Archive of SID

دو فصلنامه علمی-پژوهشی تحقیقات ژنتیک و اصلاح گیاهان مرتعی و جنگلی ایران
جلد ۲۵، شماره ۱، صفحه ۲۳-۱۳ (۱۳۹۶)

تأثیر نور و تنظیم‌کننده رشد در تکثیر بادام‌کوهی (*Amygdalus scoparia*) به روش کشت درون‌شیشه‌ای جنین

حسین میرزایی ندوشن[۱]*، میترا امام[۲]، سمیه اعزازی[۳] و سپیده کلاته جاری [۴]

۱*- نویسنده مسئول مکاتبات، استاد، مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران
پست الکترونیک: nodoushan2003@yahoo.com
۲ - استادیار، مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران
۳ - کارشناس ارشد، تحصیلات تکمیلی دانشگاه آزاد اسلامی، تهران
۴ - استادیار، تحصیلات تکمیلی دانشگاه آزاد اسلامی، تهران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۰۵/۲۳ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۵/۱۰/۱۰

چکیده

بادام کوهی (*Amygdalus scoparia* Spach) یکی از گونه‌های ارزشمند بادام با کابردهای زیست‌محیطی، حفظ خاک، دارویی و خوراکی است که به‌عنوان پایه در توسعه کشت بادام اهلی نیز مورد استفاده قرار می‌گیرد. در این پژوهش پس از استقرار درون‌شیشه‌ای جنین بادام کوهی و رشد شاخساره‌ها در محیط کشت DKW با ترکیب تنظیم‌کننده‌های رشد IBA، BA و TDZ با مقادیر به‌ترتیب ۰/۰۱، ۰/۵ و ۰/۰۵ میلی‌گرم در لیتر، تأثیر عوامل نور و تنظیم‌کننده‌های رشد بر ریشه‌زایی شاخساره‌های حاصل از جنین در یک آزمایش فاکتوریل در قالب طرح پایه کاملا تصادفی مورد مطالعه قرار گرفت. از نور به‌عنوان عامل اول در دو سطح (الف: ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی، ب: دائم در تاریکی به مدت ۱۰ روز) و تنظیم‌کننده رشد در محیط کشت پایه DKW به‌عنوان عامل دوم در پنج سطح (۱: IBA + NAA هریک به میزان ۱ میلی‌گرم در لیتر، ۲: NAA به میزان ۱ میلی‌گرم در لیتر، ۳: IBA به میزان ۱ میلی‌گرم در لیتر، ۴: IBA به میزان نیم میلی‌گرم در لیتر، ۵: NAA به میزان نیم میلی‌گرم در لیتر) استفاده شد. براساس نتایج تجزیه واریانس، دو عامل نور و تنظیم‌کننده رشد تأثیر معنی‌دار و متفاوتی بر همه صفات مورد مطالعه در ریشه‌زایی داشتند. روشنایی موجب رشد بهتر شاخساره‌ها نسبت به تاریکی شد. سطوح مختلف تنظیم‌کننده‌های رشد به‌کار رفته در محیط کشت هم اثرات متنوعی بر رشد شاخساره‌ها و ریشه‌زایی گذاشتند. ترکیب IBA و NAA بیشترین تعداد ریشه را تولید کرد. ولی IBA به مقدار ۱ میلی‌گرم در لیتر بیشترین طول ریشه اصلی، تعداد و طول ریشه‌های فرعی را ایجاد کرد. اثر متقابل عوامل نور و محیط کشت بر طول شاخساره، طول ریشه اصلی، تعداد و طول ریشه فرعی اثر معنی‌داری گذاشت، به‌طوری‌که ترکیب دو تنظیم‌کننده رشد در روشنایی بیشترین تعداد ولی استفاده از ۱ میلی‌گرم NAA در تاریکی بیشترین تعداد ریشه فرعی را تولید کرد. بر اساس نتایج حاصل از این مطالعات، وجود تناوب نور و تاریکی و استفاده از تنظیم‌کننده رشد IBA در تکثیر رویشی ژنوتیپ‌های مختلف بادام کوهی ضروریست.

واژه‌های کلیدی: بادام کوهی، تنظیم‌کننده رشد، ریزازدیادی، روشنایی، *Amygdalus scoparia*

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

جنس بادام در نقاط مختلف جهان بیش از ۴۰ گونه دارد که بیش از ۳۰ گونه آن در ایران رویش دارند. بادام کوهی (*Amygdalus scoparia* Spach.) که یک گونه درختچه‌ای خزان‌کننده است در کشور ما اهمیت زیست‌محیطی زیادی دارد. این گونه درختچه‌ای خزان‌کننده به‌طور متوسط ۲ تا ۲/۵ متر ارتفاع دارد ولی گاهی حتی به ارتفاع ۶ متر هم رسیده است. به‌دلیل تولید تعداد زیادی شاخه کوتاه، متراکم و استوانه‌ای به‌خوبی از سایر گونه‌ها متمایز است. در زمینه مطالعات ژنتیکی و اصلاحی و روش‌های تکثیر این گونه نیز اطلاعات کافی موجود نیست. این در حالی است که علاوه بر ارزش‌های زیست‌محیطی، این گونه دارای کاربری‌های دارویی است و به‌دلیل مقاومت زیاد به خشکی و سرما و نیز مقاومت به اسیدیته بالای خاک از نهال آن به‌عنوان پایه در بادام اهلی هم استفاده می‌شود. اگرچه گفته می‌شود که بهترین شرایط رویشگاهی برای این گونه جهت جغرافیایی جنوبی و طبقه ارتفاعی ۱۸۰۰ تا ۱۹۰۰ متری از سطح دریا با شیب ۴۰ تا ۵۰ درصد است (Mahdavi *et al.*, 2010). ولی عوامل متعدد دیگری مانند خاک رویشگاه (Abella & Convington 2006)، رطوبت، بافت و اسیدیته خاک (Kooch *et al.*, 2008)، آهک، ازت، کربن آلی، ارتفاع از سطح دریا، هدایت الکتریکی خاک، املاح پتاسیم، گچ و آهک (Jafari *et al.*, 2002) نیز در پراکنش و حضور این گونه مؤثر قلمداد شده‌اند. البته در مورد عرض جغرافیایی و نیز ارتفاع پراکنش گونه‌های مختلف جنس بادام عرض ۳۶ تا ۳۹/۷ درجه و دامنه ارتفاعی ۹۰۰ تا ۲۳۰۰ متری نیز گزارش شده است (Gorttapeh *et al.*, 2006). از نظر پراکنش در جهت شیب هم گاهی گفته شده که به‌دلیل نورپسندی بالا، تعداد پایه در واحد سطح این گونه در شیب‌های جنوبی بیشتر است (Badano *et al.*, 2005). به‌عبارت دیگر اگرچه دامنه‌های شمالی و شرقی از نظر رطوبت شرایط بهتری را برای رشد این گونه فراهم می‌کنند ولی به‌دلیل اثرات متقابل عوامل محیطی و ژنوتیپ‌های مختلف، این گونه شرایط شیب‌های جنوبی با نور بیشتر را بهتر می‌پسندد. تراکم این گونه در واحد سطح در کشور هم با توجه به جهت، شیب و سایر شرایط جغرافیایی متغیر است. با این حال در دو نقطه مختلف از استان فارس تراکم این گونه بین ۸۳ تا۱۱۱ پایه در هکتار گزارش شده است (Alvaninejad & Marvi Mohajer, 2004).

