرده نمونه‌های کشت مریستم سه ماه پس از کشت (واکشت ششم) اندازه‌گیری شد. با توجه به نتایج، بیشترین میزان رشد طی هشت هفته همچنان مربوط به تیمار محیط MS حاوی یک میلی‌گرم در لیتر BA (۶/۷ سانتی‌متر) بود. بهترین نتیجه مربوط به میانگین رقم زرد (۵/۵ سانتی‌متر) و کمترین رشد مربوط به رقم دومرس (۳/۹ سانتی‌متر) و میانگین کل شاخص رشد طولی در تمامی ارقام و تیمارها ۴/۸ سانتی‌متر به‌دست آمد (شکل ۳).



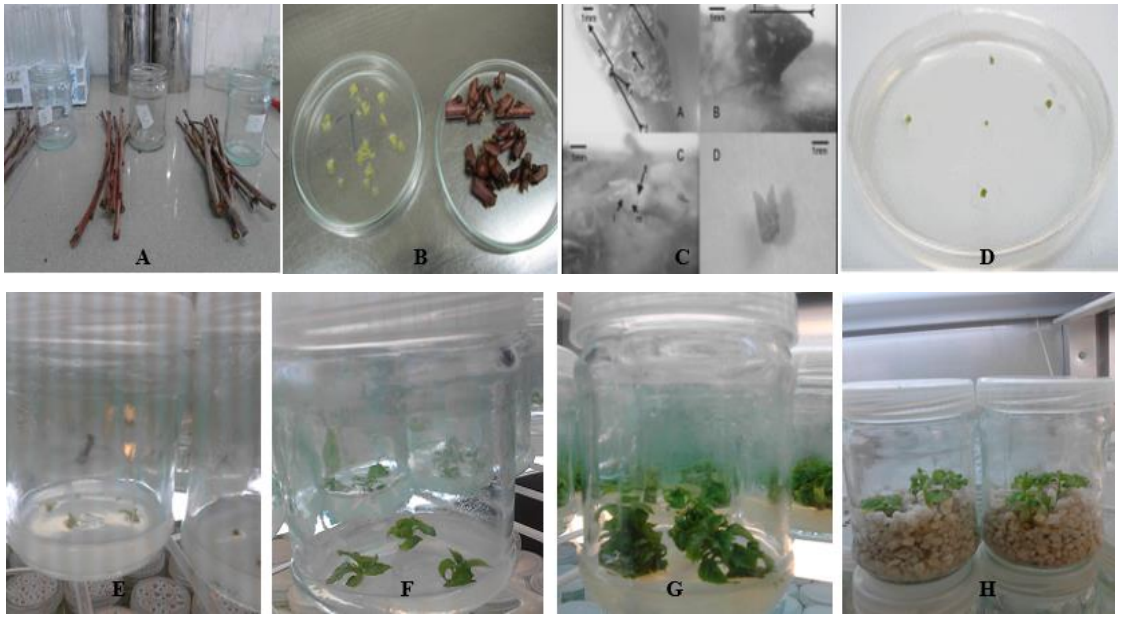
شکل ۳. تأثیر محیط کشت و تنظیم‌کننده رشدی بر رشد طولی ساقه درکشت مریستم ارقام مختلف گیلاس.

(M1R1: محیط نصف MS، M2R1: محیط MS، M1R2: محیط نصف MS با تنظیم‌کننده رشد، M2R2: محیط MS با تنظیم‌کننده رشد)

* میانگین‌ها با حروف مشابه، تفاوت معنی‌داری در سطح احتمال ۵٪ ندارند.

Figure 3. Effect of medium and growth regulator on shoot length (cm) in meristem culture of sweet cherry (M1R1:1/2MS; M2R1: MS; M1R2:1/2MS with growth regulator and M2R2: MS with growth regulator)

* Means with same letters are not significantly different at p< 0.05.



شکل ۴. مراحل مختلف کشت مریستم گیلاس در شرایط درون‌شیشه‌ای (به‌عنوان نمونه رقم تکدانه)؛ A: آماده‌سازی ریزنمونه‌ها؛ B و C: جداسازی مریستم؛ D: کشت مریستم؛ E: استقرار مریستم؛ F و G: تکثیر نوشاخه‌ها و H: ریشه‌زایی نمونه‌ها.

