DOI: http://dx.doi.org/10.22092/ijrfpbgr.2013.3095

دو فصلنامهٔ علمی-پژوهشی تحقیقات ژنتیک و اصلاح گیاهان مرتعی و جنگلی ایران
جلد ۲۱، شمارهٔ ۱، صفحهٔ ۸۶-۷۷ (۱۳۹۲)

ریزازدیادی بادام کوهی (*Amygdalus scoparia*) از طریق کشت جوانه و جنین

میترا امام*[۱]، عباس قمری‌زارع[۲]، فرشته اسدی‌کرم[۳] و کیوان لوکی انارکی[٤]

۱*- نویسنده مسئول مکاتبات، مربی پژوهش، مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع کشور، پست‌الکترونیک: memam@rifr-ac.ir
۲- استادیار، مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع کشور
۳- کارشناس‌ارشد، مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع کشور
٤- کارشناس، مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی اصفهان

تاریخ دریافت: ۱۳۹۰/۰۷/۲۳ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۲/۰٤/۰٤

چکیده

بادام کوهی (*Amygdalus scoparia L.*) یکی از گونه‌های مهم خانواده Rosaceae است. این گونه بومی ایران و نسبت به آب و هوای گرم و خشک مقاوم بوده و مقاوم بودن آن در برابر کم آبی، باعث شده که این گیاه در طرح‌های توسعه فضای سبز و تولید فراورده‌های بومی بسیار مفید باشد. بذر بادام‌کوهی تلخ است، اما بذر تنها یک پایه از این گونه در کوه چاه‌گربه شهرستان نائین، شیرین گزارش شده است. اهمیت ویژه این پایه با بذر شیرین باعث شده است که تکثیر غیرجنسی آن از طریق ریزازدیادی جهت حفظ منبع ژنتیکی موجود، مورد توجه قرار گیرد. در این تحقیق، تکثیر دو پایه شیرین و تلخ از گونه مزبور به روش ریزازدیادی از طریق کشت جوانه و جنین انجام شد. تیمار سترون‌سازی عبارت از شستشو و برس‌کشی جوانه‌ها با مایع ظرفشویی و محلول اتانل ۷۰ درصد و بعد غوطه‌وری نمونه‌ها در محلول کلرید جیوه ۰/۱ درصد به مدت۲ دقیقه و در فصل بهار برای هر دو ژنوتیپ بود. روش مناسب سترون‌سازی بذر عبارت از قرارگیری بذرها در زیر آب جاری و بعد غوطه‌وری نمونه‌ها در محلول کلرید جیوه ۰/۱ درصد در زمان ۱ دقیقه برای ژنوتیپ شیرین و ۳ دقیقه برای ژنوتیپ تلخ بود. محیط کشت DKW با هورمون BA، TDZ و IBA در غلظت‌های به‌ترتیب ۰/۵، ۰/۰۵ و ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر در مرحله شاخه‌زایی و تکثیر به‌عنوان ترکیب بهینه انتخاب شد. ریشه‌زایی شاخه‌ها در محیط MS بدون هورمون برای یک ماه و سپس در محیط تغییر یافته مزبور با IBA در غلظت ۱ میلی‌گرم در لیتر و در شرایط تاریکی انجام شد؛ به‌طوری‌که گیاهان حاصل در گلخانه سازگار شدند.

واژه‌های کلیدی: ریزازدیادی، بادام کوهی، کشت جوانه، کشت جنین.

مقدمه

جنس بادام *Amygdalus* از خانواده Rosaceae و زیر خانواده Prunoideae، ٤۰ گونه در سطح جهان و ۳۰ گونه در ایران دارد. این گیاه عموماً غیر خودگشن و از نظر خلوص ژنتیکی ناخالص می‌باشد. اجداد آن به صورت گونه‌های وحشی در آسیای مرکزی، ایران، تاجیکستان، افغانستان و تیان‌شان چین به طور خودرو دیده می‌شوند (Khatamsaz, 1992). جنس بادام از جنبه‌های اقتصادی-اجتماعی، زیست محیطی و دارویی دارای اهمیت فراوانی است. از روغن بادام به‌عنوان نرم‌کننده و التیام‌دهنده و به

