تأثیر نیترات نقره بر تکثیر درون شیشه‌ای ارقام انار ملس یزدی و رباب

بابک ولی‌زاده کاجی[1]* و احمدرضا عباسی‌فر[2]

۱*- **نویسنده مسئول:** استادیار، گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه اراک (valizadehkaji@yahoo.com)
۲- استادیار، گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه اراک

تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۰۶/۱۶ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۵/۰۴/۰۹

چکیده

روش تکثیر سنتی انار با استفاده از قلمه خشبی و نرم باعث تولید گیاهان عاری از بیماری نمی‌شود و وابسته به فصل نیز می‌باشد. بنابراین توسعه یک تکنیک درون شیشه‌ای کارآمد برای تکثیر انار اهمیت زیادی دارد. از طرف دیگر، تکثیر درون شیشه‌ای انار یک مرحله ضروری در موفقیت باززایی لاین‌های تراریخته بوده و کارایی پروتوکل تراریختگی را تعیین می‌کند. بنابراین، این تحقیق با هدف توسعه یک روش کارآمد درون شیشه‌ای برای تکثیر ارقام انار ملس یزدی و رباب به‌عنوان دو رقم برتر ایرانی انجام شد. برای مرحله پرآوری، محیط کشت دابلیوپی‌ام حاوی غلظت‌های مختلف بنزیل آدنین (۲/۲، ٤/٤، ۸/۸ و ۱۷/٦ میکرومولار) همراه با ۰/٥٤ میکرومولار نفتالین استیک اسید استفاده گردید. برای تعیین اثرات نیترات نقره روی تکثیر درون شیشه‌ای، ریزنمونه‌ها به محیط دابلیوپی‌ام حاوی ۸/۸ میکرومولار بنزیل آدنین و ۰/٥٤ میکرومولار نفتالین استیک اسید که سطوح مختلفی از نیترات نقره (۳٥-٥ میکرومولار) به آن اضافه شده بود، منتقل شدند. برای هر دو رقم، بهترین غلظت بنزیل آدنین ۸/۸ میکرومولار بود که منجر به بیشترین طول شاخساره (۳/۹۱ سانتی‌متر)، تعداد برگ (۱۰/٦۰) و تعداد گره (٤/۳۰) در ریزنمونه‌ها شد. اضافه کردن ۲٥ میکرومولار نیترات نقره به این محیط کشت به طور معنی‌داری تعداد شاخساره (٤/۹۰)، طول شاخساره (٤/۲٤ سانتی‌متر)، تعداد برگ (۱۲/۳۰) و تعداد گره (٦/۱۰) را افزایش داد. محیط نصف غلظت دابلیوپی‌ام حاوی ٥/٤ میکرومولار نفتالین استیک اسید موثرترین محیط برای ریشه‌زایی شاخساره‌ها بود. گیاهان ریشه‌دار شده به‌طور موفقیت‌آمیزی پس از سازگاری تدریجی به خاک منتقل گردیدند. گیاهان حاصل از نظر مورفولوژیکی شبیه به هم بوده و صفات رویشی مشابه با گیاهان مادری نشان دادند. نتایج این تحقیق می‌تواند به‌عنوان یک مرحله برای اصلاح انار با استفاده از روش‌های مهندسی ژنتیک استفاده شود.

کلید واژه‌ها: انار، تکثیر درون شیشه‌ای، هورمون، نیترات نقره.

مقدمه

انار یکی از درختچه‌های بومی ایران و یکی از قدیمی‌ترین میوه‌های خوراکی است. این درختچه به‌منظور استفاده در صنایع غذایی، دارویی و زینتی کشت و کار می‌گردد. با توجه به شرایط مناسب تولید انار در ایران و امکان گسترش آن در مناطق خشک و نیمه‌خشک و همچنین سازگاری این درختچه با شرایط آب و هوایی کشور، کشت و کار آن در اکثر مناطق این سرزمین متداول است. به دلیل رشد تعداد مصرف‌کنندگان انار در خارج از کشور، این محصول از لحاظ صادراتی ارزش فوق‌العاده‌ای یافته است. ایران با تولید سالیانه حدود ۷۰۰۰۰۰ تن، بزرگترین تولیدکننده و صادرکننده انار در جهان است (Valizadeh Kaji *et al.*, 2013a). وجود ذخایر ژنتیکی غنی از ارقام مختلف انار در ایران که به بیش از ۷۶۰ رقم و ژنوتیپ می‌رسد، از دیگر توانمندی‌های کشور در این زمینه محسوب می‌شود (Moslemi *et al.*, 2010).

