دانشکده کشاورزی

گروه باغبانی و گیاه‌پزشکی

بررسی اثرات تنظیم کننده های رشد گیاهی بر ریزازدیادی سه رقم زردآلو ایرانی

دانشجو:

زهرا خزاعی کجوری

اساتید راهنما:

دکتر مهدی رضایی

دکتر شاهرخ قرنجیک

استاد مشاور:

مهندس حسن قربانی قوژدی

پایان‌نامه جهت اخذ درجه‌ی کارشناسی ارشد

ماه و سال انتشار

شهریور۱۳۹۳

پروردگارا:

نه میتوانم موهایشان راکه در راه عزت من سفید شد، سیاه کنم و نه برای دستهای پینه بسته شان که ثمره تلاش برای افتخار من است، مرهمی دارم . پس توفیقم ده که هر لحظه شکر گزارشان باشم و ثانیه های عمرم را در عصای دست بودنشان بگذرانم .

تقدیم به پدر و مادرم و خواهر و برادرم

وجودم برایشان همه رنج بود و وجودشان برایم همه مهر

تشکر و قدردانی:

و شمع را طریقتی است که تا پایان راه یاریگرش خواهد بود و پروانه را معرفتی است که تا پایان راه کسب خواهد کرد و شمع سان خواهد سوخت و حکایت شمع حکایت دستان «استاد» بود که بی صدا می سوخت.

و بعد از مدتها، پس از پیمودن راههای فراوان که با حضور شیرین اساتید راهنما آقای دکتر مهدی رضایی، آقای دکتر شاهرخ قرنجیک و استاد مشاور آقای مهندس حسن قربانی با راهنماییها و دغدغه‌های فراوانشان و شیطنتهای زیبای آن دوران، خستگی‌های این راه را به امید و روشنی راه تبدیل کرد همچنین از جناب آقای مهندس مومنی و سرکار خانم مهندس صادقی به دلیل یاریها و راهنماییهای بی چشمداشت ایشان که بسیاری از سختیها را برایم آسانتر نمودند.

دوستان عزیزم آقای مهندس اصغر عرب اسدی، آقای مهندس هادی قاسمی، خانم مهندس محدثه ایزدی مسئولین آزمایشگاه آقای مهندس محمد ابراهیم حسین پور، خانم مهندس سمیه فرجی، آقای مهندس غلامرضا شاکری، آقای مهندس حسن گلی و دیگر عزیزانی که مرا در انجام این پایان نامه یاری نمودند تشکر و قدردانی نمایم.

امیدوارم بتوانم در آینده نزدیک جوابگوی این همه محبت آنها باشم.

تعهدنامه

اینجانب **زهرا خزاعی کجوری** دانشجوی دوره کارشناسی ارشد رشته مهندسی کشاورزی- باغبانی دانشکده مهندسی کشاورزی دانشگاه شاهرود نویسنده پایان نامه **بررسی اثرات تنظیم کننده‌های رشد گیاهی بر ریزازدیادی سه رقم زردآلو ایرانی** تحت راهنمایی دکتر مهدی رضایی و دکتر شاهرخ قرنجیک متعهد می‌شوم.

- تحقیقات در این پایان نامه توسط اینجانب انجام شده است و از صحت و اصالت برخوردار است.
- در استفاده از نتایج پژوهشهای محققان دیگر به مرجع مورد استفاده استناد شده است.
- مطالب مندرج در پایان نامه تاکنون توسط خود یا فرد دیگری برای دریافت هیچ نوع مدرک یا امتیازی در هیچ جا ارائه نشده است.
- کلیه حقوق معنوی این اثر متعلق به دانشگاه صنعتی شاهرود می‌باشد و مقالات مستخرج با نام « دانشگاه شاهرود » و یا «Shahrood University» به چاپ خواهد رسید.
- حقوق معنوی تمام افرادی که در به دست آمدن نتایج اصلی پایان نامه تأثیرگذار بوده اند در مقالات مستخرج از پایان نامه رعایت می گردد.
- در کلیه مراحل انجام این پایان نامه ، در مواردی که از موجود زنده (یا بافتهای آنها) استفاده شده است ضوابط و اصول اخلاقی رعایت شده است.

تاریخ

امضای دانشجو

مالکیت نتایج و حق نشر

- کلیه حقوق معنوی این اثر و محصولات آن (مقالات مستخرج، کتاب، برنامه های رایانه ای، نرم افزار ها و تجهیزات ساخته شده است) متعلق به دانشگاه صنعتی شاهرود می باشد. این مطلب باید به نحو مقتضی در تولیدات علمی مربوطه ذکر شود.
- استفاده از اطلاعات و نتایج موجود در پایان نامه بدون ذکر مرجع مجاز نمی باشد.