شکل پماد و کرم در تسکین عوارض بیماریهای مختلف سرخک، مخملک و اگزما استفاده می‌شود. روغن بادام شیرین ملین بوده و از میوه آن در تنقلات استفاده می‌شود. شیره بادام برای رفع سرفه، تنگی نفس و ناراحتی حنجره و درمان زخم روده، مثانه و اسهال مفید بوده و برگ آن مسهل و ضد کرم و جوشانده آن برای نارسایی کبد و کیسه صفرا سودمند است (Izaddoost, 1984). اساسا تکثیر این گونه از طریق بذر (تکثیر جنسی) و پیوند و قلمه‌های ساقه (تکثیر رویشی) صورت می‌گیرد. این گونه دارای تنوع بالای فنوتیپی بوده و در شکلهای مختلف ظاهر می‌شود. در ایران طرح‌های مختلفی در زمینه شناسایی گونه‌ها و ارقام بادام اصفهان از لحاظ تعیین خواص زراعی و مورفولوژیکی آنها و نیز بررسی گوناگونی ژنتیکی توده‌های وحشی بادام با استفاده از نشانگرهای مولکولی (Kadkhodaie & *Tabbaei*, 2008) و نیز در زمینه تنوع ژنتیکی توده‌های وحشی بادام استان اصفهان با استفاده از صفات مورفولوژیکی و پروتئین ذخیره‌ای بذر (Zeinolabedini, 2007) مورد ارزیابی قرار گرفته است. با توجه به اهمیت خاص پایه مورد نظر از جنبه داشتن بذر شیرین (بر خلاف طبیعت معمول آن که تولید بذر تلخ می‌نماید) ضرورت حفظ و تکثیر غیرجنسی گیاه مزبور از طریق ریزازدیادی احساس شد. تکنیک کشت بافت یک روش بنیادی در تکثیر و اصلاح نژاد گیاهان مهم زراعی، تجاری و دارویی محسوب شده و از مزایای این روش تکثیر تعداد زیاد گیاه در یک بازده زمانی کوتاه می‌باشد. البته با کمک تکنولوژی درون شیشه‌ای تکثیر واریته‌های مهم جنگلی در زمان کوتاه میسر می‌شود. اندام‌زایی از طریق کشت جوانه موفق‌ترین و آسان‌ترین روش ممکن است، زیرا جوانه بالقوه توانایی تکثیر و تولید اندام‌های جدید را دارد، به همین دلیل این اندام از ثبات ژنتیکی کافی نیز برخوردار است و کمترین مقدار تغییرات ژنتیکی در تکثیر به این روش دیده می‌شود (Bonga & Aderkas, 1992) .

مواد و روش‌ها

پس از شناسایی پایه‌های بادام کوهی (*Amygdalus scoparia L.*) با بذر شیرین و تلخ، در منطقه چاگربه شهرستان نائین، بذر و سرشاخه‌های این دو پایه در فصول مختلف سال جمع‌آوری و به آزمایشگاه منتقل شد.

سترون‌سازی: از روش‌هایی نظیر برس‌کشی با مایع ظرفشویی، برس‌کشی با محلول اتانل۷۰ درصد، پوسته‌برداری از جوانه‌ها و قرار دادن نمونه‌ها به مدت ۳۰ تا ٦۰ ثانیه در الکل ۷۰ درصد، جهت کاهش آلودگی‌های سطحی استفاده شد. برای سترون‌کردن جوانه‌ها از محلول کلرید جیوه ۰/۱ درصد در زمان‌های ۲ تا ۱۲ دقیقه با توجه به فصل نمونه‌برداری استفاده شد.

طرز تهیه محیط کشت: نمک‌های معدنی و ویتامین‌های محیط کشت‌های MS (Murashige &Skooge, 1962) و DKW (Driver & Kuniyuki, 1984) با ساکارز ۳ درصد و آنتی‌اکسیدان PVP به غلظت ۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر به‌عنوان محیط کشت پایه برای کشت جوانه به‌کار گرفته شد. ریزنمونه‌ها در محیط غذایی شامل سیتوکنین‌های مختلف به همراه اکسین IBA کشت شدند. محیط‌های کشت با ۰/٦۸ درصد آگار جامد و برای مدت ۲۰ دقیقه اتوکلاو شدند. کشت‌ها در شرایط نوری ۱٦ ساعت نور (۵۰۰۰- ۳۰۰۰ لوکس) و ۸ ساعت تاریکی و دمای ۲۵ – ۲۳ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. در هر واکشت