با توجه به اینکه انتخاب پایه مناسب در تولید بادام اهلی از سایر گونه‌های بادام به‌ویژه گونه اسکوپاریا منجر به بهبود تولید در بادام اهلی شده است (Gharaghani & Eshghi, 2015)، پژوهشگران بر روی انتخاب پایه‌های مناسب از بادام کوهی و تکثیر رویشی آن متمرکز شده‌اند (Emam *et al.*, 2013; Isikalan *et al.*, 2008). تکثیر غیرجنسی بهترین روش ممکن در تثبیت ژنتیکی پایه‌های منتخب از یک گونه جنگلی است. با روشهای مختلف تکثیر غیرجنسی می‌توان از ژنوتیپ‌های مطلوب کلن‌هایی تهیه کرد که ضمن اینکه همگی از نظر ژنتیکی مشابه یکدیگرند با پایه اولیه نیز مشابهت کامل دارند. از این طریق در برخی از گونه‌های درختی و درختچه‌ای به‌ویژه در درختان میوه، سالهای طولانی است که یک ژنوتیپ خاص با حفظ ماهیت اولیه ژنتیکی نگهداری و استفاده شده است. اگرچه روش‌های متعددی برای تکثیر رویشی درختان و درختچه‌ها وجود دارد ولی ریزازدیادی چندین مزیت دارد که مهمترین آن تکثیر تعداد زیادی نهال با ژنوتیپ ثابت از یک پایه با ژنوتیپ مشخص در یک دوره زمانی به‌نسبت کوتاه است. ذکر این نکته لازم است که در انتخاب بهترین پایه بر اساس ویژگی‌های اکوفیزیولوژیکی تعیین‌کننده مقاومت به تنش خشکی، ویژگی‌های رویشی ازجمله سهولت در تکثیر و ریشه‌دهی از مهمترین ویژگی‌های این نوع پایه‌ها هستند که باید به‌ویژه در مناطق خشک مورد توجه قرار گیرند. عوامل متعددی بر ریشه‌زایی در تکثیر آزمایشگاهی گونه‌های جنگلی دخیلند که کم و کیف نور ازجمله شدت و کیفیت نور دریافتی در ریزنمونه‌ها و نیز دوره نوردهی در شرایط آزمایشگاهی تأثیر تعیین‌کننده‌ای دارند. در مطالعاتی که Vaez-Livari و Salehi-Soghadi (۲۰۰۶)، در بادام به‌ویژه در تکثیر پایه GF انجام دادند به این نتیجه رسیدند که در

www.SID.ir

Archive of SID

مراحل نهایی ریزازدیادی این پایه که نمونه‌ها باید تحریک به ریشه‌زایی شوند تاریکی اثر مثبتی بر شروع ریشه‌زایی، تعداد ریشه و نیز طول ریشه‌های تولیدی دارد. اگرچه در بسیاری از موارد تیمارهای هورمونی حاصل از اکسین‌هایی مانند IBA، NAA، یا IAA هم سبب القاء ریشه‌زایی می‌شوند (Ainsley *et al.*, 2001) و بهترین این تنظیم‌کننده‌های رشد هم IBA با غلظت ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر قید شده است (Vaez-Livari & Salehi-Soghadi, 2006).

یکی از مهمترین عوامل مؤثر بر تکثیر از طریق ریزازدیادی تنظیم‌کننده‌های رشد درونی درخت یا درختچه مورد نظر است. ضمن اینکه تولید شاخساره و فعال شدن مریستم‌های جانبی در درختان هم به‌وسیله سیتوکینین‌ها کنترل می‌شود (Dobranszki *et al.*, 2010). همینطور BAP موجب تحریک تقسیم سلولی، تکثیر شاخه‌ها و تشکیل جوانه‌های جانبی می‌شود ولی از توسعه ریشه‌ها جلوگیری می‌کند (Sutter 1996). در تکثیر رویشی از طریق ریزازدیادی پایه رویشی GF که به‌عنوان پایه ارقام تجاری در بادام استفاده می‌شود از BA به‌عنوان منبع سیتوکینین با غلظتی برابر ۰/۱ و ۳ میلی‌گرم در لیتر هم استفاده شده است (Kamali *et al.*, 1990; Ahmad *et al.*, 2003). بیشترین تعداد شاخه در تکثیر پایه GF را Ahmad و همکاران (۲۰۰۳) با استفاده از غلظت ۰/۶ میلی‌گرم در لیتر BAP به‌دست آوردند. در ریزازدیادی درختان و درختچه‌ها، القاء ریشه‌زایی در شاخساره‌های تولید شده هم یکی از مراحل حساس است. عوامل مختلفی بر ریشه‌زایی نمونه‌های گیاهی مورد استفاده در ریزازدیادی دخیلند که مهمترین آنها تنظیم کننده‌های رشد درونی و بیرونی، دوره نوری مورد استفاده در اطاق کشت، شدت نور، کیفیت نور، دمای محیط و اثرات متقابل این عوامل با یکدیگر است (Vaez-Livari & Salehi-Soghadi, 2006). گزارش‌های موجود اغلب حکایت از این دارد که القاء ریشه‌زایی در گونه‌های چوبی با استفاده از تیمارهایی از اکسین‌هایی مانند IBA، NAA، یا IAA حاصل شده است (Ainsley *et al.*, 2001). بر اساس تجربه Dobranszki و Silva (۲۰۱۰)، اینگونه تنظیم‌کننده‌های رشد فقط برای تحریک نمونه‌های گیاهی به ریشه‌زایی لازم هستند و بهترین آنها هم IBA با غلظت ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر قید شده است. در سایر گونه‌های بادام هم مطالعاتی توسط Isikalan و همکاران (۲۰۰۸) به‌منظور تکثیر رقمی از بادام خوراکی انجام شد که در آن با استفاده از محیط کشت MS (Murashige, & Skooge, 1962)، غلظت‌های متعددی از BA و کینتین بر روی کشت جنین حاصل از بذر کامل مطالعه شد که نشان داد محیط کشت MS حاوی ۷ گرم در لیتر آگار به‌همراه ۳۰ گرم در لیتر ساکارز، منجر به تولید تعداد مناسبی شاخه قابل استفاده به‌ازای هر جنین کشت‌شده شد. در تکثیر شاخه‌ها در بازکشت‌های بعدی نیز بهترین نتیجه با استفاده از محیط کشت MS و ۱ میلی‌گرم در لیتر BA به‌دست آمد. بهترین محیط ریشه‌زایی نیز محیط 1/2MS به‌همراه ۸ میلی‌گرم در لیتر IAA به‌دست آمد. در ایران هم تجربیاتی وجود دارد، ازجمله اینکه Emam و همکاران (۲۰۱۳)، در ریزازدیادی پایه‌های تلخ و شیرین بادام کوهی و با کشت جوانه و جنین در فصل بهار، محیط کشت DKW (Driver & Kuniyuki, 1984) به‌همراه تنظیم‌کننده‌های رشد BA، TDZ و IBA در غلظت‌های ۰/۰۵، ۰/۵ و ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر را به‌عنوان ترکیب بهینه تنظیم‌کننده رشد در محیط کشت مورد استفاده در کشت جنین معرفی کردند و محیط کشت MS بدون تنظیم‌کننده رشد به‌مدت یک ماه و بعد محیط کشت تغییر یافته MS با IBA در غلظت ۱ میلی‌گرم در لیتر و در شرایط تاریکی را مناسب‌ترین شرایط ریشه‌زایی عنوان کردند.