چکیده:

در این مطالعه اثرات تنظیم کننده‌های رشد گیاهی بر ریزازدیادی چند رقم زردآلو ایرانی به منظور دستیابی به ظرفیت بالای تکثیر از طریق کشت بافت مورد بررسی قرار گرفت. مواد گیاهی از ارقام زردآلوی جعفری، قوامی، رجبعلی و خیوه‌ای در دانشکده کشاورزی دانشگاه شاهرود تهیه شد. گره‌ها پس از استریل سطحی با کلرید جیوه و اسید سیتریک در محیط کشت MS وWPM در دو فصل زمستان و بهار مستقر شدند. نتایج حاصل از استفاده دو محیط مختلف تفاوت معنی‌داری را در جوانه‌زنی زردآلو نشان نداد، بیشترین درصد جوانه‌زنی جوانه‌های خفته در رقم رجبعلی در فصل زمستان در حالت فلس‌برداری به‌طور میانگین ۶۲/۷۷ درصد و در فصل بهار به میزان ۷۶/۶۶ درصد مشاهده شد. پرآوری ریزنمونه‌های جوانه‌زده در محیط WPM با سه غلظت (۰/۵، ۱و۲) میلی‌گرم در لیتر BAP و IBA با غلظت ۰/۰۵ میلی‌گرم در لیتر در چند رقم زردآلو صورت گرفت. بیشترین تعداد شاخه در غلظت یک میلی‌گرم در لیتر در رقم رجبعلی و بیشترین طول شاخه در غلظت دو میلی‌گرم در لیتر در رقم جعفری مشاهده شد. به منظور ریشه‌زایی شاخه‌های پرآوری شده سه غلظت (۰/۵، ۱ و۲) میلی‌گرم در لیتر IBA مورد بررسی قرار گرفت. نتایج آزمایش ریشه‌دهی موفقیت آمیز نبود و ریزنمونه‌ها از بین رفتند.

کلمات کلیدی: زردآلو، تنظیم کننده‌های رشد گیاهی، ریزازدیادی

مقالات:

بررسی اثر روش های مختلف ضدعفونی در کنترل آلودگی های سطحی و میزان سیاه شدگی بافت درکشت درون شیشه‌ای ریزنمونه گره شاخه زردآلو

زهرا خزاعی کجوری*، مهدی رضایی، شاهرخ قرنجیک، حسن قربانی قوژدی

هشتیمن کنگره علوم باغبانی ایران- شهریور ۹۲

فهرست مطالب:

۱- فصل اول:مقدمه و کلیات ۱

۱-۱- مقدمه ۱

۱-۲- اهمیت و اهداف ۴

۱-۲-۱- اهداف ۴

۱-۳- تاریخچه ۴

۱-۴- ارزش غذایی ۵

۱-۵- گیاه‌شناسی ۷

۱-۶- برنامه‌های اصلاحی ۸

۱-۷- احتیاجات آب و هوایی ۱۰

۱-۸- کشت بافت ۱۰

۱-۹- ریزازدیادی ۱۱

۱-۱۰- مشکلات ریزازدیادی گیاهان چوبی نسبت به علفی ۱۱

۱-۱۱- فواید تکثیر کلون در شرایط درون‌شیشه‌ای ۱۲

۱-۱۲- نقش تنظیم کننده‌های رشد گیاهی در کشت بافت گیاهی ۱۲

۱-۱۳- ذغال فعال ۱۳

۱-۱۴- اهمیت ریزازدیادی زردآلو ۱۳

۱-۱۵- مشکلات ریزازدیادی زردآلو ۱۴

۲- فصل دوم: مروری بر منابع ۱۹

۳- فصل سوم: مواد و روش‌ها ۳۳

۳-۱- آزمایش ۱- بهینه‌سازی روش‌های ضدعفونی، محیط کشت و تیمارهای رفع خفتگی در مرحله استقرار شاخساره‌های زردآلو در جوانه‌های خفته و در حال رشد زردآلو در محیط درون‌شیشه‌ای ۳۳