علاوه بر استفاده از محیط‌های MS وDKW، برای یافتن بهترین هورمون‌ها و مناسب‌ترین ترکیب آنها، تیمارهای مختلفی از اکسین‌ها و سیتوکینین‌ها مورد مطالعه قرار گرفتند. پس از استقرار و رشد جوانه‌ها، برای شروع شاخه‌زایی، سه آزمون آماری به مرحله اجرا درآمد. در آزمون اول تعداد سه تیمار هورمونی سیتوکنین‌های (Zeatin, BA, 2iP) در غلظت ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر در محیط کشت MS به‌کار گرفته شد. لازم به ذکر است که در طی این آزمون هورمون‌های TDZ و IBA به‌ترتیب در غلظت‌های ۰/۱ و ۰/۰۵ میلی‌گرم در لیتر بطور ثابت فرض شد. تعداد تکرارها در هر تیمار ۲۵ عدد بود (۵ شیشه و در هر یک ۵ نمونه) و این عملیات در طی سه واکشت و با تناوب زمانی٤ هفته انجام شد. جهت آزمون آماری، اعداد مربوط به ضریب ازدیاد (متوسط تعداد جوانه و شاخه در هر تکرار)، رشد طولی و سبزینگی شاخه‌ها انتخاب شد. نتایج در سیستم SPSS و در قالب طرح فاکتوریل بر پایه طرح کاملا تصادفی مورد بررسی قرار گرفت و مقایسه و دسته‌بندی میانگین‌ها به روش دانکن در سطح ۰/۰۵ انجام شد. در آزمون دوم شاخه‌زایی، اثر دو عامل هورمون و ژنوتیپ بر میزان ضریب ازدیاد (متوسط تعداد جوانه و شاخه در هر تکرار)، رشد طولی و سبزینگی شاخه‌ها در طی ٦ تیمار به مرحله اجرا درآمد، به‌طوری‌که محیط کشت DKW به همراه هورمون‌های BA و2iP در غلظت ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر از BA و ۰/۲۵ و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر از هورمون 2iP و برای هر دو نوع ژنوتیپ تلخ و شیرین به‌کار گرفته شد. البته سایر شرایط آزمون از نظر تعداد تکرارها، شرایط کشت و تناوب زمانی واکشت‌ها نظیر آزمون اول بود.

در آزمون سوم شاخه‌زایی، تأثیر سه عامل محیط کشت، هورمون و ژنوتیپ بر میزان ضریب ازدیاد (متوسط تعداد جوانه و شاخه در هر تکرار)، رشد طولی و سبزینگی شاخه‌ها در طی ۱۲ تیمار به مرحله اجرا درآمد، به‌طوری‌که محیط‌های کشت DKW و MS نصف غلظت نیترات به همراه هورمون‌های BA و 2iP در غلظت‌های مختلف و برای هر دو نوع ژنوتیپ تلخ و شیرین به‌کار گرفته شد (جدول ۱).

ریشه‌زایی

ابتدا انتقال شاخه‌های با طول ۲-۱/۵ سانتی‌متر از مرحله شاخه‌زایی به محیط کشت بدون هورمون برای یک ماه به‌عنوان پیش‌تیمار ریشه‌زایی انجام شد. شاخه‌های حاصل از مرحله پیش‌تیمار به محیط کشت MS (۱/۲ نیترات) دارای تیمارهای مختلف از هورمون ریشه‌زایی اکسین منتقل شدند. این تیمارها عبارت از هورمون‌های IBA و NAA در غلظت‌های متفاوت (۰/۳، ۰/۵، و ۱ میلی‌گرم در لیتر) به‌تنهایی و بطور تلفیقی بودند (جدول ۲). تعداد تکرارها در هر تیمار ۱۵ عدد (۳ ریزنمونه در ۵ شیشه کشت) بود. نیمی از تیمارها برای یک ماه در شرایط اتاق رشد و دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و روشنایی ۲۵۰۰ لوکس لامپ‌های با نور سفید و نیمی دیگر در تاریکی و دمای مزبور قرار گرفتند. بعد از یک ماه عوامل درصد ریشه‌زایی و درصد نکروزه شدن گیاهچه‌ها ثبت گردید.

جدول ۱- تیمارهای به‌کار گرفته شده در مرحله شاخه‌زایی (آزمون سوم)

هورمون / محیط و ژنوتیپ	اکسین	سیتوکینین				
	IBA	BA		TDZ	2iP	
	۰/۱	۰/۲۵	۰/۵	۰/۰۵	۰/۲۵	۰/۵
T1, DKW ,GB	+	−	+	+	−	−
T2, DKW, GB	+	−	−	+	−	+
T3, DKW, GB	+	+	−	+	+	−
T4, MS, GB	+	−	+	+	−	−
T5, MS, GB	+	−	−	+	−	+
T6, MS, GB	+	+	−	+	+	−
T7, DKW, GS	+	−	+	+	−	−
T8, DKW, GS	+	−	−	+	−	+
T9, DKW, GS	+	+	−	+	+	−
T10, MS, GS	+	−	+	+	−	−
T11, MS, GS	+	−	−	+	−	+
T12, MS, GS	+	+	−	+	+	−

غلظت هورمون‌ها برحسب mgl^{-1} می‌باشد. GS, GB علامت ژنوتیپ تلخ و شیرین، T1, T2, علامت تیمارهای بکار رفته و DKW, MS محیط کشت‌های اعمال شده است.