به دلایل مختلف ازجمله خشکسالی‌های متوالی و تغییر رژیم بارندگی بخش وسیعی از رویشگاه‌های بادام کوهی در کشور دچار ضایعه خشکیدگی شده و باید در تقویت رویشگاه‌های باقی‌مانده و حفظ ذخائر ژنتیکی این گونه چاره‌اندیشی شود. جنگل‌کاری در عرصه‌های مستعد رویش این گونه ازجمله اقداماتی است که می‌تواند مورد توجه قرار گیرد. با این حال در هر اقدامی که منجر به تولید نهال و توسعه جنگل‌کاری با این درختچه است بهتر است از

www.SID.ir

Archive of SID

پایه‌های منتخب و آزمون نتاج شده استفاده شود تا بتوان از بخش بیشتری از ظرفیت‌های این گونه استفاده کرد. انتخاب پایه‌های برتر و تکثیر رویشی آنها برای استقرار در باغ بذر مستلزم دستیابی به روش‌های مؤثر در ریزازدیادی این پایه‌هاست. از طرفی اگر قرار است پایه‌های منتخب از بادام کوهی به‌عنوان پایه در توسعه بادام اهلی استفاده شوند سهولت در ریشه‌زایی هم ازجمله اهداف در تکثیر این گونه است. از این‌رو علاوه بر ژنوتیپ‌ها و محیط کشت‌هایی که در آنها ژنوتیپ‌های منتخب سریعتر و بهتر تولید ریشه می‌کنند، می‌توانند در اولویت انتخاب قرار گیرند. به‌همین دلیل در این پژوهش اثر سطوح دو عامل نور و تنظیم‌کننده رشد در یک محیط کشت ثابت در تکثیر و ریشه‌زایی بادام کوهی مورد مطالعه قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

پایه‌های بالغ از بادام کوهی یا بادامک که از سلامت کامل برخوردار بود در نظر گرفته شد و در زمان مناسب اقدام به جمع‌آوری میوه حاوی جنین نارس شد. از آنجا که پوسته نمدی میوه بادام کوهی نارس حامل آلودگی‌های مختلف است که ممکن است به راحتی توسط روش‌های رایج سترون‌سازی هم برطرف نشوند، ابتدا جنین‌های نارس از پوسته میوه خارج شده و با استفاده از محلول هیپوکلریت سدیم ۲۰ درصد به‌مدت ۵ دقیقه ضد عفونی شده و سه بار با آب‌مقطر سترون شستشو شدند تا آماده کشت در محیط کشت جامد شوند. از محیط کشت DKW (Driver & Kuniyuki, 1984)، با ترکیب تنظیم‌کننده‌های رشد IBA (Indole-3-Butyric Acid)، BA (Benzyladenine) و TDZ (Thidiazuron) با مقادیر به‌ترتیب ۰/۰۱، ۰/۵ و ۰/۰۵ میلی‌گرم در لیتر و ۰/۷ درصد آگار به‌همراه ذغال فعال، برای کاشت و استقرار اولیه جنین‌ها استفاده شد. محیط کشت تهیه شده به‌مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد و فشار یک اتمسفر در داخل اتوکلاو سترون شد و در داخل ویال‌هایی با قطر بیرونی ۳ سانتی‌متر و بلندی ۷ سانتی‌متر توزیع شدند. جنین‌های نارس سترون‌شده ابتدا در تعداد مناسب ویال حاوی محیط کشت سترون کاشته شدند. آنگاه با رشد جنین نارس و تولید شاخساره کافی، شاخساره‌ها در سطوح مختلف فاکتورهای مورد مطالعه (پنج سطح تنظیم کننده رشد در محیط کشت DKW و ۲ سطح روشنایی) در ۴ تکرار توزیع شدند و در دمای ۱±۲۴ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند.

پنج سطح و ترکیب تنظیم‌کننده‌های رشد مورد استفاده در محیط کشت DKW در این بخش از آزمایش عبارت بودند از:

۱ – یک میلی‌گرم در لیتر NAA + ۱ میلی‌گرم در لیتر IBA

۲ – یک میلی‌گرم در لیتر NAA

۳ – یک میلی‌گرم در لیتر IBA

۴ – نیم میلی‌گرم در لیتر IBA

۵ – نیم میلی‌گرم در لیتر NAA

سطوح عامل روشنایی نیز عبارت بودند از:

۱ – تناوب ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی

۲ – دائم در تاریکی به‌مدت ۱۰ روز

بعد از ۶۰ روز از کشت شاخساره‌ها و تولید ریشه کافی در نمونه‌ها ویژگی‌های مورد نظر ازجمله طول شاخساره تولیدی، تعداد برگ، تعداد و طول ریشه اصلی، تعداد و طول ریشه فرعی، ارزیابی و یادداشت‌برداری شدند. داده‌ها توسط نرم‌افزار SAS تجزیه‌وتحلیل شدند و ضمن ارزیابی اثرات اصلی دو عامل روشنایی و سطح تنظیم‌کننده رشد در محیط کشت، اثرات احتمالی متقابل آنها بر روی صفات طول شاخساره، تعداد برگ، تعداد ریشه اصلی، میانگین طول ریشه‌های اصلی، تعداد ریشه فرعی و میانگین طول ریشه‌های فرعی به سانتی‌متر اندازه‌گیری و تجزیه‌وتحلیل شد. میانگین صفات در محیط‌های کشت پنج‌گانه و نیز سطوح دوگانه روشنایی دسته‌بندی شدند. از نرم‌افزار Excel هم برای رسم نمودارها استفاده شد.