تکثیر سنتی انار از طریق قلمه چوب نرم و قلمه چوب

سخت می‌باشد. این روش وابسته به فصل بوده و نمی‌تواند منجر به تولید گیاهان عاری از بیماری شود. به‌علاوه، برای استقرار گیاهان تکثیر شده از طریق قلمه به یک‌سال زمان نیاز است و تعداد زیادی از قلمه‌ها در طی تکثیر از بین می‌روند (Kanwar *et al.*, 2010). بنابراین، توسعه یک روش کارآمد درون شیشه‌ای برای تکثیر این درخت میوه ضروری می‌باشد. هم‌چنین، ریزازدیادی انار یک مرحله ضروری در موفقیت باززایی لاین‌های تراریخته است و کارایی پروتوکل تراریختگی را مشخص می‌کند. تکثیر درون شیشه‌ای برخی از ارقام انار ایرانی قبلاً توسط Valizadeh Kaji و همکاران (b و a ۲۰۱۳) گزارش شده است. این محققین نشان دادند که انار واقعاً یک گونه با باززایی سخت است. یکی از مهم‌ترین دلایل سختی باززایی درون شیشه‌ای انار، تولید اتیلن توسط بافت‌ها و عوامل منجمدکننده محیط کشت همانند آگار و تجمع آن درون ظروف کشت می‌باشد (Naik and Chand, 2011). هم‌چنین کاربرد خارجی اکسین‌ها و سیتوکنین‌ها می‌تواند تولید اتیلن در کشت بافت را تحریک کند (Mensuari-Sodi *et al.*, 1992). اثرات بازدارندگی اتیلن بر تکثیر درون شیشه‌ای چندین گونه گیاهی گزارش شده است و مشخص شده اضافه کردن نیترات نقره به محیط کشت می‌تواند به‌طور قابل توجهی باززایی و فراوانی شاخساره به‌دست آمده در ریزنمونه را افزایش دهد (Kanwar *et al.*, 2010؛ Sridevi *et al.*, 2010؛ Petri *et al.*, 2005). بنابراین، هدف از این تحقیق بررسی اثر غلظت‌های مختلف نیترات نقره، به‌عنوان یک بازدارنده عمل اتیلن، بر روی تکثیر درون شیشه‌ای ارقام انار ملس یزدی و رباب به‌عنوان مهم‌ترین ارقام انار کشور در محیط دابلیوپی‌ام[1] حاوی غلظت‌های مختلف بنزیل آدنین می‌باشد (Lloyd and McCown, 1980). به علاوه، نتایج این تحقیق به‌عنوان یک بخش ضروری جهت تراریختی انار حائز اهمیت است. این اولین گزارش در زمینه اثر نیترات نقره بر تکثیر درون شیشه‌ای ارقام انار ایرانی می‌باشد.

مواد و روش‌ها

تهیه ریزنمونه

ریزنمونه‌ها از گیاهچه‌های کشت بافتی یا گیاهان دو ساله ارقام ملس یزدی و رباب که به صورت گلدان‌هایی در گلخانه پرورش یافتند، جمع آوری گردید (Valizadeh Kaji *et al.*, 2013a). قطعات گره‌ای ساقه (۱/۵-۰/۵ سانتی‌متر) از گیاهان دو ساله رشد داده شده در گلخانه جدا شدند. به دنبال حذف برگ‌ها، ریزنمونه‌ها با آب شیر برای ۳۰ دقیقه شسته شدند، سپس به مدت ۱۰ دقیقه در محلول هیپوکلرید سدیم ۰/۱ درصد حاوی ۳-۲ قطره مایع ظرفشویی ضدعفونی شده و سه بار در آب مقطر استریل شستشو گردیدند. ریزنمونه‌های ضدعفونی شده (دو ریزنمونه در هر شیشه) به‌طور عمودی در محیط مورد نظر کاشته شدند. ریزنمونه‌های تهیه شده از گیاهچه‌های کشت بافتی نیز بدون ضدعفونی و به‌طور مستقیم مورد کاشت قرار گرفتند.

محیط‌های کشت و شرایط کاشت

در این تحقیق، محیط کشت گیاهان چوبی (دابلیوپی‌ام) استفاده شد. ساکارز به میزان ۳۰ گرم در لیتر اضافه گردید و سپس پی‌اچ محیط‌های تهیه شده قبل از اضافه کردن آگار (۰/۶ درصد) با استفاده از سود ۰/۱ نرمال به ۰/۱ ± ۵/۶ تنظیم شد. برای مرحله‌ی پرآوری، بنزیل آدنین در غلظت‌های صفر، ۲/۲، ۴/۴، ۸/۸ و ۱۷/۶ میکرومولار در ترکیب با ۰/۵۴ میکرومولار نفتالین استیک‌اسید به کار برده شد. سپس محیط‌های کشت در ظروف شیشه‌ای ۲۰۰ میلی‌لیتری توزیع شدند، حجم محیط کشت به کار رفته برای هر ظرف حدود ۲۵ میلی‌لیتر بود. ظروف حاوی محیط کشت در دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد برای ۱۵ دقیقه اتوکلاو شدند و سپس چند ساعتی در هوای اتاق قرار گرفتند تا به حالت جامد درآیند. ریزنمونه‌ها به‌طور عمودی و به صورتی که چند

1- WPM

میلی‌متر از ته آن‌ها در محیط‌کشت وارد شود، کاشته شدند. ریزنمونه‌های کاشته‌شده به شرایط فتوپریود هشت ساعت تاریکی و ۱۶ ساعت نور سفید (۴۰ میکرومول بر متر مربع بر ثانیه) انتقال یافتند. هر تیمار بنزیل آدنین در پنج تکرار (ظرف شیشه‌ای) و هر ظرف حاوی دو تا سه ریزنمونه بود و این آزمایش دو بار تکرار گردید. بعد از حدود یک ماه، شاخساره‌های به وجود آمده از ریزنمونه‌ها فقط برای رشد بیشتر (نه اندازه‌گیری صفات) به محیط کشت تازه و تحت فتوپریود قبلاً ذکر شده انتقال داده شدند. پس از تعیین بهترین ترکیب هورمونی برای هر یک از دو رقم، برای تعیین اثر نیترات نقره، روی تکثیر درون شیشه‌ای، ریزنمونه‌ها در بهترین محیط باززایی حاوی غلظت‌های صفر، ۵، ۱۰، ۱۵، ۲۰، ۲۵، ۳۰ و ۳۵ میکرومولار نیترات نقره کشت داده شدند.