۳-۱-۱- مواد گیاهی و شرایط کشت ۳۳

۳-۱-۲- ضدعفونی قطعات گره‌ای ۳۳

۳-۱-۳- تیمارهای ضدعفونی ریزنمونه ۳۳

۳-۱-۴- تهیه محیط کشت ۳۶
۳-۲- آزمایش ۲- بررسی اثر BAP در پرآوری شاخساره‌های زردآلو در محیط درون‌شیشه‌ای ۳۹
۳-۲-۱- تهیه محیط کشت و اضافه کردن تنظیم کننده رشد گیاهی ۳۹
۳-۲-۲- تنظیم pH محیط کشت ۴۰
۳-۲-۳- تیمار تنظیم کننده رشد گیاهی در مرحله پرآوری ۴۰
۳-۲-۴- واکشت ۴۰
۳-۲-۵- صفات مورد اندازه‌گیری ۴۱
۳-۳- آزمایش ۳- انتقال شاخه‌های تولیدی به محیط ریشه‌زایی ۴۱
۳-۴- آنالیز آماری ۴۱
۳-۴-۱- آزمایش اول ۴۱
۳-۴-۲- آزمایش دوم ۴۲
۳-۴-۳- آزمایش سوم ۴۲
۳-۵- نرم افزارهای مورد استفاده ۴۲
۴- فصل چهارم: نتایج و بحث ۴۵
۴-۱- آزمایش اول- ضدعفونی و استقرار ریزنمونه‌ها ۴۵
۴-۲- درصد جوانه‌زنی در طول فصل زمستان ۴۶
۴-۳- درصد جوانه‌زنی در طول فصل بهار ۵۰
۴-۴- آزمایش دوم- پرآوری (شاخه‌زایی) ۵۳
۴-۵- آزمایش سوم- ریشه‌زایی ۶۱
۴-۶- نتیجه‌گیری ۶۲
۴-۷- پیشنهادات ۶۳
۵- منابع ۶۷

فهرست اشکال

شکل ۱-۱ نقشه و نمودار سطح زردآلوی برداشت شده در جهان ۲۰۱۱ ..... ۲

شکل ۱-۲ نقشه و نمودار میزان عملکرد زردآلو در جهان ۲۰۱۱ ..... ۳

شکل ۱-۳ جوانه و گل باز شده زردآلو (رسول زادگان، ۱۳۷۵) ۸

شکل ۳-۱ حذف برگ‌های قلمه ۳۵

شکل ۳-۲ جوانه‌های فلس‌برداری شده ۳۶

شکل ۳-۳ جوانه‌های کشت شده در محیط WPM ۳۷

شکل ۳-۴ شاخه های کشت شده در مرحله استقرار ۳۹

شکل ۴-۱ شکست خواب در جوانه فلس‌برداری شده زردآلو رقم جعفری دو هفته بعد از کشت ۴۷

شکل ۴-۲ عدم جوانه‌زنی جوانه فلس‌برداری نشده یک هفته بعد از کشت ۴۷

شکل ۴-۳ اثر متقابل جیبرلین و فلس‌برداری در درصد شکست خواب جوانه‌های رویشی زردآلو ۴۸

شکل ۴-۴ مقایسه میانگین درصد جوانه‌زنی رقم × فلس‌برداری ۴۸

شکل ۴-۵ جوانه‌زنی در زردآلوی رقم رجبعلی پس از چهار هفته در محیط کشت MS ۵۱

شکل ۴-۶ درصد جوانه‌زنی سه رقم زردآلو در محیط MS ۵۱

شکل ۴-۷ سوختگی برگ‌های زردآلو در مرحله استقرار ۵۲

شکل ۴-۸ میانگین تعداد شاخه‌های پرآوری شده چهار رقم زردآلو در کشت درون شیشه ای ۵۴

شکل ۴-۹ زردآلوی پرآوری شده رقم رجبعلی پس از یک ماه در غلظت یک میلی‌گرم درلیتر BAP ۵۴

شکل ۴-۱۰ تاثیر تنظیم کننده رشد گیاهی BAP در تعداد شاخه پرآوری شده زردآلو در کشت درون‌شیشه‌ای ۵۴

شکل ۴-۱۱ اثر تنظیم کننده رشد گیاهی BAP بر تعداد شاخه پرآوری شده چهار رقم زردآلو ۵۶

شکل ۴-۱۲ میانگین طول شاخه تولید در چهار رقم زردآلو در شرایط کشت بافتی ۵۸

شکل ۴-۱۳ شاخه زردآلو رقم رجبعلی بعد از یک ماه در غلظت دو میلی‌گرم در لیتر BAP ۵۸

شکل ۴-۱۴ تاثیر BAP بر میانگین طول شاخه زردآلو در شرایط کشت درون‌شیشه‌ای ۵۸

شکل ۴-۱۵ اثر تنظیم کننده رشد گیاهی BAP بر طول شاخه پرآوری شده چهار رقم زردآلو ۵۹

فهرست جداول

جدول ۳-۱ عناصر میکرو و ماکرو محیط WPM (Loyd and McCown, 1980) ۳۸

جدول ۳-۲ عناصر میکرو و ماکرو محیط MS (Murashinge and Skoog, 1962)..... ۳۸

جدول ۳-۳ ترکیب و غلظت تنظیم کننده رشد گیاهی BAP به منظور پرآوری زردآلو ۳۹

جدول ۳-۴ ترکیب و غلظت تنظیم کننده رشد گیاهی IBA به منظور ریشه‌زایی زردآلو ۴۰

جدول ۴-۱ اثر تیمارهای مختلف ضدعفونی شاخه‌های جانبی بر میزان آلودگی‌های قارچی، باکتریایی و قهوه‌ای شدن بافت در ۱۰ روز پس از کشت در رقم جعفری زردآلو در اسفند ماه ۴۵