جدول ۲- تیمارهای مختلف ریشه‌زایی

هورمون / تیمار	اکسین (میلی‌گرم بر لیتر)					
	IBA			NAA		
	۰/۳	۰/۵	۱	۰/۳	۰/۵	۱
تیمار ۱	−	+	−	−	−	−
تیمار ۲	−	−	+	−	−	−
تیمار ۳	−	−	−	−	+	−
تیمار ٤	−	−	−	−	−	+
تیمار ٥	+	−	−	+	−	−

بعد از ۲ تا ۳ واکشت ماهیانه، نمونه‌های ریشه‌دار به خاک مخلوط پیت/ پرلیت/ ورمیکولیت سترون (به نسبت ٤:۱:٤) در گلدان‌های سرپوش‌دار انتقال یافته و با انجام سازگاری تدریجی گیاهان با شرایط محیط (افزایش منافذ

و کاهش رطوبت زیر سرپوش تا برداشت کامل آن) آنها به گلدان‌های بزرگ دارای خاک برگ/ خاک زراعی (به نسبت ۱:۱) در گلخانه منتقل شدند.

کشت جنین

روش سترون‌سازی بذر هر دو ژنوتیپ، پس از شکستن هسته با قرارگیری مغز بادام واجد پوسته در زیر آب جاری برای ۲٤ ساعت و بعد سترون‌سازی با محلول کلرید جیوه ۰/۱ درصد برای ۱ تا ۳ دقیقه (تیمار ۲،۱ و ۳) بود. پس از پوسته‌برداری، کشت جنین آن در دو نوع محیط کشت ۱- MS جامد بدون هورمون دارای زغال فعال و کازئین و مخمر و ۲- محیط کشت MS مایع در مخلوط خاک پیت/ورمیکولیت سترون بود. شاخه این گیاهچه‌ها پس از تفکیک، روی محیط کشت‌های مختلف آماری برای شاخه‌زایی و تکثیر برده شد و برای هر تیمار کشت ۱۲ تکرار (ریزنمونه) در نظر گرفته شد. انتقال گیاه ریشه‌دار حاصل از کشت جنین نیز به خاک سترون در گلخانه انجام شد.

نتایج

روش بهینه سترون‌سازی جوانه، استفاده از محلول کلرید جیوه ۰/۱ درصد در زمان ۲ دقیقه در فصل بهار و برای هر دو ژنوتیپ شیرین و تلخ و با بالاترین میزان استقرار جوانه نسبت به سایر فصول سال تعیین شد (جدول ۳). در مورد کشت جنین روش مناسب سترون‌سازی بذر بادام، غوطه‌وری نمونه‌ها در محلول کلرید جیوه ۰/۱ درصد در زمان ۱ دقیقه برای ژنوتیپ شیرین و ۳ دقیقه برای ژنوتیپ تلخ بود (جدول ٤).

کشت جنین در کنار کشت جوانه بطور مقایسه‌ای انجام شد، زیرا به دلیل وجود تنها یک پایه از بادام شیرین (کمبود مواد گیاهی لازم برای کشت) و با توجه به ضرورت حفظ پایه مزبور از طریق تکثیر غیرجنسی به شیوه کشت بافت از دو اندام جنین و جوانه به‌عنوان ریزنمونه استفاده شد. کشت جنین در محیط کشت MS جامد بدون هورمون دارای زغال فعال و کازیین و مخمر منجر به تولید گیاهچه از بذر به میزان ٤۰ درصد (٤۰ گیاهچه از صد بذر کشت شده) برای ژنوتیپ شیرین و ۳٤ درصد (۳٤ گیاهچه از صد بذر کشت شده) برای ژنوتیپ تلخ شد.

جدول ۳ - تأثیر تیمارهای مختلف سترون‌سازی بر درصد استقرار جوانه‌های ژنوتیپ شیرین و تلخ در فصل بهار

تیمار ضدعفونی	درصد استقرار نمونه	درصد نکروزگی نمونه	درصد آلودگی نمونه
ژنوتیپ ۱ ، تیمار ۱	۸٤/۷	۱۲/۵	۲/۷
ژنوتیپ ۱ ، تیمار ۲	۷۰/۳	۲۲/۲	۷/٤
ژنوتیپ ۱، تیمار ۳	٦٦/٦	۲۳/۸	۹/۵
ژنوتیپ ۲، تیمار ۱	۹٤/۱	٤/٤۱	۱/٤
ژنوتیپ ۲، تیمار ۲	٤۵/٤۸	۳۳/۳	۲۱/۲
ژنوتیپ ۲، تیمار ۳	٦۰	۳۰/۳	٦/٦

تیمار ۱: ۲ دقیقه در محلول کلرید جیوه ۰/۱ درصد تیمار ۲: ٤ دقیقه در محلول کلرید جیوه ۰/۱ درصد

تیمار ۳: ٦ دقیقه در محلول کلرید جیوه ۰/۱ درصد، ژنوتیپ ۱: بادام شیرین، ژنوتیپ ۲: بادام تلخ

جدول ٤- تأثیر تیمارهای مختلف سترون‌سازی بر درصد استقرار جنین‌های ژنوتیپ شیرین و تلخ