www.SID.ir

Archive of SID

نتایج

در رویش جنین نارس با توجه به اینکه از محیط کشت تجربه شده در گذشته استفاده شد، جنین‌های کشت شده به تعداد کافی مستقر شده و شاخساره مورد نیاز را تولید کردند. در مرحله ریشه‌زایی نتایج تجزیه واریانس داده‌های حاصل از کشت ساخساره‌های به‌دست‌آمده از کشت جنین نارس در جدول ۱ ارائه شده است. روشنایی نقش تعیین‌کننده‌ای را در اندازه همه صفات مورد مطالعه در این بخش از تحقیق داشت. همینطور محیط کشت در سطح معنی‌داری بر همه صفات مورد مطالعه اثر گذاشت (جدول ۱). ولی اثر متقابل دو عامل روشنایی و محیط کشت بر طول شاخساره، طول ریشه‌های اصلی، تعداد و طول ریشه‌های فرعی معنی‌دار شد. لازم به‌ذکر است با توجه به اینکه برخی از واحدهای آزمایشی ازجمله تیمارهای مربوط به محیط کشت در محیط تاریکی این آزمایش از بین رفت، درجه آزادی اثر متقابل در جدول تجزیه واریانس با یک طرح متعادل متفاوت بود و اصلاح شد.

جدول ۱- میانگین مربعات حاصل از تجزیه واریانس صفات مورد مطالعه از ویژگی‌های ریشه‌زایی شاخساره‌های حاصل از کشت جنین نارس بادام کوهی بر روی محیط کشت DKW با پنج ترکیب مختلف تنظیم‌کننده‌های رشد در شرایط روشنایی و تاریکی

منابع تغییر	DF	طول شاخساره	تعداد برگ	تعداد ریشه اصلی	طول ریشه اصلی	تعداد ریشه فرعی	طول ریشه فرعی
روشنایی	۱	۲۳/۳**	۴۳۶/۴**	۱۰/۴**	۱۴/۱**	۲۰/۵**	۱۹/۸**
محیط کشت	۴	۱۷/۰**	۱۰۶/۱**	۲/۳*	۵/۹**	۱۱/۰**	۴/۰**
روشنایی * محیط کشت	۳	۷/۳**	۲۵/۹ ns	۱/۰ ns	۵/۴**	۸/۴*	۱/۶ **
خطای آزمایشی	۱۴	۰/۸۳	۲۰/۸۲	۰/۶۹	۰/۸۸	۲/۶۲	۰/۲۲

** و *: اختلاف معنی‌دار در سطح یک و پنج درصد، ns: بدون اختلاف معنی‌دار

بر اساس دسته‌بندی میانگین سطوح عامل روشنایی، همه صفات مورد ارزیابی، روشنایی و تاریکی را در دو دسته متفاوت قرار دادند. به‌عبارت دیگر دامنه تغییرات میانگین طول شاخساره ایجاد شده در دوره انجام این آزمایش در سطوح روشنایی بین ۲/۸ تا ۳/۷ متغیر بود که در دو دسته مختلف قرار گرفتند. همینطور از نظر تعداد برگ نیز دامنه میانگین این صفت در دو سطح روشنایی بین ۸/۶ تا ۱۴/۷ عدد متغیر بود. از نظر تعداد ریشه اصلی در حضور و عدم حضور روشنایی در مراحل اولیه کشت شاخساره‌ها بین ۲/۶ تا ۳/۹ متغیر بود که حکایت از تولید ریشه بیشتر در روشنایی داشت. همینطور از نظر طول ریشه اصلی هم میانگین طول ریشه‌ها در شرایط روشنایی ۴ سانتی‌متر بود که در دسته اول قرار گرفت و دسته دوم میانگین طول ریشه در شرایط تاریکی با ۲/۲ سانتی‌متر طول قرار داشت. طول ریشه‌های فرعی هم اثر زیادی از حضور یا عدم حضور نور گرفته بود. به‌نحوی که با حضور نور میانگین طول ریشه‌های فرعی در همه سطوح محیط کشت ۲/۴ سانتی‌متر ولی در شرایط تاریکی ۰/۴ سانتی‌متر بود (جدول ۲).

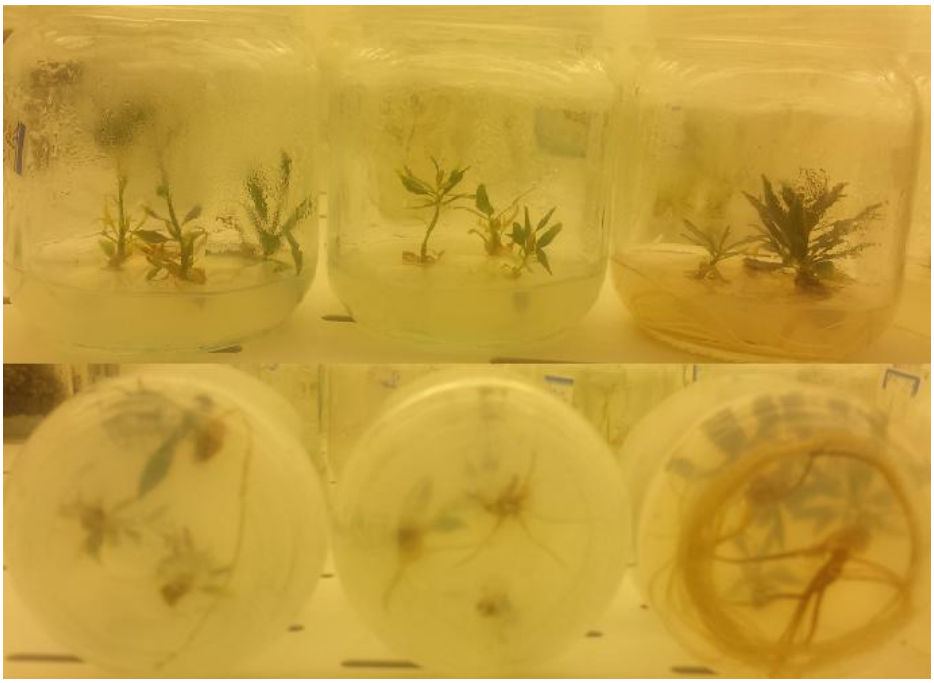
جدول ۲- نتایج حاصل از دسته‌بندی میانگین سطوح دوگانه روشنایی در آزمون ریشه‌زایی شاخساره‌های حاصل از جنین نارس بادام کوهی

روشنایی	طول شاخساره (cm)	تعداد برگ	تعداد ریشه اصلی	طول ریشه اصلی (cm)	تعداد ریشه فرعی	طول ریشه فرعی (cm)
روشنایی	۳/۷ a	۱۴/۷ a	۳/۹ a	۴/۰ a	۳/۵ a	۲/۴ a
تاریکی	۲/۸ b	۸/۶ b	۲/۶ b	۲/۲ b	۱/۸ b	۰/۴ b

حروف الفبای متفاوت در ستونها حکایت از اختلاف معنی‌دار بین میانگین‌ها دارد.