جدول ۴-۲ اثر تیمارهای مختلف ضدعفونی شاخه‌های جانبی بر میزان آلودگی‌های قارچی، باکتریایی و قهوه‌ای شدن بافت در۷ روز پس از کشت در رقم جعفری زردآلو در فروردین ماه ۴۶

جدول ۴-۳ تجزیه واریانس اثر جیبرلین و فلس‌برداری در درصد شکست خواب جوانه‌های رویشی دو رقم زردآلو..... ۴۷

جدول ۴-۴ تجزیه واریانس درصد جوانه‌زنی دو رقم زردآلو در محیط MS و WPM ۵۰

جدول ۴-۵ تجزیه واریانس درصد جوانه‌زنی سه رقم زردآلو در محیط MS..... ۵۰

جدول ۴-۶ تجزیه واریانس اثر تنظیم کننده رشد گیاهی و رقم بر پرآوری زردآلو ۵۳

فصل اول:

مقدمه و کلیات

۱- فصل اول:مقدمه و کلیات

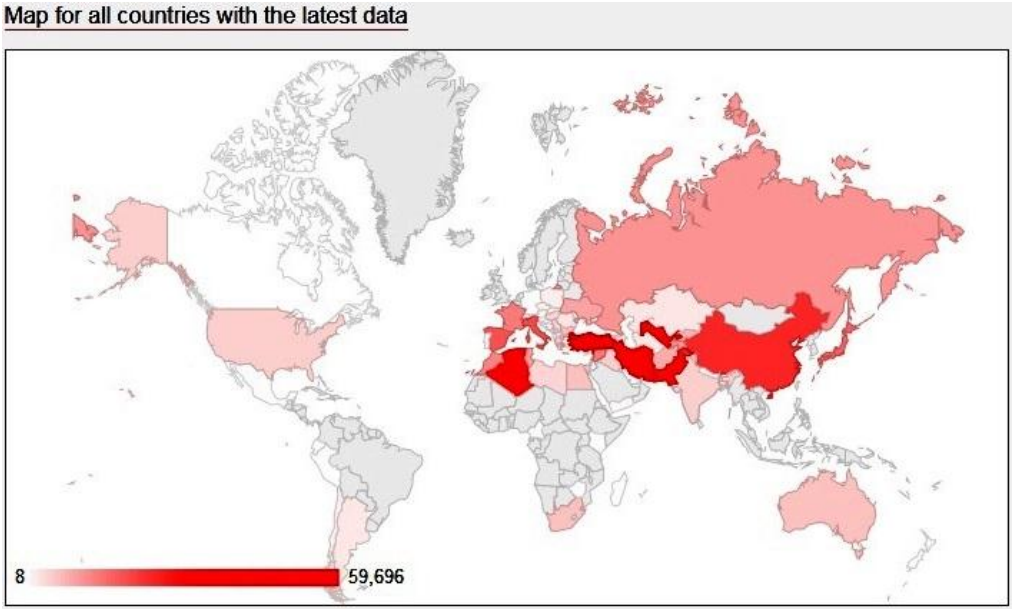
۱-۱- مقدمه

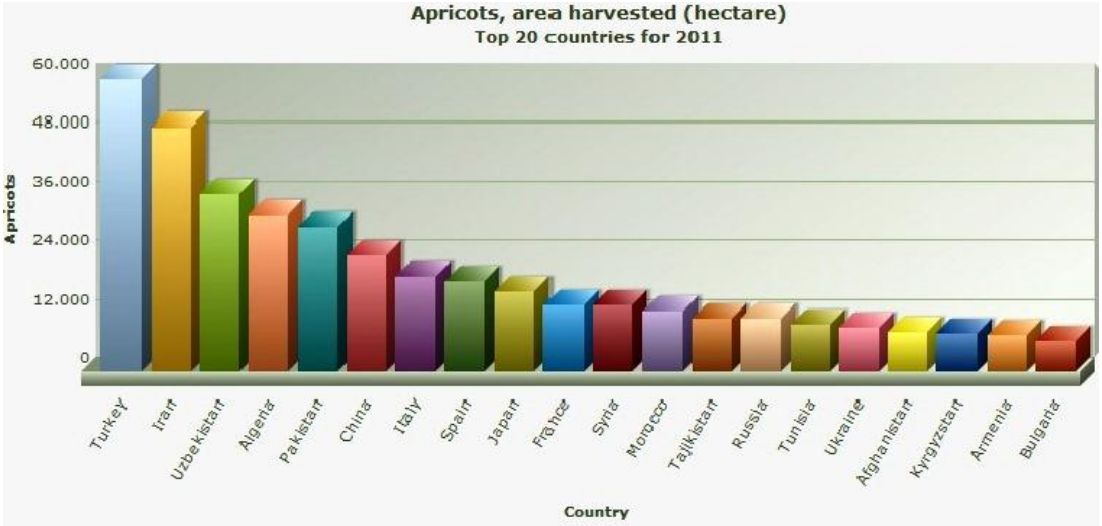
زردآلو به عنوان دومین گونه‌ی مهم در میوه‌های هسته‌دار بعد از هلو است و از نظر جغرافیایی نیاز اکولوژیکی خاصی دارد. سطح زیرکشت تجاری به محل‌های بدون یخبندان شیب‌های مشرف به اقیانوس آرام محدود شده است. در طول بیست سال اخیر تولید جهانی میوه زردآلو ۸۵ درصد افزایش یافته، دلیل اصلی آن افزایش کشت در آسیا (ترکیه- ایران- پاکستان- ازبکستان) و آفریقا (مصر- مراکش - الجزایر) می‌باشد. بیش از نصف تولید جهانی زردآلو در نواحی مدیترانه متمرکز شده است و ایران پس از ترکیه دومین تولید کننده اصلی زردآلو است (Zhebentyayeva *et al.*, 2012).