ریشه‌دار کردن درون شیشه‌ای

شاخساره‌های نمو یافته با طول ۴-۲ سانتی‌متر در مرحله پرآوری، بریده شدند و در محیط نصف غلظت دابلیوپی‌ام حاوی ۱۵ گرم در لیتر ساکارز و ۳ گرم در لیتر آگار مورد کشت قرار گرفتند. برای ریشه‌زایی، ایندول بوتیریک اسید (آی‌بی‌ای[1]) در غلظت صفر، ۲/۵، ۴/۹ و ۹/۸ میکرومولار و نفتالین استیک اسید (ان‌ای‌ای[2]) در غلظت صفر، ۲/۷، ۵/۴ و ۱۰/۸ میکرومولار استفاده شد. بعد از ۱۰ روز، شاخساره‌های ریشه دار شده به یک محیط نصف غلظت بدون اکسین برای طویل شدن بیشتر ریشه‌ها انتقال یافتند. هر تیمار اکسین در پنج تکرار (ظرف شیشه‌ای) و هر ظرف حاوی یک ریزنمونه بود. بعد از یک ماه از کشت، تعداد و طول ریشه‌ها در هر شاخساره ریشه‌دار شده ارزیابی گردید.

سازگاری تدریجی گیاهچه‌های باززایی شده

گیاهچه‌های به خوبی ریشه دار شده از محیط کشت جدا شدند و ریشه‌های آن‌ها برای حذف آگار به آرامی با آب شیر شسته شدند و به گلدان‌های پلاستیکی کوچک (با قطر ۴ سانتی‌متر) حاوی مخلوط کوکوپیت و پرلایت (۱:۱) استریل منتقل گردیدند. گلدان‌ها برای حفظ رطوبت نسبی با کیسه‌های پلاستیکی پوشیده شدند و در اتاقک رشد با دمای ۱ ± ۲۵ درجه سانتی‌گراد و نور مصنوعی (۴۰ میکرومول بر متر مربع بر ثانیه) برای ۴-۳ هفته نگهداری گردیدند. در طی این مدت گیاهچه‌ها با محلول غذایی یک پنجم غلظت دابلیوپی‌ام تغذیه و آبیاری می‌شدند. برای مقاوم ساختن گیاهان، کیسه‌های پلاستیکی به مدت چند دقیقه در وسط روز باز شدند و با افزایش این دوره تدریجاً در شرایط طبیعی قرار گرفتند. گیاهچه‌ها سپس به گلدان‌های بزرگتر (با قطر ۷ سانتی‌متر) حاوی خاک و کمپوست به نسبت ۱:۱ منتقل و تحت شرایط سایه برای دو هفته دیگر نگهداری شدند و سرانجام به شرایط مواجهه با نور مستقیم خورشید انتقال یافتند. بررسی تعداد گیاهچه‌های زنده مانده حدود ۴۰ روز بعد از انتقال صورت گرفت.

آنالیز داده‌ها و اندازه‌گیری‌ها

برای مرحله‌ی پرآوری، آزمایش به‌صورت فاکتوریل و در قالب طرح کاملاً تصادفی با دو رقم و پنج غلظت بنزیل آدنین صورت گرفت. برای بررسی اثر نیترات نقره، آزمایش به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با هفت غلظت از این ماده و دو رقم انجام گردید. برای ریشه‌زایی، آزمایش به‌صورت فاکتوریل و در قالب یک طرح کاملاً تصادفی با دو رقم و هشت غلظت اکسین (آی‌بی‌ای و ان‌ای‌ای) صورت گرفت. داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار سس[3] آنالیز شدند. مقایسات میانگین با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح ۰/۰۵ مورد بررسی قرار گرفتند. صفات مورد بررسی شامل تعداد شاخساره (با طول بیش از ۰/۵ سانتی‌متر)، طول شاخساره‌ها، تعداد گره، تعداد برگ، تعداد ریشه و طول ریشه‌ها بودند که حدود یک ماه بعد از کشت اندازه‌گیری شدند.

1- IBA
2- NAA
3- SAS

نتایج و بحث

اثر رقم

ارقام هیچ‌گونه تفاوت معنی‌داری از نظر تعداد گره، طول شاخساره و تعداد برگ نشان ندادند، ولی تعداد شاخساره به‌طور معنی‌داری به‌وسیله رقم متأثر شد (جدول ۱) و رقم ملس یزدی شاخساره‌های بیشتری در گیاهچه در مقایسه با رقم رباب تولید کرد (جدول ۲).

جدول ۱- تجزیه واریانس غلظت‌های مختلف بنزیل آدنین همراه با ۰/۵٤ میکرومولار روی تکثیر درون شیشه‌ای ارقام انار ملس یزدی و رباب

Table 1. Variance analysis of different concentrations of BA along with 0.54 µM NAA on in vitro propagation of the pomegranate cultivars, 'Malas Yazdi' and 'Rabab'

منبع پراکنش Source of distribution	درجه آزادی Freedom degree	میانگین مربعات Mean squares			
		تعداد شاخساره Number of shoots	طول شاخساره (سانتی‌متر) Length of shoot (cm)	تعداد گره Number of node	تعداد برگ Number of leaves
تیمار Treat	9	8.45**	8.98**	13.96**	71.52**
رقم Cultivar	1	2.00*	0.05ns	0.50ns	0.72ns
بنزیل آدنین BA	4	18.37**	20.20**	31.15**	160.72**
رقم × بنزیل آدنین Cultivar × BA	4	0.15ns	0.03 ns	0.15ns	0.20ns
اشتباه آزمایشی Error	40	0.19	0.04	0.17	0.26

*، ** و ns به‌ترتیب معنی‌دار در سطح کمتر از ۵ درصد، ۰/۰۱ درصد و غیرمعنی‌دار.

*, ** and ns: Significant (P<0.05), high significant (P<0.01) and no significant, respectively.