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۱- تفاوت در ریشه‌زایی در بادام کوهی در شرایط حضور نور (سمت راست تصویر) و عدم حضور نور (سمت چپ)

دسته‌بندی سطوح محیط کشت بر اساس صفات مورد مطالعه در جدول ۳ ارائه شده است. محیط‌های کشت مورد استفاده از نظر همه صفات در چند دسته متفاوت قرار گرفتند. به‌طوری‌که طول ساخساره دامنه تغییرات بین ۱/۲ تا ۵/۶ سانتی‌متر قرار داشت و در چهار دسته همپوشان قرار گرفت. از نظر تعداد برگ هم تغییرات زیادی بین سطوح مختلف محیط کشت مشاهده شد، به‌نحوی‌که میانگین‌ها بین ۸ تا ۱۷/۵ عدد متغیر بودند ولی در دو دسته مختلف قرار گرفتند. بر اساس تعداد ریشه اصلی نیز میانگین‌ها بین حداقل ۲/۵ تا ۴ عدد متغیر بودند. به‌عبارت دیگر ۵ محیط مورد استفاده در دو دسته قرار گرفتند که برخی از سطوح محیط کشت دارای همپوشانی بودند. تنوع در طول ریشه اصلی بیشتر بود (شکل ۱)، به‌نحوی‌که میانگین طول ریشه‌ها در سطوح مختلف محیط کشت بین حداقل ۰/۸ تا حداکثر ۵/۲ سانتی‌متر متغیر بود (جدول ۳). تغییرات در تعداد ریشه‌های فرعی هم بین حداقل صفر تا حداکثر ۵ عدد ثبت شد و میانگین‌های این صفت در دو دسته مختلف و متمایز قرار گرفتند. طول ریشه‌های فرعی نیز بین صفر تا ۳/۲ سانتی‌متر تغییر کرد و بر اساس دسته‌بندی دانکن میانگین‌های این صفت در محیط‌های کشت مختلف در چهار دسته مختلف ولی همپوشان قرار گرفتند.

اثرات متقابل بین دو عامل مورد مطالعه، روشنایی و سطوح تنظیم‌کننده رشد در محیط کشت، بر روی صفاتی که در تجزیه واریانس معنی‌دار شدند در شکل ۲ ارائه شده است. بر اساس این نتایج اگرچه اثر متقابل نور و محیط کشت در صفت طول ریشه اصلی در سطح سوم محیط کشت (DKW + ۱ میلی‌گرم در لیتر IBA) بیشترین مقدار را داشت (۶ سانتی‌متر) ولی در سطح چهارم محیط کشت (DKW + ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر IBA) این صفت در محیط تاریکی به‌صورت غیر معنی‌داری از محیط روشنایی بیشتر شد (۳/۷ سانتی‌متر، شکل ۲الف). این اثر متقابل در صفت طول شاخساره هم معنی‌دار شد ولی در همه سطوح محیط کشت طول شاخساره در روشنایی بیشتر از تاریکی بود و این صفت در سطح دوم محیط کشت (DKW + ۱ میلی‌گرم در لیتر NAA) بیشترین مقدار را داشت (۷ سانتی‌متر، شکل ۲ب). از نظر تعداد و طول ریشه‌های فرعی نیز بیشترین مقدار این دو صفت در سطح سوم محیط کشت (DKW + ۱

www.SID.ir

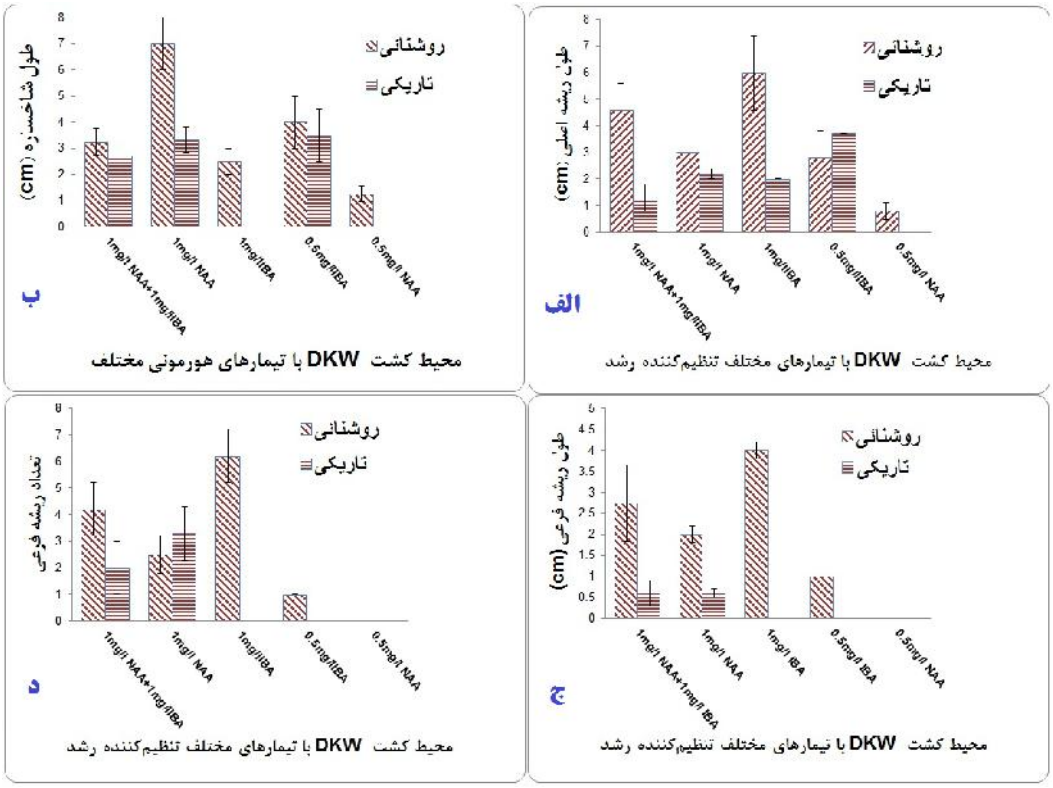
Archive of SID

میلی‌گرم در لیتر IBA) به‌دست آمد (به‌ترتیب ۶/۲ عدد و ۴ سانتی‌متر، شکل ۲ج و ۲د) ولی در هر دو صفت در سطوح ۱ میلی‌گرم در لیتر IBA، ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر IBA و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA به‌طور کلی ریشه فرعی تولید نشد.