Figure 4. Stages of meristem culture of sweet cherry *in vitro* (for example: cv. Takdaneh): A: Preparation of explants; B & C: Separation of meristem; D: Cultivation of meristem; E: Establishment of meristem; F & G: Multiplication and H: rooting of explants.

www.SID.ir

Archive of SID

نتایج این مطالعه مشخص کرد که موفقیت در کشت مریستم در شرایط درون‌شیشه‌ای تحت تأثیر نوع رقم، نوع محیط و وجود تنظیم‌کننده‌های رشدی قرار دارد. وجود عدم تفاوت معنی‌دار در ارقام مختلف گیلاس برای هر یک از شاخص‌های رشد مریستم، نشان از میزان خویشاوندی ژنتیکی نزدیک ارقام می‌تواند باشد با این وجود، این موضوع با نتایج بسیاری از گزارشات تطابق نداشت. با توجه به سرعت بالای تکثیر سلول‌های مریستمی و نقش مواد غذایی برای فعال-شدن و رشد ریز نمونه‌های مریستمی، آزمایشات نشان داد که محیط کامل MS نسبت به محیط نصف MS کارایی بالاتری دارد. گیاهان کشت‌شده در شرایط آزمایشگاهی نیاز به تامین مواد غذایی در محیط کشت دارند؛ پاسخ کشت بافت به تیمارهای مواد غذایی به ژنوتیپ وابسته است (Hu & Wang, 1983). در کشت مریستم گیلاس، افزایش رشد ریزنمونه‌ها و ایجاد جوانه در محیط MS غلظت کامل بیشتر از نصف MS بود که نتایج آن مشابه گزارش کشت مریستم در ارقام گیلاس (Snir, 1982) و همچنین نتایج برای رقم گیلاس پیش‌رس مشهد بود (Zamanipour *et al.*, 2015). همچنین وجود تنظیم‌کننده‌های رشدی سیتوکینین به‌دلیل نقش بارز آنها در تقسیم و طویل‌شدن سلولی خصوصا در سلول‌های مریستمی نتایج بسیار متفاوتی در مقابل محیط بدون تنظیم‌کننده رشد داشت. BA بیشترین انتخاب تنظیم‌کننده رشد سیتوکینین در کشت مریستم است (Hu & Wang, 1983). در آزمایش حاضر مشخص شد که BA تکثیر نوشاخه‌های احتمالی و رشد طولی ساقه را افزایش می‌دهد. این نتایج مشابه گزارش کشت مریستم رقم پیش‌رس مشهد بود که نشان داده بود BA تکثیر و رشد برخی گونه‌های هسته‌دار را در شرایط کشت بافت سرعت می‌دهد (Zamanipour *et al.*, 2015). نتایج مشابه گزارش در ارقام گیلاس نیز نشان داد که وجود BA، میزان بقا مریستم‌ها را نسبت به تیمار کنترل افزایش می‌دهد که استفاده از بالاترین غلظت BA (یک میلی‌گرم در لیتر) باعث افزایش میزان زنده‌ماندنی شد (Snir, 1982). این نتیجه نیز موافق با گزارش کشت مریستم رقم پیش‌رس مشهد بود که یک میلی‌گرم در لیتر BA در زنده‌مانی و رشد مریستم گیلاس بهترین نتیجه را داشته است (Zamanipour *et al.*, 2015) و همچنین گزارش کشت مریستم در ارقام زردآلو که بیشترین میزان غلظت BA (یک میلی‌گرم در لیتر) باعث افزایش میزان زنده‌مانی مریستم‌ها شده بود (Pérez-Tornero & Burgos, 2000).

نتیجه‌گیری کلی

نتایج به‌دست‌آمده از این آزمایش نشان داد که درصد زنده‌مانی و نرخ تکثیر و همچنین رشد طولی شاخه تولیدی ریز نمونه‌های مریستم در ارقام مختلف گیلاس تقریبا مشابه است ولی در بین تیمارهای کشت، تفاوت زیادی مشاهده گردید، به‌طوری‌که تیمار محیط کشت MS کامل با یک میلی‌گرم در لیتر BAP، در همه شاخص‌ها دارای بالاترین میزان بود. این نتایج نیز نشان می‌دهد که این شاخص‌ها دارای ارتباط نزدیکی با هم در موفقیت کشت مریستم در گیلاس می‌باشند.

سپاسگزاری

این پژوهش به‌عنوان بخشی از پروژه ملی تولید گیاهان سالم در هسته‌دارها در مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی خراسان رضوی طی سال‌های ۹۴ تا ۹۶ اجرا شده است، لذا از مسولین و کارکنان بخش علوم زراعی و باغی، خصوصاً پرسنل آزمایشگاه کشت بافت باغبانی این مرکز، تشکر و قدردانی می‌گردد.