جدول ۲- اثر غلظت‌های مختلف بنزیل آدنین همراه با ۰/۵٤ میکرومولار روی تکثیر درون شیشه‌ای ارقام انار ملس یزدی و رباب

Table 2. Effect of different concentrations of BA along with 0.54 µM NAA on in vitro propagation of the pomegranate cultivars, 'Malas Yazdi' and 'Rabab'

اثرات Effects		تعداد شاخساره Number of shoots	طول شاخساره (سانتی‌متر) Length of shoot (cm)	تعداد گره Number of node	تعداد برگ Number of leaves
رقم Cultivar	ملس یزدی Malas Yazdi	2.28a	2.08	1.73	6.72
	رباب Rabab	1.88b	2.09	1.58	6.72
بنزیل آدنین (میکرومولار) BA (µM)	(0) BA1	0.00d	0.00e	0.00d	0.00d
	(2.2) BA2	1.50c	1.96c	2.50c	7.00c
	(4.4) BA3	2.60b	2.68b	4.10a	8.60b
	(8.8) BA4	2.90b	3.91a	4.30a	10.60a
	(17.6) BA5	3.40a	1.90d	3.60b	7.50c

مقادیر نشان‌دهنده میانگین می‌باشد. میانگین‌های دارای حروف مشابه در یک ستون در سطح خطای کمتر از ۰/۰۵ آزمون چند دامنه‌ای دانکن دارای تفاوت معنی‌داری با همدیگر نیستند.

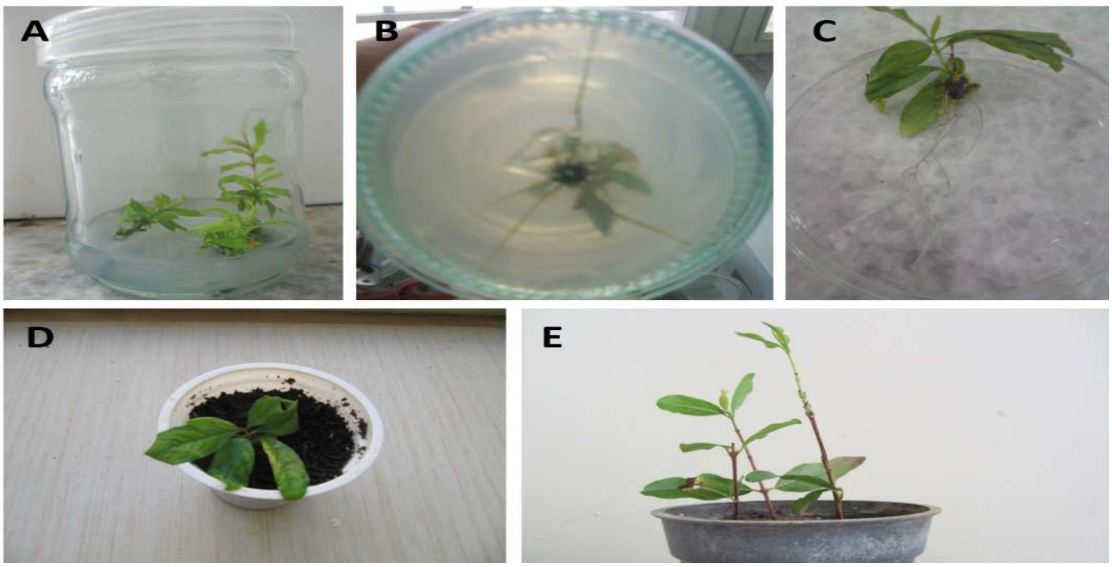
Values represent the mean. Mean values followed by the similar letters within a column are not significantly different from each other at $P \leq 0.05$ (Duncan's multiple range test).

اثر تنظیم‌کننده‌های رشد

برای هر دو رقم ملس یزدی و رباب، بنزیل آدنین اثر بسیار معنی‌داری بر تمامی صفات مورد بررسی داشت (جدول ۱). جوانه‌های روی ریزنمونه‌ها روی محیط دارای بنزیل آدنین یا بدون بنزیل آدنین در مدت ۲-۱ هفته شروع به باز شدن و رشد کردند؛ ولی، قادر به طویل شدن روی محیط فاقد بنزیل آدنین نبودند به‌طوری‌که طویل شدن شاخساره تنها روی محیط دارای بنزیل آدنین صورت گرفت (شکل ۱). چندین شاخساره از ریزنمونه‌های کاشته‌شده روی محیط حاوی غلظت‌های مختلف بنزیل آدنین (۲/۲، ۴/۴، ۸/۸ و ۱۷/۶ میکرومولار) همراه با ۰/۵۴ میکرومولار نفتالین استیک اسید رشد یافت. نتایج مربوط به مقایسه میانگین نشان داد که محیط کشت دارای ۸/۸ میکرومولار بنزیل آدنین و ۰/۵۴ میکرومولار نفتالین استیک اسید برترین تیمار بوده و منجر به تولید گیاهچه‌های قوی‌تر با بیشترین تعداد برگ (۱۰/۶۰)، تعداد گره (۴/۳۰) و طول شاخساره (۳/۹۱ سانتی‌متر) شد (جدول ۲ و شکل ۱). بعد از تیمار ۸/۸ میکرومولار بنزیل آدنین، به‌ترتیب غلظت‌های ۴/۴، ۱۷/۶ و ۲/۲ میکرومولار تأثیر بیشتری بر پرآوری نشان دادند (جدول ۲). در غلظت‌های بالای بنزیل آدنین (۱۷/۶ میکرومولار) شیشه‌ای شدن ریزنمونه‌ها مشاهده شد.

اثر نیترات نقره روی پرآوری درون شیشه‌ای

داده‌های ارائه شده در جدول (۳) نشان می‌دهد که کاربرد نیترات نقره در بهترین محیط پرآوری حاصل از آزمایش قبل (۸/۸ میکرومولار بنزیل آدنین و ۰/۵۴ میکرومولار نفتالین استیک اسید) بر تکثیر درون شیشه‌ای موثر واقع شده است. برای هر دو رقم ملس یزدی و رباب، استفاده از نیترات نقره تمامی پارامترهای رشد اندازه‌گیری شده در این مطالعه را به‌طور معنی‌داری افزایش داد. غلظت ۲۵ میکرومولار نیترات نقره بهترین اثر را بر تکثیر درون شیشه‌ای داشت، ولی در غلظت‌های بالاتر از این مقدار، شاخص‌های رشد به‌طور معنی‌داری کاهش یافتند (جدول ۴).