جدول ۳- نتایج حاصل از دسته‌بندی میانگین سطوح پنج‌گانه محیط کشت مورد استفاده در آزمون ریشه‌زایی شاخساره‌های حاصل از جنین نارس بادام کوهی

محیط کشت	طول شاخساره (cm)		تعداد برگ		تعداد ریشه اصلی		طول ریشه اصلی (cm)		تعداد ریشه فرعی		طول ریشه فرعی (cm)	
DKW + 1mg/l NAA+1mg/l IBA	۳/۰	bc	۱۱/۷	ab	۴/۰	a	۳/۲	b	۳/۳	a	۱/۸	b
DKW + 1mg/l NAA	۵/۶	a	۱۴/۰	ab	۳/۴	ab	۲/۵	b	۳/۰	a	۱/۲	bc
DKW + 1mg/l IBA	۲/۰	cd	۹/۰	b	۲/۸	ab	۵/۲	a	۵/۰	a	۳/۲	a
DKW + 0.5mg/l IBA	۳/۸	b	۱۷/۵	a	۲/۵	b	۳/۲	b	۰/۵	b	۰/۵	cd
DKW + 0.5mg/l NAA	۱/۲	d	۸/۰	b	۴/۰	a	۰/۸	c	۰/۰	b	۰/۰	d

حروف الفبای متفاوت در ستون‌ها حکایت از اختلاف معنی‌دار بین میانگین‌ها دارد.



شکل ۲- اثرات متقابل سطوح روشنایی و تنظیم‌کننده‌های رشد بر روی صفات مورد مطالعه در تکثیر بادام کوهی از طریق جنین نارس

www.SID.ir

Archive of SID

بحث

اندام‌های مختلف بادام کوهی به‌دلیل چندساله بودن و قرارداشتن در طبیعت و همچنین داشتن فلس‌های متعدد در جوانه‌های رویشی و زایشی و نیز پرزهای پوششی بر روی میوه، از ظرفیت بالایی در جذب آلودگی‌های قارچی و میکربی برخوردارند. از این‌رو در سترون‌کردن بافت‌ها و نمونه‌های مورد استفاده در ریزازدیادی و کشت جنین باید دقت لازم را مبذول داشت. به‌نحوی که ضمن اینکه به بافت‌های مورد نظر آسیبی نرسد آلودگی‌های موجود نیز مرتفع گردد. برداشتن پوسته نمدی میوه و استفاده از محلول هیپوکلریت سدیم ۲۰ درصد (با ۱٪ کلر فعال) به‌مدت ۵ دقیقه و سه بار شستشو با آب‌مقطر سترون برای ضد عفونی، روش مناسبی در سترون‌کردن نمونه‌های مورد استفاده در این تحقیق ارزیابی شد و صدمات ناچیزی به بافت‌های زنده جنین‌های مورد استفاده وارد کرد.

استفاده از ریزازدیادی در تکثیر رویشی گونه‌های جنگلی از زمانی شدت گرفت که محققان اراده کردند تا از تعدادی معدود از ژنوتیپ‌های مناسب از یک گونه جنگلی تعداد زیادی نهال تولید کنند تا هم ژنوتیپ مطلوب مورد نظر را تثبیت کرده باشند و هم اهدافی مانند تشکیل باغ بذر با استفاده از ژنوتیپ‌های منتخب حاصل از آزمون نتاج را محقق کرده باشند. عوامل متعددی در توفیق در ریزازدیادی مؤثر هستند که مهمترین آن را تنظیم‌کننده‌های رشد درونی گیاه ذکرکرده‌اند که به‌شدت تحت تأثیر عوامل بیرونی مانند نور و دمای محیط هستند (Hess & Carman, 1998; Carnes & Wright, 1988; Suzuki & Kerbauy, 2006; Suzuki *et al.*, 2004). اساسا نور و تنظیم‌کننده‌های رشد درونی در گیاهان نقش مهمی را در رشد و نمو (Symons & Reid, 2003) و تقسیم سلولی در مریستم انتهایی (Von Arnim & Deng, 1996) گیاهان ایفا می‌کنند. نور نقش تعیین‌کننده‌ای در تکثیر از طریق شاخساره‌های حاصل از کشت جنین داشت، به‌طوری‌که از نظر همه صفات مورد مطالعه میانگین صفات در روشنایی در سطح معنی‌داری بیشتر از میانگین صفات در تاریکی بود. اگرچه در برخی از پژوهش‌های گذشته (Vaez-Livari & Salehi-Soghadi, 2006) قرار گرفتن نمونه‌ها در تاریکی به‌عنوان عامل تحریک‌کننده ریشه‌زایی در گونه‌هایی از بادام ذکر شد ولی تجربه حاصل از این پژوهش بر روی این گونه ثابت کرد که در ریزازدیادی بادام کوهی نیازی به تاریکی به‌عنوان عامل تحریک ریشه‌زایی نیست. با این حال با توجه به معنی‌دار شدن اثر متقابل بین دو عامل مورد مطالعه نور و تنظیم‌کننده رشد، می‌توان انتظار داشت که در برخی از محیط‌های کشت و سطوحی از تنظیم‌کننده رشدی که در این پژوهش به‌کار گرفته نشده‌اند در شرایط تاریکی هم پاسخ مناسبی در تکثیر آزمایشگاهی این گونه به‌دست آورد.