سطح زیرکشت زردآلو در کشور حدود ۶۴ هزار هکتار است که در شهرهایی مانند آذربایجان شرقی، سمنان، آذربایجان غربی، زنجان، خراسان رضوی، تهران، کرمان، اصفهان و... پراکنده هستند. استان سمنان با تولید سالانه بیش از ۴۲ هزار تن زردآلو که بیشتر باغ‌ها در شهرستان شاهرود، بسطام و مجن متمرکز شده، رتبه نخست کشور را دارد. ارقام زردآلوی تجاری استان سمنان را قوامی شاهرود، رجبعلی، جهانگیری و نصیری تشکیل می‌دهد. با توجه به موقعیت استان در مسیر حرکت غرب به شرق و برعکس و نزدیکی به مراکز عمده مصرف استان‌های هم مجاور، حدود ۸۰ درصد زردآلوی استان به‌صورت تازه خوری و به میزان ۱۰ درصد نیز به کشورهای آسیای میانه صادر و بقیه در استان مصرف و فرآوری می‌شود (خبرگزاری مهر، ۱۳۹۲).

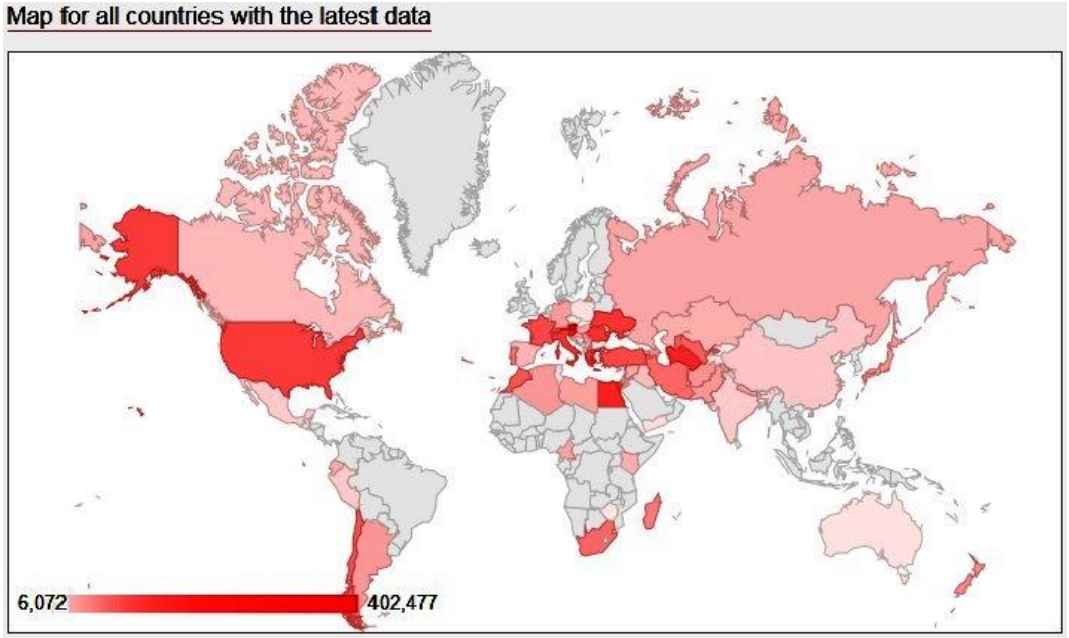
زردآلو در ترکیه به استثنا نواحی خیلی مرطوب، دریای سیاه و نواحی کوه‌های سرد آناتولیا در تمامی مکان‌ها رشد می‌کند. در ترکیه، مالاتیا یک ایالت در شرق آناتولیا تولید کننده مهم زردآلو است. این نواحی ۵۰ درصد تولید میوه تازه و ۹۰ درصد تولید میوه خشک می‌کند (Turkstat, 2009). فاکتورهای اکولوژی این منطقه در کیفیت بالای این زردآلوها موثر است. به‌هرحال مالاتیا با ۸۰-۸۵ درصد تولید به عنوان بزرگترین تولید کننده زردآلو در جهان شناخته شده است (Asma, 2000). اطلاعات آماری FAO در سال ۲۰۱۱ (شکل ۱-۱، شکل ۱-۲) نشان می‌دهد که ایران از لحاظ سطح