شکل ۱- A: نمو شاخساره از قطعات گره‌ای انار رقم ملس یزدی ۲۵ روز بعد از کشت روی محیط دابلیوپی‌ام حاوی ۸/۸ میکرومولار بنزیل آدنین و ۰/٥٤ میکرومولار نفتالین استیک اسید، B: نمو ریشه در شاخساره کاشته‌شده روی محیط نصف غلظت دابلیوپی‌ام دارای ٥/٤ میکرومولار نفتالین استیک اسید، C: یک گیاهچه خوب ریشه‌دار شده آماده برای سازگاری تدریجی، D: سازگاری تدریجی گیاهچه‌ها در مخلوط کوکوپیت و پرلایت، E: یک گیاه سالم و خوب مقاوم‌شده.

Fig. 1. A: shoot development from nodal segments of pomegranate cultivar 'Malas Yazdi' after 25 days of culture on WPM medium containing 8.8 µM BA + 0.54 µM NAA, B: root development in shoot cultured on half strength WPM medium containing 5.4 µM NAA, C: a well-rooted plantlet ready for acclimatization, D: Gradual acclimation of plantlet in cocopeat-perlite mixture, E: a healthy and well-hardened plant.

جدول ۳- تجزیه واریانس غلظت‌های مختلف نیترات نقره روی تکثیر درون شیشه‌ای ارقام انار ملس یزدی و رباب

Table 3. Variance analysis of different concentrations of AgNO3 on in vitro propagation of the pomegranate cultivars, 'Malas Yazdi' and 'Rabab'

منبع پراکنش Source of distribution	درجه آزادی Freedom degree	میانگین مربعات Mean squares			
		تعداد شاخساره Number of shoots	طول شاخساره (سانتی‌متر) Length of shoot (cm)	تعداد گره Number of node	تعداد برگ Number of leaves
تیمار Treat	15	4.33**	1.56**	5.27**	7.70**
رقم Cultivar	1	0.01ns	0.07ns	0.31ns	0.05ns
نیترات نقره $AgNO_3$	7	9.07**	3.32**	11.11**	16.31**
رقم × نیترات نقره Cultivar × $AgNO_3$	7	0.20ns	0.02ns	0.14ns	0.19ns
اشتباه آزمایشی Error	64	0.24	0.04	0.35	0.42

** و ns به‌ترتیب معنی‌دار در سطح کمتر از ۰/۰۱ درصد و غیرمعنی‌دار.

** and ns: high significant (P<0.01) and no significant, respectively.

جدول ٤- اثر غلظت‌های مختلف نیترات نقره روی تکثیر درون شیشه‌ای ارقام انار ملس یزدی و رباب

Table 4. Effects of different concentrations of AgNO3 on in vitro propagation of the pomegranate cultivars, 'Malas Yazdi' and 'Rabab'

اثرات Effects		تعداد شاخساره Number of shoots	طول شاخساره (سانتی‌متر) Length of shoot (cm)	تعداد گره Number of node	تعداد برگ Number of leaves
رقم Cultivar	ملس یزدی Malas Yazdi	3.47	3.72	4.72	10.77
	رباب Rabab	3.45	3.70	4.60	10.82
نیترات نقره (میکرومولار) AgNO3 (µM)	(0) Ag1	2.90d	3.91b	4.30d	10.60d
	(5) Ag2	3.50c	3.93b	4.80cd	11.10cd
	(10) Ag3	3.70c	3.95b	5.00bc	11.30bc
	(15) Ag4	3.90bc	4.00b	5.20bc	11.50bc
	(20) Ag5	4.30b	4.03b	5.50b	11.80ab
	(25) Ag6	4.90a	4.24a	6.10a	12.30a
	(30) Ag7	2.45e	3.10c	3.50e	9.10e
	(35) Ag8	2.05e	2.55d	2.90f	8.70e

مقادیر نشان‌دهنده میانگین می‌باشد. میانگین‌های دارای حروف مشابه در یک ستون در سطح خطای کمتر از ۰/۰۵ آزمون چند دامنه‌ای دانکن دارای تفاوت معنی‌داری با همدیگر نیستند.

Values represent the mean. Mean values followed by the similar letters within a column are not significantly different from each other at $P \leq 0.05$ (Duncan's multiple range test).

ریشه‌زایی درون شیشه‌ای و سازگاری تدریجی گیاهچه‌ها

داده‌های ارائه شده در جدول (۵) نشان می‌دهد که غلظت‌های مختلف اکسین تأثیر بسیار معنی‌داری بر میزان ریشه‌زایی داشته است. بین ارقام از نظر میزان ریشه‌زایی در محیط حاوی غلظت‌های مختلف اکسین

تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد (جدول ۵). محیط دابلیوپی‌ام فاقد نفتالین استیک اسید یا ایندول بوتیریک اسید قادر به تحریک ریشه‌زایی نبود و ریشه‌زایی تنها در محیط دارای اکسین مشاهده شد (جدول ۶). نفتالین استیک اسید نسبت به ایندول بوتیریک اسید اثر مشخص‌تری روی ریشه‌زایی شاخساره‌ها داشت. در بین تیمارهای آزمایش‌شده، محیط نصف غلظت دابلیوپی‌ام حاوی ۵/۴ میکرومولار نفتالین استیک اسید بیشترین اثر را در ریشه‌زایی شاخساره‌ها نشان داد (شکل ۱ و جدول ۶). بعد از تیمار ۵/۴ میکرومولار نفتالین استیک اسید، به‌ترتیب غلظت‌های ۴/۹ میکرومولار ایندول بوتیریک اسید، ۱۰/۸ میکرومولار نفتالین استیک اسید و ۹/۸ میکرومولار ایندول بوتیریک اسید تأثیر بیشتری بر ریشه‌زایی نشان دادند (جدول ۶).