در هر فصلی از سال سطح تنظیم‌کننده‌های رشد درونی گیاهان متفاوت است و تجربه سایر پژوهشگران هم ثابت کرده است، نمونه‌هایی که در فصل‌های متفاوت از درختان جنگلی گرفته می‌شود واکنش متفاوتی به ریزازدیادی نشان می‌دهند (Sulusoglu, 2012). در این پژوهش که نمونه‌ها در فصل رویش و در زمان توسعه جنین تلقیح شده گرفته شدند امکان نمونه‌برداری در زمان‌های مختلف منتفی بود. به‌عبارتی سطح هورمون‌های درونی در نمونه‌های مورد مطالعه ثابت بود. از این‌رو تغییر در نوع و سطح هورمون‌های مورد استفاده در محیط کشت آثار معنی‌داری در نتیجه ریزازدیادی از طریق استفاده از شاخساره‌های حاصل از کشت جنین نارس داشت. به‌عبارت دیگر سطوح مختلف تنظیم‌کننده‌های رشد به‌کار رفته در محیط کشت اثرات متنوعی بر صفات گذاشتند. به‌طوری‌که حضور تنظیم‌کننده رشد IBA در محیط‌های کشت به‌طور عمده سبب افزایش تعداد و طول ریشه‌های اصلی و فرعی شد ولی حضور ۱ میلی‌گرم در لیتر از NAA در افزایش طول شاخساره‌ها و تعداد برگ اثر بیشتری داشت. سایر پژوهشگران ازجمله Chalupa (۱۹۸۷) نیز آثار مشابهی از کاربرد تنظیم‌کننده‌های رشد را از خانواده اکسین‌ها بر روی ریشه‌زایی گونه‌های مختلف جنگلی ارزیابی کرده‌اند. در

www.SID.ir

Archive of SID

ضمن حضور توام دو تنظیم‌کننده رشد مورد استفاده سبب کاهش طول ریشه اصلی و فرعی و نیز تعداد ریشه فرعی نسبت به استفاده از ۱ میلی‌گرم در لیتر IBA به تنهایی شد. اثر متقابل عوامل نور و محیط کشت بر طول شاخساره، طول ریشه اصلی، تعداد و طول ریشه فرعی اثر معنی‌داری گذاشت. به‌عبارت دیگر با وجود اثرات متقابل محیط کشت و روشنایی، بیشترین طول شاخساره در حضور روشنایی و ۱ میلی‌گرم در لیتر از NAA به‌دست آمد (شکل ۲ب). ولی بیشترین طول ریشه اصلی در حضور روشنایی و ۱ میلی‌گرم IBA حاصل شد (شکل ۲الف). بیشترین تعداد و طول ریشه فرعی هم در روشنایی و استفاده از ۱ میلی‌گرم در لیتر IBA حاصل شد (شکل ۲ج و ۲د). البته استفاده از تنظیم‌کننده رشد IBA سال‌هاست که توسط محققان در ریشه‌دار کردن گونه‌های درختی و چوبی که به‌سختی ریشه‌دار می‌شوند استفاده می‌شود (Rathore *et al.*, 2007). لازم به‌ذکر است که به‌دلیل وجود اثرات متقابل بین دو عامل مورد مطالعه، در سطح دوم تنظیم‌کننده رشد (۱ میلی‌گرم NAA در محیط کشت) تعداد ریشه‌های فرعی در نمونه‌های قرار گرفته در تاریکی به‌صورت غیر معنی‌داری بیشتر شد (شکل ۲د) که به‌دلیل معنی‌دار نبودن این اثر می‌تواند ناشی از خطاهای متنوع آزمایشی محسوب شود. در ضمن در تکثیر آزمایشگاهی بادام اهلی، Isikalan و همکاران (۲۰۰۸)، بهترین نتیجه را با استفاده از محیط کشت MS و ۱ میلی‌گرم در لیتر BA به‌دست آوردند. به‌طور کلی بر اساس نتایج حاصل از این مطالعات وجود تناوب نور و تاریکی و استفاده از IBA در تکثیر رویشی ژنوتیپ‌های مختلف بادام کوهی بهترین نتیجه را به‌دست داد.

سپاسگزاری

از مسئولان محترم مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع کشور که امکان انجام این تحقیق را فراهم کردند بسیار سپاسگزاریم. همین‌طور از رئیس و همکاران محترم گروه زیست‌فناوری (همان مؤسسه) که در انجام این تحقیق از هیچ کمکی دریغ نکردند به‌ویژه از سرکار خانم مهندس میرجانی و سرکار خانم مهرآبادی نهایت تشکر را داریم.

منابع

- Abella, S.R. and Convington, W.W., 2006. Vegetation environment relationships and ecological species groups of an Arizona *Pinus ponderosa* landscape. Plant Ecology, 185: 225-268.
- Ahmad, T., Rahman, H.U., Ahmad, C.H. and Laghari, M.H., 2003. Effect of culture media and growth regulators on micropropagation of peach rootstock GF 677. Pakistanian Journal of Botany, 35: 331–338.
- Ainsley, P.J., Collins, G.G. and Sedgley, M., 2001. *In vitro* rooting of almond (*Prunus dulcis* Mill.). *In Vitro* Cell Dev. Biol. Plant., 37: 778–785.
- Alvaninejad, S. and Marvi Mohajer, M.R., 2004. The study of effective factors on distribution of wild almond (*Amygdalus scoparia*) in two various areas of Fars province. Proceeding of the fourth international Iran & Russia conference, Agriculture and Natural Resources, September, 8-10, Shahrekord, Iran, p: 697-702.
- Badano, E.I., Carvieres, L.A., Molinga-Montenegro, M.A. and Quiroz, C.L., 2005. Slope aspect influences plant association patterns in the Mediterranean natural of central Chile, Journal of Arid Environments, 62: 93-108.
- Carnes, M.G. and Wright, M.S., 1988. Endogenous hormone levels of immature corn kernels of A188, Missouri-17 and Dekalb XL-12. Plant Science, 57: 195-203.
- Chalupa, V., 1987. Effect of benzyl amino purin and thydiazuron on *in vitro* shoot proliferation of *Tilia cordata* Mill., *Sorbus aucuparia* L. and *Robinia pseudo acacia* L. Biologia Plantarum, 29: 425-429.
- Dobranszki, J. and Teixeira da Silva, J.A., 2010. Micropropagation of apple – A review. Biotechnology Advances, 28: 462-488.
- Driver, J.A. and Kuniyuki, A.H., 1984. *In vitro* propagation of paradox walnut *Juglans hindsii* x *Juglans regia* rootstock. HortScience, 19: 507-509.
- Emam, M., Ghamari Zare, A., Asadicorom, F. and Looki Anaraki, K., 2013. Micropropagation of *Amygdalus scoparia* L. by bud and embryo culture. Iranian Journal of Rangelands and Forests Plant Breeding and Genetic, 21: 77-86.
- Gharaghani, A. and Eshghi, S., 2015. *Prunus scoparia*, a potentially multi-purpose wild almond species in Iran. Acta Horticulture, 1074, 67-72.