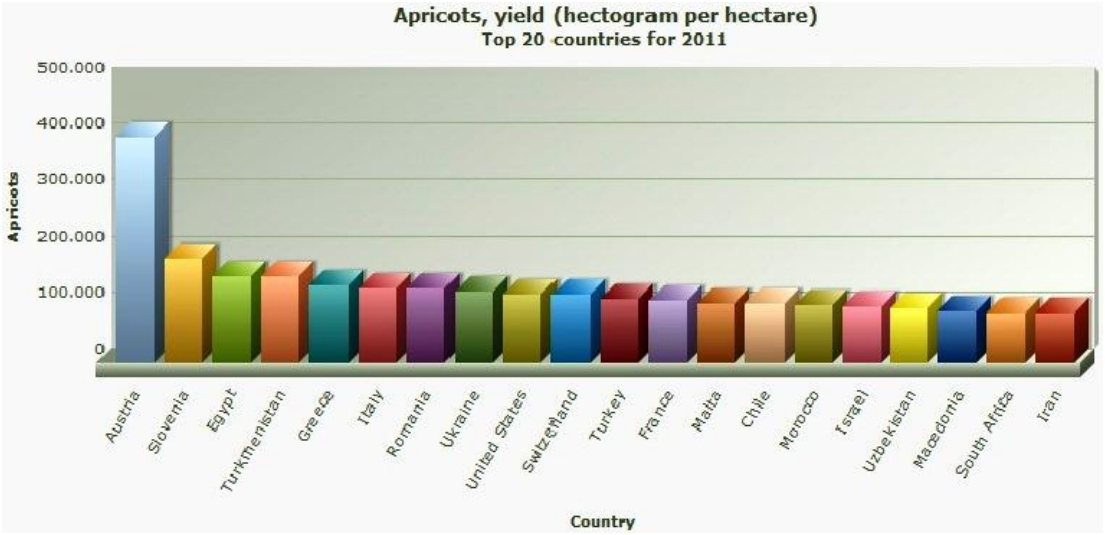
زیر کشت مقام دوم بعد از ترکیه را دارد ولی به لحاظ عملکرد در هکتار استرالیا مقام اول، ترکیه یازدهمین کشور و ایران به عنوان بیستمین کشور در سطح پایینی قرار دارد. همچنین اطلاعات آماری نشان می‌دهد ایران پتانسیل افزایش تولید در هکتار را دارد که با استفاده از برنامه‌های اصلاحی می‌توان موجب افزایش عملکرد شد.





شکل ۱-۱ نقشه و نمودار سطح زردآلوی برداشت شده در جهان ۲۰۱۱
(FAO, 2011)





شکل ۱-۲ نقشه و نمودار میزان عملکرد زردآلو در جهان ۲۰۱۱
(FAO, 2011)

طبق آمار سازمان FAO یازده کشور تولید کننده زردآلو در سال ۲۰۱۱ به‌صورت زیر می‌باشد. ایران از نظر سطح برداشت شده، عملکرد و تولید بعد از الجزایر، مصر و فرانسه دارای مقاوم چهارم به ترتیب ۵۰۱۷۷ هکتار، ۹۰۲۷۸ و ۴۵۲۹۸۸ تن می‌باشد.

۱-۲- اهمیت و اهداف

گزارشات کمی در مورد ریزازدیادی زردآلو به‌صورت تجاری وجود دارد و تاکنون گزارشی در مورد ریزازدیادی ارقام ایرانی زردآلو گزارش نشده است. از آنجایی که در زردآلو، ژنوتیپ در تعیین محیط کشت و غلظت و ترکیب تنظیم کننده‌های رشد گیاهی مورد نیاز تاثیر زیادی دارد در این تحقیق سعی می‌شود تا امکان ریزازدیادی ارقام ایرانی زردآلو بررسی و در صورت امکان ترکیب تنظیم کننده رشد گیاهی مناسب برای پرآوری و ریشه‌زایی شاخساره‌های جانبی زردآلو تعیین گردد.