سازگاری تدریجی گیاهچه‌های ریشه‌دار شده به‌طور موفقیت‌آمیزی صورت گرفت و گیاهان در خاک مستقر شدند. درصد گیاهچه‌های زنده مانده حدود ۸۰ درصد بود. گیاهچه‌های مستقر شده هیچ‌گونه اختلافی با گیاهان مادری از نظر شکل ظاهری نشان ندادند. در انار، انواع مختلف ریزنمونه همانند قطعات گره‌ای و نوک شاخساره، جنین‌های زیگوتی از بذرهای بالغ، گلبرگ و قطعات برگ، کوتیلدون و هیپوکوتیل جهت تکثیر درون شیشه‌ای استفاده شده است ولی، قطعات گره‌ای و نوک شاخساره در مقایسه با سایر ریزنمونه‌ها واکنش بهتری به کشت بافت نشان دادند (Jaidka and Mehra, 1986؛ Kanwar *et al.*, 2010؛ Murkute *et al.*, 2004؛ Nataraja and Neelambika, 1996).

نتایج به‌دست آمده از این تحقیق نشان می‌دهد قطعات گره‌ای و نوک شاخساره ریزنمونه‌های مناسبی برای تکثیر درون شیشه‌ای انار هستند. استفاده از تنظیم‌کننده‌های رشد در کشت بافت انار اهمیت اساسی دارد. مطالعات زیادی به منظور شناسایی ترکیب مطلوبی از تنظیم‌کننده‌های رشد برای باززایی گیاه انار صورت گرفته است (Kanwar *et al.*, 2010؛ Terakami *et al.*, 2007).

جدول ۵- تجزیه واریانس غلظت‌های مختلف ایندول بوتیریک اسید (آی‌بی‌ای) و نفتالین استیک اسید (ان‌ای‌ای) روی ریشه‌زایی شاخساره‌های ارقام انار ملس یزدی و رباب

Table 5. Variance analysis of different concentrations of IBA and NAA on rooting of shoots of the pomegranate cultivars, 'Malas Yazdi' and 'Rabab'

منبع پراکنش Source of distribution	درجه آزادی Freedom degree	میانگین مربعات Mean squares	
		تعداد ریشه Number of roots	طول ریشه (سانتی‌متر) Length of root (cm)
تیمار Treat	15	21.84^{**}	28.21^{**}
رقم Cultivar	1	0.05^{ns}	0.05^{ns}
اکسین Auxin	7	46.77^{**}	60.40^{**}
رقم × اکسین Cultivar × Auxin	7	0.02^{ns}	0.04^{ns}
اشتباه آزمایشی Error	64	0.23	0.04

** و ns به‌ترتیب معنی‌دار در سطح کمتر از ۰/۰۱ درصد و غیرمعنی‌دار.

** and ns: high significant (P<0.01) and no significant, respectively.

جدول ٦- اثر مقادیر مختلف ایندول بوتیریک اسید (آی‌بی‌ای) و نفتالین استیک اسید (ان‌ای‌ای) روی ریشه‌زایی شاخساره‌های ارقام انار ملس یزدی و رباب

Table 6. Effect of different concentrations of IBA and NAA on rooting of shoots of the pomegranate cultivars, 'Malas Yazdi' and 'Rabab'

طول ریشه (سانتی‌متر) Length of root (cm)	تعداد ریشه Number of roots	اثرات Effects	
3.49	2.67	ملس یزدی Malas Yazdi	رقم Cultivar
3.44	2.72	رباب Rabab	
0.00^{g}	0.00^{d}	(0) NAA	اکسین Auxin
3.53^{e}	2.00^{c}	(2.7) NAA	
6.69^{a}	5.70^{a}	(5.4) NAA	
4.36^{c}	3.40^{b}	(10.8) NAA	
0.00^{g}	0.00^{d}	(0) IBA	
3.23^{f}	1.90^{c}	(2.5) IBA	
6.08^{b}	5.40^{a}	(4.9) IBA	
3.88^{d}	3.20^{b}	(9.8) IBA	

مقادیر نشان‌دهنده میانگین می‌باشد. میانگین‌های دارای حروف مشابه در یک ستون در سطح خطای کمتر از ۰/۰۵ آزمون چند دامنه‌ای دانکن دارای تفاوت معنی‌داری با همدیگر نیستند.

Values represent the mean. Mean values followed by the similar letters within a column are not significantly different from each other at $P \leq 0.05$ (Duncan's multiple range test).