ژنوتیپ و تیمار	درصد استقرار	درصد آلودگی	درصد نکروزگی
ژنوتیپ ۱، تیمار ۱	۱۰۰	-	–
ژنوتیپ ۱، تیمار ۲	۸۵	۱۵	–
ژنوتیپ ۱، تیمار ۳	٦۰	۱۰	۳۰
ژنوتیپ ۲، تیمار ۱	۷۲/۷	-	۲٤/۲
ژنوتیپ ۲، تیمار ۲	٤۰	۵۰	۱۰
ژنوتیپ ۲، تیمار ۳	۷۵	-	۲۵

تیمار ۱: ۱ دقیقه در محلول کلرید جیوه ۰/۱ درصد تیمار ۲: ۲ دقیقه در محلول کلرید جیوه ۰/۱ درصد

تیمار ۳: ۳ دقیقه در محلول کلرید جیوه ۰/۱ درصد، ژنوتیپ ۱: بادام شیرین، ژنوتیپ ۲: بادام تلخ

شاخه‌زایی از جوانه‌ها و جنین‌های مربوط به ژنوتیپ شیرین و تلخ در محیط کشت MS با نصف غلظت از املاح پرمصرف نیترات دارای هورمون سیتوکنین BA و اکسین IBA در غلظت‌های به‌ترتیب ۰/۵ و ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر انجام شد. در بررسی تأثیر هورمون‌های سیتوکنینی (BA, 2iP, Zeatin) با غلظت مشابه بر صفات رشدی شاخه فارغ از نوع ژنوتیپ، تجزیه واریانس میانگین‌های رشد (ضریب ازدیاد، رشد طولی و سبزینگی شاخه) نشان داد که عامل هورمون تنها بر صفت رشد طولی شاخه تأثیر معنی‌دار داشت، به‌طوری‌که بیشترین رشد طولی شاخه در محیط دارای هورمون BA به‌دست آمد.

بررسی مقایسه‌ای تأثیر غلظت‌های مختلف هورمون‌های سیتوکنینی (BA, 2iP) در مقادیر ۰/۲۵ تا ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر بطور انفرادی و تلفیقی بر صفات رشدی شاخه، بیانگر معنی‌دار بودن تأثیر ژنوتیپ بر صفت ضریب ازدیاد برای ژنوتیپ شیرین و در غلظت ۰/۵ BA و ۰/۲۵ 2iP (جدول ۵) بود.

جدول ۵- میانگین مربعات حاصل از تجزیه واریانس صفات ضریب ازدیاد شاخه و جوانه، رشد طولی و سبزینگی شاخه تحت تأثیر هورمون و ژنوتیپ (آزمون دوم)

متغیر	درجه آزادی	ضریب ازدیاد شاخه	رشد طولی	سبزینگی
ژنوتیپ	۱	۳/۰۸*	۰/۵۹٦ ns	۰/۱۰۲ ns
هورمون	۲	۰/۷٤۰ ns	۰/۰۷۱ ns	۱/۲۵٤ ns
هورمون× ژنوتیپ	۲	۱/۳ns	۱/۰۸ ns	۱/۰۱۲۰ ns
خطا	٤۵	۰/۸۱۳	۰/۵٦۲	۰/۸۱۱

۰ *: معنی‌دار در سطح ۰/۰۵ و ns: غیر معنی‌دار

در آزمون تکمیلی، تأثیر دو نوع محیط کشت MS و DKW در کنار هورمون‌های سیتوکنینی BA و2iP در غلظت‌های صفر، ۰/۲۵ و ۰/۵ و برای هر دو نوع ژنوتیپ شیرین و تلخ بر صفات ضریب ازدیاد شاخه، جوانه، رشد طولی و سبزینگی شاخه بررسی شد. نتیجه آن تأثیر محیط کشت بر ضریب ازدیاد جوانه و رشد طولی شاخه معنی‌دار و در محیط کشت DKW بالاتر از محیط MS بود. تأثیر هورمون بر صفات ضریب ازدیاد شاخه و جوانه و رشد طولی معنی‌دار و برای هورمون BA در غلظت ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر مناسب‌تر از سایر غلظت‌ها بود. اثر متقابل محیط × هورمون بر رشد طولی معنی‌دار و برای محیط کشت DKW و هورمون BA در غلظت ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر مناسب‌تر از محیط کشت MS و سایر غلظت‌های هورمونی بود. اثر متقابل محیط در ژنوتیپ و نیز اثر متقابل هر سه عامل محیط× هورمون × ژنوتیپ بر ضریب ازدیاد جوانه معنی‌دار بود. اثر محیط کشت DKW و برای ژنوتیپ شیرین بر صفات ضریب ازدیاد جوانه و شاخه، رشد طولی شاخه و سبزینگی آن برتر از محیط کشت و ژنوتیپ دیگر بود. در تجزیه و تحلیل آماری صفات مورد مطالعه، محیطDKW از نظر صفت رشد طولی، ضریب ازدیاد و سبزینگی شاخه اختلاف معنی‌داری با محیط MS نشان داد، به‌طوری‌که این محیط به‌عنوان محیط کشت بهینه انتخاب شد. اثر متقابل عوامل محیط کشت و ژنوتیپ بر صفات مورد مطالعه معنی‌دار بود (جدول ٦). به‌طوری‌که محیط کشت MS برای صفات ضریب ازدیاد شاخه و جوانه ژنوتیپ تلخ و محیط کشت DKW برای این صفات متناظر در مورد ژنوتیپ شیرین انتخاب شد.