۱-۲-۱- اهداف

از جمله اهدافی که در این تحقیق مورد بررسی قرار می‌گیرد می‌توان به موارد زیر اشاره کرد:

۱. بررسی ارقام زردآلوی ایرانی از نظر قابلیت ریزازدیادی.
۲. تعیین غلظت و ترکیب مناسب از هورمون سایتوکنینی BAP برای پرآوری شاخساره‌های ارقام مختلف زردآلو.
۳. تعیین غلظت و ترکیب بهینه هورمون اکسینی IBA برای ریشه‌زایی شاخساره ارقام زردآلو.
۴. بررسی امکان ریزازدیادی ارقام ایرانی زردآلو.

۱-۳- تاریخچه

زردآلو با اسم علمی *Prunus armeniaca* L بومی دشت‌های ارمنستان نیست اما به‌طور پیوسته از اولین قرن بعد از میلاد مسیح در آنجا کشت شده است. طبق حفارهای باستان شناسان زردآلو متعلق به مراکز شرقی (چین، سیبری)، پیش از میلاد مسیح می‌باشد و از آنجا به ارمنستان برده شده است. از زمان‌های قدیم، غذاها، رسم‌ها وسنت‌های ارمنستانی تحت تاثیر وجود زردآلو در این منطقه بوده است (Faustm *et al.*, 1998). این میوه حدود ۱۰۰ سال قبل از میلاد مسیح به ایتالیا و در قرن سیزدهم به انگلستان، و قبل از ۱۷۲۰ به آمریکای شمالی آورده شد (رسول‌زادگان، ۱۳۷۵).

۱-۴- ارزش غذایی

زردآلو، میوه‌ای خوشمزه و شیرین است و خوردن یک عدد از آن، قبل از غذا کمک زیادی به هضم غذا می‌کند. این میوه تا زمانی که نارس است دارای طعم ترش است و هر چه بیشتر می‌رسد، طعم آن شیرین‌تر می‌شود و خاصیت اسیدی بودنش را از دست می‌دهد و مقدار ویتامین آ[۱] در آن افزایش می‌یابد. هر ۱۰۰ گرم قسمت گوشت‌دار میوه حاوی ۸ تا ۱۲ گرم کربوهیدرات، ۰/۴۳ تا ۱ گرم پروتئین، ۰/۱ تا ۰/۱۲ گرم چربی، ۱۸ میلی‌گرم کلسیم، ۲۲ فسفر، ۳/۰۷ آهن، ۳۲۰ پتاسیم، ۱ سدیم، ۶/۱ گوگرد، ۱۲/۳ منیزیوم، ۱ کلر، ۰/۱۲ میلی‌گرم مس، ویتامین A ۲۷۰۰-۳۰۰۰ واحد، ویتامینB1 ۱۰ میکروگرم، ویتامین B2 ۰/۰۵ میکروگرم، اسید فولیک ۳ میکروگرم، اسید پانتونیک ۰/۳ میلی‌گرم، ویتامین C ۱۵ میلی‌گرم می‌باشد (سلطانی، ۱۳۸۷).

هسته زردآلو نیز مانند دیگر مغزها، دارای پروتئین و چربی بالایی است. مغز دانه حاوی ۴۱ درصد روغن، ویتامین‌های A، B1، B2، C، آسپاراژین، آلورون، قندهای مختلف، اسید یانگامیک یا ویتامین B15 و دانه‌های تلخ ۰/۶-۰/۸آمیگدالین دارد. برگ زردآلو نیز دارای آمیگدالین است؛ مصرف روزانه آن، برای پیشگیری و معالجه انواع سرطان توصیه می‌شود (سلطانی، ۱۳۸۷).

زردآلو دارای مقادیر زیادی قند طبیعی است که راحت هضم می‌شوند. این میوه به‌صورت خشک شده نیز استفاده می‌شود که در این حالت مقدار کالری موجود در آن چند برابر افزایش پیدا می‌کند. زردآلو دارای ترکیبات آنتی‌اکسیدانی بوده و کاهنده روند اکسیداسیون در چربی‌های بدن می‌شود. همچنین در تحقیقات عصاره این میوه دارای خواص ضدمیکروبی بوده است. وجود بتاکاروتن به عنوان پیش ماده ویتامین A و لیکوپن در این میوه طلایی، از اکسیده شدن کلسترول LDL خون جلوگیری می‌کند که این مورد به نوبه خود، از بروز بیماری‌های قلبی پیشگیری می‌کند. زردآلوهایی که رنگ نارنجی تیره دارند، حاوی بتاکاروتن بیشتری هستند. زردآلو حاوی فیبرهای محلول در آب است.

۱- Vitamin A

مطالعات نشان می‌دهد مصرف فیبرهای محلول باعث حفظ قند خون به مقدار طبیعی و کاهش کلسترول می‌شود (Yigit *et al.*, 2009).

فواید سلامتی:

سالیان سال است که از میوه، بخش درونی هسته و گل‌های زردآلو به عنوان دارو برای درمان بسیاری از بیماری‌ها استفاده می‌شود.