بنزیل آدنین، بنزیل آمینو پورین، بنزیل آدنین، زآتین ریبوزاید و تیدیازورون معمول‌ترین تنظیم‌کننده‌های رشد هستند که به تنهایی یا همراه با غلظت کمی از اکسین برای پرآوری استفاده شده‌اند (Naik and Chand, 2011). استفاده از اکسین همراه با سیتوکنین در محیط کشت برای پرآوری شاخساره در برخی از ارقام مثل نانا و ارقام ایرانی ضروری است، درحالی‌که برخی از ارقام دیگر مثل گانش جهت پرآوری نیازی به اکسین ندارند (Naik and Chand, 2011؛ Valizadeh Kaji *et al.*, 2013a). در برخی از گیاهان، موقعی که مراکز بیوسنتز اکسین در ریزنمونه‌ها فعال هستند، نیازی به آن برای پرآوری ریزنمونه‌ها نیست (Ibanez *et al.*, 2005). در ارقام ملس یزدی و رباب که نیاز به اکسین دارد ممکن است این مراکز غیرفعال باشند. نتایج این تحقیق و دیگر محققین نشان می‌دهد که انار یک گونه با باززایی سخت است. یکی از مهم‌ترین دلایل مشکل باززایی درون شیشه‌ای انار، تولید اتیلن توسط بافت‌ها و تجمع آن درون ظروف کشت می‌باشد. بر همکنش اتیلن با تنظیم‌کننده‌های رشد دیگر بسیار پیچیده بوده و هنوز به‌طور کامل مشخص نشده است. تصور می‌شود سنتز و فعالیت اکسین‌ها، سیتوکنین‌ها و اتیلن به شدت به هم مرتبط باشد. کاربرد خارجی اکسین‌ها و سیتوکنین‌ها، هم‌چنین عوامل منجمدکننده محیط مثل آگار در محیط کشت می‌تواند تولید اتیلن در کشت بافت را تحریک کند (Mensuari-Sodi *et al.*, 1992). اثرات بازدارنده اتیلن در تکثیر درون شیشه‌ای چندین گونه گیاهی گزارش شده است (Adkins *et al.*, 1993؛ Chi *et al.*, 1991؛ Pua and Chi, 1993). این موضوع در تکثیر درون شیشه‌ای گیاهان خردل تراریخته که آنتی سنس ای‌سی‌سی[1] اکسیداز را بیان می‌کنند، تأیید شد و نشان داده شد که ارتباط معکوسی بین باززایی شاخساره

1- ACC

و بیوسنتز اتیلن وجود دارد (Pua and Lee, 1995). به‌علاوه، افزایش در میزان رشد درون شیشه‌ای انار با استفاده از بازدارنده‌های اتیلن نیز ثابت شده است (Naik and Chand, 2003؛ Kanwar *et al.*, 2010).

Naik and Chand (۲۰۰۳) نقش دو بازدارنده اتیلن، نیترات نقره و آمینو اتوکسی وینیل گلایسین، در افزایش پتانسیل باززایی ریزنمونه‌ها را بررسی کردند و نشان دادند که اضافه کردن نیترات نقره (۲۰ میکرومولار) یا آمینو اتوکسی وینیل گلایسین (۱۰ میکرومولار) به محیط باززایی، به‌طور قابل توجهی باززایی و فراوانی شاخساره به‌دست آمده در ریزنمونه را افزایش می‌دهد. به‌علاوه، اضافه کردن ترکیب آزادکننده اتیلن ۲-کلرواتیلن فسفونیک اسید به محیط کشت، این فرضیه را بیشتر تأیید می‌کند که اتیلن یک فاکتور کلیدی در تنظیم تمایز سلولی است و نشان می‌دهد که باززایی شاخساره از کوتیلدون‌های انار به شدت به کاهش تولید یا عمل اتیلن مرتبط است (Kanwar *et al.*, 2010). افزایش در میزان رشد درون شیشه‌ای برخی گیاهان دیگر مثل لیمو ، قهوه و زردآلو با استفاده از نیترات نقره نیز ثابت شده است (Kotsias and Roussos, 2001؛ Petri *et al.*, 2005؛ Sridevi *et al.*, 2010).

در این تحقیق نیز محیط حاوی ۲۵ میکرومولار نیترات نقره اثر قابل توجهی روی پرآوری درون شیشه‌ای انار داشت. ریشه‌زایی شاخساره‌های به وجود آمده از کشت‌های درون شیشه‌ای یک پیش شرط اساسی برای استقرار آن‌ها در خاک است. نفتالین استیک اسید و ایندول بوتیریک اسید معمول‌ترین اکسین‌های استفاده شده برای القاء ریشه‌زایی در شاخساره‌های باززایی شده درون شیشه‌ای انار هستند. ریشه‌زایی ریزنمونه‌ها به شدت تحت تأثیر نوع اکسین قرار می‌گیرد (Heloir *et al.*, 1997). غلظت‌های بالای نفتالین استیک اسید ممکن است سبب ایجاد حالت سمیت در ریزنمونه‌ها شود (De Klerk *et al.*, 1997). نتایج مشابهی در این مطالعه در موقع استفاده از غلظت‌های بالای هر دو اکسین مشاهده شد. در انار بیشتر از محیط کشت‌های نصف غلظت ام‌اس[1] و دابلیوپی‌ام برای ریشه‌زایی استفاده شده است (Naik and Chand, 2003).

در مطالعه حاضر، محیط کشت نصف غلظت دابلیوپی‌ام به اندازه کافی برای القاء ریشه‌زایی موثر بود. غلظت‌های نسبتاً کم نمک در محیط کشت نصف غلظت، ریشه‌زایی شاخساره‌ها را در چندین گونه گیاهی افزایش داده است (Rai *et al.*, 2009). در برخی از ارقام، انتقال شاخساره‌های ریشه‌دار شده به محیط فاقد اکسین برای طویل شدن ریشه‌ها ضروری است (Naik and Chand, 2011). در این تحقیق نیز ریشه‌ها بدون انتقال به محیط فاقد اکسین قادر به طویل شدن نبودند. حدود ۴۰ روز بعد از مقاوم سازی گیاهان، هیچ گونه مشکلی از نظر بقاء مشاهده نشد. در انار، مواد بستر مختلف نظیر کوکوپیت و پرلایت جهت سازگاری تدریجی گیاهچه‌های ریشه‌دار شده استفاده گردید (Valizadeh Kaji *et al.*, 2013a, b).

نتیجه‌گیری

نتایج به دست آمده از این تحقیق یک پروتوکل درون شیشه‌ای موفق برای تکثیر ارقام انار ملس یزدی و رباب ارائه می نماید که می‌تواند برای تکثیر این دو رقم و تراریخته کردن ژنتیکی آن‌ها مؤثر باشد.

سپاسگزاری

مقاله حاضر حاصل طرح پژوهشی مصوب ۲۶/۶/۹۳ به شماره ۹۳/۵۸۷۱ در شورای پژوهشی دانشگاه اراک می‌باشد که بدین وسیله از معاونت پژوهشی و فناوری دانشگاه اراک به خاطر تأمین مالی طرح مذکور تشکر و قدرانی می‌شود.