جدول ٦- میانگین مربعات حاصل از نتایج تجزیه واریانس صفات ضریب ازدیاد شاخه و جوانه، رشد طولی و سبزینگی شاخه تحت تأثیر محیط کشت و هورمون (آزمون سوم)

منابع تغییر	درجه آزادی	ضریب ازدیاد جوانه	ضریب ازدیاد شاخه	رشد طولی	سبزینگی شاخه
محیط کشت	۱	٦/٥٣٤*	۱/۱۷۸^{ns}	٤/٣٣٧**	۰/۰۹۹^{ns}
هورمون	۲	۲۸/۷٥۹**	٤/٣٤۰**	٤/۷۸٤**	۱/٦۸۷^{ns}
ژنوتیپ	۱	۰/۰۰۳ ^{ns}	۰/۱٤۲ ^{ns}	۰/۰٦۹ ^{ns}	۰/٤٤^{ns}
محیط × هورمون	۲	٥/٤٤۲^{ns}	۰/۷۱٥^{ns}	۲/۰۸۷**	۰/ ۰۸۸ ^{ns}
محیط × ژنوتیپ	۱	۱۲/٥۰٥**	۰/ ۷٥^{ns}	۰/۲۱۳ ^{ns}	۰/۲٥٥^{ns}
محیط × هورمون× ژنوتیپ	۲	۱۰/٥٤۷*	۰/ ۰۸۳^{ns}	۰/٥٦۳ ^{ns}	۰/٤۲۲^{ns}
خطا	٤۸	۲/۲۳۷	۰/٤۹۲	۰/٤۱۷	۰/٦٦٤^{ns}

**: معنی‌دار در سطح ۰/۰۱، *: معنی‌دار در سطح ۰/۰۵ و ns: غیرمعنی‌دار

در مورد صفات ضریب ازدیاد شاخه و جوانه، رشد طولی و سبزینگی شاخه، تأثیر هورمون BA در غلظت ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر و برای ژنوتیپ شیرین برتر از سایر تیمارهای مورد بررسی بود. در مورد تأثیر متقابل محیط کشت، هورمون و ژنوتیپ، تأثیر محیط کشت DKW و هورمون BA در غلظت ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر برای ژنوتیپ تلخ و در مورد صفات ضریب ازدیاد شاخه و رشد طولی شاخه بیشتر بود. درحالی‌که صفات ضریب

ازدیاد جوانه و سبزینگی شاخه برای ژنوتیپ شیرین در همین تیمار بالاتر از سایر تیمارها بود. در مرحله ریشه‌زایی، بیشترین میزان ریشه‌دار شدن نمونه‌ها در تیمار مربوط به IBA در غلظت ۱ میلی‌گرم در لیتر بدست آمد (جدول ۷ و شکل ۱- ذ). از نظر میزان سازگاری، گیاهان کشت بافتی پس از انتقال به خاک گلدان و در شرایط گلخانه‌ای حدود ٤۰ درصد سازگاری از خود نشان دادند (شکل ۱- چ).

جدول ۷- میانگین درصد ریشه‌زایی نمونه‌های بادام در تیمارهای مختلف هورمونی اکسین

هورمون (mg/l)	NAA		IBA		NAA + IBA
	۰/۵	۱	۰/۵	۱	۰/۳+۰/۳
درصد ریشه‌زایی	۹/۱c	٦d	۱۲/۲b	۲۳/۳a	٥d
درصد نکروزگی	٤۳/۳d	۷٦/٦a	٥٥/٥b	٤٥/٥b	٦٤/٤c

حروف مشابه در هر ستون بیانگر عدم وجود اختلاف معنی‌دار می‌باشد.