REFERENCES

1. Buzkan, N., Çetiner, S., Yalçin-Mendi, Y. & Di Terlizzi, B. (1997). Clonal propagation of disease free rootstooks for sour and sweet cherry by meristem culture. *Acta Horticultural*, 441, 327-332.
2. Erbenova, M., Paprstein, F. & Sedlak, J. (2001). In vitro propagation of dwarfed rootstocks for sweet cherry. *Acta Horticultural*, 560, 477-480.

www.SID.ir

Archive of SID

3. Food and Agriculture Organization. (2015). *FAO stat: Agricultural data in FAO*. Retrieved January 2015, from http://www.fao.org/faostat.
4. Ganji Moghadam, E. & Bouzari, N. (2009). *Sweet cherry*. Tehran, Gholami Press, 344p. (in Farsi)
5. Hu, C. Y. & Wang, P. J. (1983). Meristem, Shoot Tip and Bud Culture. In: Envans, D.A., Sharp, W.R., Ammiratto, P.V. & Yamada, Y. (Eds), *Handbook of Plant Cell Culture*, Volume 1, (pp.177-227.) Macmillan, New York, U.S.A.
6. Hussain, G., Wani, M., Mir, M., Rather, Z. & Bhat, K. (2014). Micrografting for fruit crop improvement. *African Journal of Biotechnology*, 13(25), 2474-2483.
7. Ivanicka, J. & Pretova, A. (1986). Cherry (*Prunus avium* L.), in: Bajaj, Y. (Ed), *Handbook of Biotechnology in agriculture and forestry*, Vol I, Trees 1, (pp. 154-169.) *Springer Science*.
8. Jakab, I., Pamfil, D., Clapa, D. & FIRA, A. (2008). In vitro regeneration & meristem culture of *Prunus domestica* cv. Bulletin. *UASVM Horticulture*, 126-131.
9. Linsmaier, E. & Skoog, F. (1965). Organic growth factor requirements of tobacco tissue culture, *Plant, Cell and Tissue Organ Culture*, 33, 105-119.
10. Manuchehr, SH., Zamani, Z. & Buzari, N. (2009). Effect of growth regulators concentration and antioxidant on meristem culture of Sweet Cherry in vitro. In: Proceedings of *6th Iranian Congress of Horticulture Science*, 13-16 July, Gilan University, Rasht, Iran, pp. 643-647. (in Farsi)
11. Mert, C. & Soylu, S. (2010). Shoot location & collection time effects on meristem tip culture of some apple rootstocks. *Pakistan Journal of Botany*, 42 (1), 549-557.
12. Mozafari, A. & Bahramnejad, B. (2010). The effects of medium and hormones mixture on the morphological changes of *Fragaria annanasa* by meristem culture. *Life Technology*, 9(2), 17-29.
13. Murashige, T. & Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth & bioassay with tobacco culture. *Plant Physiology*, 15, 473-497
14. Murai, Y., Harada, H. & Yamashita, H. (1997). In vitro propagation of Apricot (*Prunus armenica* L.) cv. Bakuoh junkyuo. *Soc. Horticulture Science*, 66 (3.4), 475-480.
15. Narender, S. & Kutty, K. (1994). Meristem & Shoot Tip Culture In: Indra, K. & Vasil, T. (Eds), *Handbook of Plant Cell & Tissue Culture*, (pp.37-70.) Springer Science.
16. Pérez-Tornero, O. & Burgos, L. (2000). Different media requirements for micro propagation of apricot cultivars. *Plant Cell, Tissue & Organ Culture*, 63, 133-141.
17. Snedecor, G. M. & Cochran, W. G. (1986). *Statistical Methods*. (9th ed.). The Iowa State Univ., Press. Th. Amer. Iowa, U.S.A. 207p.
18. Snir, I. (1982). In vitro propagation of sweet Sweet cherry cultivars. *HortScience*. 17(2), 192-193.
19. Soliman, H. (2012). In vitro propagation of Apricot (*Prunus armeniaca* L.) and assessment of genetic stability of micropropagated plants using RAPD analysis. *World Applied Science Journal*, 19(5), 674-687.
20. Tioleneve, V.M. (1993). *Regeneration of Front Crops from Somatic Tissues*. (1st ed.). Pushino. 173p.
21. Zamanipour, M., Ganji Moghadam, E., Tehranifar, A. & Abedi, B. (2015).The effects of media, plant growth regulators & apex size on the success of meristem culture in *prunus avium* CV pishras-e-mashhad. *Indian Journal of Fundamental & Applied Life Sciences*, 5 (1), 924-929.

www.SID.ir