www.SID.ir

Archive of SID

- Murashige, T. and Skooge, F., 1962. A revised medium for rapid growth and bio- assays with tobacco tissue culture. Physiologia Plantarum, 15: 473-597
- Rathore, J.S., Rathore, M.S., Singh, M., Singh, R. and Pyshekhawat, N.S., 2007. Micropropagation of mature tree of *Citrus limon*. Indian Journal of Biotechnology, 6: 239-244
- Sulusoglu, M., 2012. Development of a rooted cutting propagation method for selected *Arbutus unedo* L. types and seasonal variation in rooting capacity. Journal of Agricultural Science, 4: 216-225.
- Sutter, E. G., 1996. General laboratory requirements, media and sterilization methods. In: Trigiano R.N. and Gray, D.J. (ed.s) Plant Tissue Culture Concepts and Laboratory Exercises, CRC Press, New York, pp 11-25.
- Suzuki, R.M. and Kerbauy, G.B., 2006. Effects of light and ethylene on endogenous hormones and development of *Catasetum fimbriatum* (Orchidaceae). Brazilian Journal of Plant Physiology, 18: 359-365.
- Suzuki, R.M., Kerbauy, G.B. and Zaffari, G.R., 2004. Endogenous hormonal levels and growth of dark-incubated shoots of *Catasetum fimbriatum* (Morren) Lindl. Journal of Plant Physiology, 161: 929-935.
- Symons, G.M. and Reid, J.B., 2003. Hormone levels and response during de-etiolation in pea. Planta, 216: 422-431.
- Vaez-Livari, B. and Salehi-Soghadi, Z., 2006. *In vitro* rooting of hybrid GF677 (*Prunus dulcis* × *Prunus persica*). Acta Horticulturae, 726: 171-178.
- Von Arnim, A. and Deng, X.W., 1996. Light control of seedling development. Annual Review of Plant Physiology Plant Molecular Biology, 47:215-243.
- Gorttapeh, A.H., Hassani, M.H. and Ranji, H., 2006. Recognition and ecological investigation of almond species (*Amygdalus* spp.) in West Azarbaijan province. Acta Horticulture, 726: 253–256.
- Hess, J.R. and Carman, J.G., 1998. Embryogenic competence of immature wheat embryos: Genotype, donor plant environment, and endogenous hormone levels. Crop Science, 38: 249-253.
- Isikalan, C., Adyaman Akbas, F., Naml, S., Tilkat, E. and Basaran, D., 2008. *In vitro* micropropagation of almond (*Amygdalus communis* L. cv. Nonpareil). African Journal of Biotechnology, 7: 1875-1880.
- Jafari, M., Zare Chahouki, M.A., Azarnivand, H., Baghestani Meibodi, N. and Zahedi Amiri, Gh., 2002. Relationships between Poshtkouh rangeland vegetative of Yazd province and soil physical and chemical charateristics using multivariate analysis methods. Iran Journal of Natural Resources, 55: 419-434.
- Kamali, K., Majidi, E. and Zarghami, R., 2001. Determination of the most suitable culture medium and growth conditions for micropropagation of GF677 (Hybrid of almond x peach) rootstocks. Journal of Seed and Seedling, 17: 234-243.
- Kooch, Y., Jalilvand, H., Bahmanyar, M.A. and Pormajidian, M.R., 2008. The use of principal component analysis in studying physical, chemical and biological soil properties in southern Caspian forests (North of Iran). Pakistan Journal of Biological Science, 11: 366-372.
- Mahdavi, A., Heydari, M., Bastam, R. and Abdollah, H., 2010. Vegetation in relation to some edaphic and physiologic characteristics of site (case study: Zagros forest ecosystem, Kabirkuh protected area, Ilam. Iranian Journal of Forest and Poplar Research, 17: 581-593.

www.SID.ir

Archive of SID

Light and growth regulator effects on propagation of wild almond (*Amygdalus scoparia*) by *in vitro* embryo culture

H. Mirzaie-Nodoushan[*1], M. Emam[2], S. Ezazi[3] and S. Kalatehjari[4]

1*– Corresponding author, Prof., Forests and Rangelands Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Tehran, I.R. Iran. Email: nodoushan2003@yahoo.com
2- Assist. Prof., Forests and Rangelands Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Tehran, I.R. Iran.
3– M.Sc. Islamic Azad University., Tehran, I.R. Iran
4– Assist. Prof., Islamic Azad University, Tehran, I.R. Iran.

Received: 13.08.2016 Accepted: 30.12.2016

Abstract

Wild almond (*Amygdalus scoparia* Spach), is one of valuable almond species in Iran with medicinal and nutritional values as well as soil conservation and other environmental characteristics, which is also utilized as a rootstock in cultivation of domestic almond cultivars. After *in vitro* culturing of embryos of the species and enough shoot growth on DKW medium, with growth regulators such as IBA, BA and TDZ in 0.01, 0.5 and 0.05 mg.l^{-1} respectively, effects of light and growth regulators on rooting ability of the embryo driven shoots were investigated, using a factorial statistical model, based on a completely randomized design. Light as the first factor with 2 levels (a: 16 hours light and 8 hours darkness, b: permanent darkness for ten days) and growth regulators of DKW culturing medium as the second factor in 5 levels (1: NAA+IBA each for 1 mg.l^{-1}, 2: NAA for 1 mg.l^{-1} , 3: IBA for 1 mg.l^{-1} , 4: IBA for 0.5 mg.l^{-1}, 5: NAA for 0.5 1 mg.l^{-1}) were used. Based on the results of analysis of variance, the two factors of light and growth regulator had significant effects on all of the studied characteristics. Light caused better growth of embryo grown shoots, compared to darkness. Various levels of growth regulators had also different effects on shoot and root production. Using a combination of IBA and NAA, produced the highest number of main roots. But 1mg. l^{-1} IBA caused the longest main root as well as higher number and length of lateral roots. Interaction effects between light and growth regulators significantly affected shoot length, main root length, number and length of lateral roots. So that combination of the two growth regulators produced the most number of lateral roots, whereas, utilizing 1 mg.l^{-1} NAA in darkness resulted in the most number of lateral roots. Results of analysis of variance indicated significant effects of light and culturing media factors on all of the studied characteristics. So that light caused remarkable increments on all of the studied characteristics. Various levels of applied growth regulators caused different effects on the studied characters. Meanwhile, IBA growth regulator caused significant increment of number and length of main and lateral roots. But NAA growth regulator showed significant effects on shoot length and number of leave. Interaction between light and media factors had significant effects on shoot length, main root length, number and length of lateral roots. Alternate light and darkness as well as IBA growth regulator are necessary for asexual propagation of wild almond through micropropagation.

Keywords: *Amygdalus scoparia*, asexual propagation, growth regulator, micropropagation, wild almond.

www.SID.ir