بحث

با توجه به خطر از بین رفتن پایه شیرین بادام کوهی، تکثیر غیرجنسی این گونه از طریق کشت بافت می‌تواند به حفاظت از این منبع ژنتیکی با ارزش منجر شود. برس‌کشی سطح جوانه‌ها با مایع ظرفشویی و اتانل در حذف زوائد سطح جوانه و لایه مومی سطح کوتیکول مؤثر بوده و آلودگی‌های سطحی را تا حد امکان به حداقل رسانید و اجازه نفوذ و تأثیر مناسب‌تر محلول اصلی ضدعفونی‌کننده را بر بافت نمونه داد (Enjarlic,1988). محلول کلریدجیوه با مقادیر ضعیف و در زمان‌های کوتاه‌مدت تأثیر قوی و ماندگاری بر حذف آلودگی‌های میکروبی با حداقل نکروزه شدن بافت ریزنمونه داشت. مشابه تحقیق اخیر در ریزازدیادی هیبرید هلو و بادام، جوانه‌های انتهایی و جانبی گیاه را در فصل بهار و با محلول کلرید جیوه ۰/۱ درصد به مدت ٦ دقیقه سترون نمودند (Kamali *et al.*, 2001). در این تحقیق، با توجه به وجود ترکیبات فنلی در درون بافت‌های گونه مورد بررسی، از محلول PVP جهت حذف این مواد و تحریک شاخه‌ها به رشد استفاده شد. در این خصوص Emam و همکاران (۲۰۰۹) گزارش کردند که افزودن PVP موجب حذف ترکیب‌های فنلی از ریزنمونه‌های اکالیپتوس گرندیس می‌شود. در بین تنظیم‌کننده‌های رشد مورد استفاده در مرحله شاخه‌زایی، بیشترین میانگین ضریب ازدیاد شاخه و جوانه، رشد طولی و سبزینگی شاخه در محیط کشت DKW و با ترکیب هورمونی BA (۰/۵ میلی‌گرم در لیتر) و IBA (۰/۱ میلی‌گرم در لیتر) بدست آمد. هورمون BA ازجمله تنظیم‌کننده‌های محرک رشد و تکثیر شاخه با قدرت ماندگاری بالا بوده و در غلظت‌های نسبتا بالای این هورمون، رشد شاخه‌های جانبی گیاهان به دست می‌آید که به دلیل ذخیره شدن این هورمون در جوانه‌های جانبی گیاه است (Evers *et al*, 1988). در طی تحقیقی Kamali و همکاران (۲۰۰۱)، شاخه‌زایی بهینه ژنوتیپ‌های خاص بادام را در محیط کشت MS و هورمون BA و IBA در غلظت ۱ و ۰/۰۱ میلی‌گرم در لیتر بدست آوردند. در ضمن Bonga و Aderkas (۱۹۹۲) نیز نتیجه گرفتند که تیمار سیتوکنین به‌همراه غلظت‌های

ضعیف اکسین بر ایجاد شاخه‌های نابجا، بخصوص در آغاز شاخه‌زایی مؤثر است. هورمون سیتوکنینی TDZ با عملکرد بازدارندگی سیتوکنین اکسیداز خود، موجب افزایش سطح سیتوکنین درونی گیاه و در نتیجه تحریک شاخه‌زایی شد (Murthy, *et.al*. 1998).

به‌منظور تحریک شاخه‌ها به ریشه‌زایی، اعمال پیش‌تیمار محیط کشت بدون هورمون مناسب بود، زیرا تجمع فلاونوئیدها بوسیله اکسین، منجر به القای تشکیل ریشه شده که این اتفاق در حضور سیتوکنین صورت نمی‌گرفت (Curir, *et al*, 1990). ریشه‌زایی در محیط LS و IBA ۳ درصد و ۷ روز دوره تاریکی توسط Kamali و همکاران (۲۰۰۱) بدست آمد. هورمون IBA بطور گسترده برای ریشه‌زایی گونه‌های چوبی که به سختی ریشه‌دار می‌شود بکار می‌رود (Rathore, *et al*., 2007). تأثیر هورمون‌های خانواده اکسین ازجمله IBA و NAA و یا ترکیبی از این دو هورمون بر ریشه‌زایی گونه‌های مختلف جنگلی، توسط Chalupa (1987) مثبت ارزیابی شد. بر این اساس، در این تحقیق نیز از این هورمون‌ها به صورت مجزا و همچنین تلفیقی استفاده شد و ریشه‌زایی مناسب در محیط کشت دارای IBA به مقدار یک میلی‌گرم در لیتر و در تاریکی حاصل شد. بنابراین تأثیر کاهش نمک معدنی موجود در محیط کشت، مرحله انتقال به خاک و سازگاری ریشه را تسهیل نمود (Dalal & Rai., 2004).