1- MS

References

1. Adkins, S.W., Kunanuvatchaidach, R., Gray, S.J., and Adkins, A.L. 1993. Effect ofethylene and culture environment on rice callus proliferation. Journal of Experimental Botany, 269: 1829-1835.

2. Chi, G.L., Pua, E.C., and Goh, C.J. 1991. Role of ethylene on de novo shoot regeneration from cotyledonary explants of *Brassica campestris* ssp. Pekinesis (Lour) Olsson in vitro. Plant Physiology, 96: 178-183.

3. De Klerk, G.J., Brugge, J.T., and Marinova, S. 1997. Effectiveness of indoleacetic acid, indolebutyric acid and naphthalene acetic acid during adventitious root formation in vitro in *Malus* 'Jork 9'. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 49: 39-44.

4. Heloir, M.C., Fournioux, J.C., Oziol, L., and Bessis, R. 1997. An improved procedure for the propagation in vitro of grapevine *Vitis vinifera* (cv. Pinot noir) using axillary bud cuttings. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 49: 95-108.

5. Ibanez, A., Valero, M., and Morte, A. 2005. Establishment and in vitro clonal propagation of the Spanish autochthonous table grapevine cultivar Napoleon-an improved system where proliferating cultures alternate with rooting ones. Anales de Biologia, 27: 211-220.

6. Jaidka, K. and Mehra, P.N. 1986. Morphogenesis in *Punica granatum* (Pomegranate). Canadian Journal of Botany, 64: 1644-1653.

7. Kanwar, K., Joseph, J., and Deepika, R. 2010. Comparison of in vitro regeneration pathways in *Punica granatum* L. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 100: 199-207.

8. Kotsias, D. and Roussos, P.A. 2001. An investigation on the effect of different plant growth regulating compounds in in vitro shoot tip and node culture of lemon seedlings. Scientia Horticulturae, 89: 115-128.

9. Lloyd, G.B. and McCown, B.H. 1980. Commercially feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia* by use of shoot tip culture. International Plant Propagators Society, 30: 421-427.

10. Mensuari-Sodi, A., Panizza, M., and Tognoni, E. 1992. Quantitation of ethylene losses in different container-seal systems and comparison of biotic and abiotic contributions to ethylene accumulation in cultured tissues. Physiologia Plantarum, 84: 472-476.

11. Moslemi, M., Zahravi, M., and Bakhshi Khanikic, G.H. 2010. Genetic diversity and

population genetic structure of pomegranate (*Punica granatum* L.) in Iran using AFLP markers. Scientia Horticulturae, 126: 441-447.

12. Murkute, A.A., Patil, S., and Singh, SK. 2004. In vitro regeneration in pomegranate cv. Ganesh from mature trees. Indian Journal of Horticulture, 61: 206-208.

13. Naik, S.K. and Chand, P.K. 2003. Silver nitrate and aminoethoxyvinylglycine promote in vitro adventitious shoot regeneration of pomegranate (*Punica granatum* L.). Journal of Plant Physiology, 160: 423-430.

14. Naik, S.K. and Chand, P.K. 2011. Tissue culture-mediated biotechnological intervention in pomegranate: a review. Plant Cell Reports, 30: 707-721.

15. Nataraja, K. and Neelambika, G.K. 1996. Somatic embryogenesis and plantlet from petal cultures of pomegranate, *Punica granatum* L. Indian Journal of Experimental Biology, 34: 719-721.

16. Petri, C., Alburquerque, N., Perez-Tornero, O., and Burgos, L. 2005. Auxin pulses and a synergistic interaction between polyamines and ethylene inhibitors improve adventitious regeneration from apricot leaves and Agrobacterium-mediated transformation of leaf tissues. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 82: 105-111.

17. Pua, E.C. and Chi, G.L. 1993. De novo shoot morphogenesis and plant growth of mustard (*Brassica juncea*) in vitro in relation to ethylene. Physiologia Plantarum, 88: 467-474.

18. Pua, E.C. and Lee J.E.E. 1995. Enhanced de novo shoot morphogenesis in vitro by expression of antisense 1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase gene in transgenic mustard plants. Planta, 196: 69-76.

19. Rai, M.K., Jaiswal, V.S., and Jaiswal, U. 2009. Shoot multiplication and plant regeneration of guava *Psidium guajava* L. from nodal explants of in vitro raised plantlets. Journal of Fruit and Ornamental Plant Research, 17: 29-38.

20. Sridevi, V., Giridhar, P., Simmi, P.S., and Ravishankar, G.A. 2010. Direct shoot organogenesis on hypocotyls explants with collar region from in vitro seedlings of *Coffea canephora* Pierre ex. Frohner cv. CxR and Agrobacterium tumefaciens-mediated transformation. Plant Cell Tissue, and Organ Culture, 101: 339-347.

21. Terakami, S., Matsuta, N., Yamamoto, T., Sugaya, S., Gemma, H., and Soejima, J. 2007. Agrobacterium-mediated transformation of the dwarf pomegranate (*Punica granatum* L. var. nana). Plant Cell Reports, 26: 1243-1251.

22. Valizadeh Kaji, B., Ershadi, A., and Tohidfar, M. 2013 b. In vitro propagation of pomegranate (*Punica granatum* l.) Cv. 'Males Yazdi'. Albanian Journal of Agricultural Sciences, 12(1): 1-5.

23. Valizadeh Kaji, B., Ershadi, A., and Tohidfar, M. 2013a. In vitro propagation of two Iranian commercial pomegranates (*Punica granatum* L.) cvs. Malas Saveh and Yusef Khani. Physiology and Molecular Biology of Plants, 19(4): 597-603.