منابع مورد استفاده

- Bonga, J.M. and Aderkas, P.V., 1992. *In vitro* Culture of Trees. Kluwer Academic Publishers, 236pp.
- Chalupa, V., 1987. Effect of benzyl amino purine and thydiazuron on *in vitro* shoot proliferation of *Tilia cordata Mill*., *Sorbus aucuparia* L. and *Robinia pseudo acaciae* L. Biologia Plantarum, 29: 425-429.
- Curir, P., Sumerect, V., and Termini, A., 1990. Flavonoid accumulation is correlated with adventitious root formation in *Eucalyptus gunnii* Hook micropropagated through axillary bud stimulation. Plant Physiology, 92: 1148-1153.
- Dalal, N.V., and Rai, V.R., 2004. *In vitro* propagation of *Oroxylum indicum* Vent. A medicinally important forest tree. Journal for Research, 9: 61-65.
- Driver, J.A., and Kuniyuki, H., 1984. *In vitro* propagation of Paradox walnut root stocks (*J. hindsii*× *J. regia*). HortScience, 19:507-509.
- Emam, M., Assare, M., Shahrzad, Sh., and Khojir, K., 2009. *In vitro* propagation of mature species of *Eucalyptus grandis* by tissue culture. Iranian Journal of Rangelands and Forests Plant Breeding and Genetic Research: 35-43.
- Enjarlic, F., and Lardet, L., 1988. Contamination of primary culture in tropical areas. Acta Horticulture, 225: 57-65.
- Evers , P. W., Donkers, J., Prat A. and Vermeer, E., 1988. Micropropagation of forest trees through tissue culture: 98-102. In:Bonga, J.M., Aderkas. P., (Eds). *In vitro* culture of trees. Centre for Agricultural Publishing and Documentation: 236 Pp.
- Izaddoost, M.,1984. Plant Chemistry. Tehran University Publication, 233pp.
- Kadkhodaie, S. and Tabaei, S. R., 2008. Applying of genetic card of varieties and genotypes of domestic *Amygdalus* by molecular markers. Fifth of national biotechnology Congress of Iran, Pp: 95-95.
- Kamali, K., Majidi, E. and Zarghami, R., 2001. Identification of optimum medium and growth factors for micropropagation of asexual stands GF677. Journal of Seed and Seedling, 17: 234-243.
- Khatamsaz, M, 1992. Flora of Iran. Rosaceae., Research Institute of Forests and Rangelands (Pub.), 2: 314-319.
- Murashige, T., and Skooge, F., 1962. A revised medium for rapid growth and bio- assays with tobacco tissue culture. Physiologia Plantarum, 15: 473-597.
- Murthy, B.N.S., Murca, S. J. and Saxenea, P. K., 1998. Thydiazuron: A potent regulator of *in vitro* plant morphogenesis. *In vitro* Cellular and Developmental Biology Plant, 34: 267-275.
- 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.
- Zeinolabedini, M., 2007. Study of Genetic variation in some of Isfahan wild *Amygdalus* species by some of morphologic and seed protein electrophoresis aspects. M.Sc. thesis. Tabriz University, Agriculture faculty, Horticulture Department, 237pp.

Micropropagation of *Amygdalus scoparia* L. by bud and embryo culture

M. Emam[1*], A. Ghamari Zare[2], F. Asadicorom[3] and K. Looki Anaraki[4]

1*-Corresponding author, M.Sc., Research Institute of Forest and Rangelands, Tehran, I.R. Iran.
Email: memam@rifr-ac.ir
2- Assoc. Prof., Research Institute of Forest and Rangelands, Tehran, I.R. Iran.
3- M.Sc., Research Institute of Forest and Rangelands, Tehran, I.R. Iran.
4- B.Sc., Agricultural and Natural Resources Research Center, Isfahan, I.R.Iran.

Received: 10.15.2011 Accepted: 06.25.2013

Abstract

Amygdalus scoparia L. is an important species of Rosaceae. The species is endemic of Iran and resistant to heat and drought for which, the species has been used in civil green landscape designing projects and endemic byproducts. *A. scoparia* normally produces bitter seeds, whoever, only one *Amygdalus* tree with sweet seeds was found among bitter A*mygdalus* stands in Naein, a city in center part of the country. Due to the importance of the tree with sweet seeds, micropropagation of the single tree would be of interest, particularly for preservation of the genetic resources. Propagation of one tree of each sweet and bitter genotype through micropropagation by bud and embryo culture was performed. Sterilization treatment was done by cleaning and brushing of buds by detergent and 70% ethanol solution, followed by dipping the buds in 0.1% $HgCl_2$ solution for 2 minutes during the spring season for both of genotypes. The suitable method for seed surface sterilizing was washing in tap water and then dipping in 0.1% $HgCl_2$ solution during 1 minutes for the sweet and 3 minutes for the bitter genotype. The best medium for shoot proliferation was DKW along with BA (0.5 mg/l), IBA (0.1 mg/l) and TDZ (0.05 mg/l). Rooting of shoots was done in hormone free medium that followed by placing the shoots in modified MS medium supplemented with 1 mg/l of IBA in dark condition. The plantlets were acclimated in greenhouse.

Key words: *Amygdalus scoparia*, micropropagation, bud culture and embryo culture.