رفع کم خونی:

زردآلو، به‌علت داشتن مقدار فراوان آهن، می‌تواند ماده غذایی بسیار خوب برای افرادی باشد که دارای فقر آهن هستند. مصرف زیاد این میوه، تولید هموگلوبین خون را افزایش می‌دهد.

تقویت دید:

وجود مقدار زیاد ویتامین A در این میوه، به‌خصوص میوه خشک آن باعث تقویت دید شده و کمبود آن در بدن ممکن است به ضعف بینایی و شبکوری منجر شود. ویتامین A که یک آنتی‌اکسیدان قوی است، از آسیب رساندن رادیکال‌های آزاد به سلول‌ها و بافت‌های بدن جلوگیری می‌کند. رادیکال‌های آزاد، عدسی چشم را تخریب می‌کنند و باعث بروز آب مروارید می‌شوند یا این‌که ذخیره‌ی خونی چشم‌ها را از بین برده و باعث تخریب بافت چشم می‌شوند (Armeniacae, 2007).

برگه زردآلو سرشار از پتاسیم است. مصرف مواد غنی از پتاسیم باعث تنظیم فشارخون می‌شود. زردآلوی رسیده به‌علت دارا بودن ویتامین‌های گروه B برای درمان بیماری‌های عصبی و روحی، بی‌خوابی، خستگی شدید، گیجی، فراموشی و غیره مفید است.

زردآلو در درمان سردرد و دردهای مفصلی مورد استفاده طب‌های سنتی جهان است و همچنین روغن دانه زردآلو در التهاب و وزوزگوش و مشکلات پوستی کارایی داشته است. همچنین مصرف خوراکی میوه زردآلو در کاهش علایم بیماران مبتلا به یبوست مؤثر است (Armeniacae, 2007).

مصرف زیاد این میوه به خاطر داشتن مقدار کمی اگزالات، برای کسانی که سابقه سنگ کلیه دارند و کلیه آن‌ها سنگ ساز است، توصیه نمی‌شود.

۱-۵- گیاه‌شناسی

زردآلو با اسم علمی *Prunus armeniaca* بومی چین و سیبری، متعلق به خانواده رزاسه[۱]، زیر خانواده پرونوایده[۲]، جنس پرونوس[۳] می‌باشد. همه‌ی گونه‌های زردآلو دیپلوئید با هشت جفت کروموزوم هستند (۲n=۱۶) (رسول‌زادگان، ۱۳۷۵).

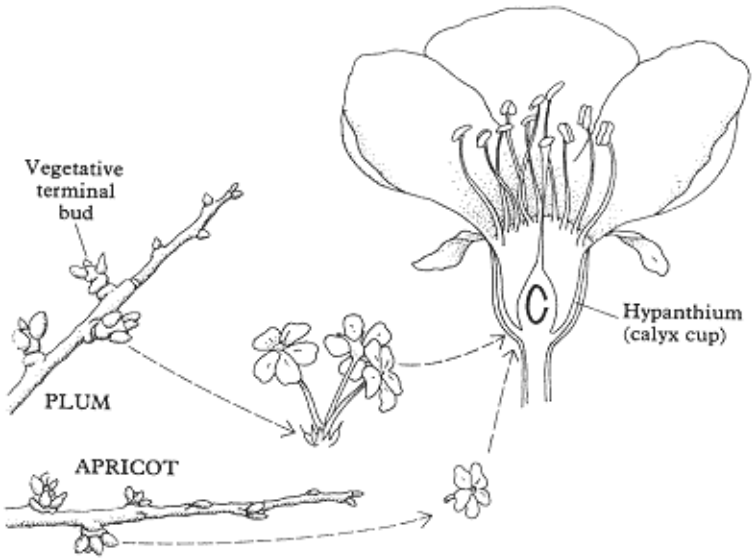
سیستم طبقه‌بندی بسته به تعداد گونه‌های زردآلو بین ۳ تا ۱۲ می‌باشد. شش گونه‌ی زردآلو به‌طور مجزا شناسایی شده و سه تای آن‌ها ظاهرا منشا هیبرید دارند. اکثر رقم‌های زردآلو که برای مصارف میوه‌دهی رشد می‌کنند متعلق به گونه‌ی *P.armeniaca* می‌باشند (رسول‌زادگان، ۱۳۷۵).

واویلو[۴] زردآلو را در سه نقطه اصلی قرار داده است: مرکز چین (مرکزی و غرب چین)، آسیای مرکزی (افغانستان، شمال غربی هند و پاکستان، کشمیر، تاجیکستان، ازبکستان، استان زینجینگ[۵] در چین و غرب تین-شاین[۶]) و مرکز خاور- نزدیک (داخل آسیای صغیر). کاستینا[۷] در ادامه زردآلوی کشت شده را برای سازگاری با منطقه جغرافیایی به چهار گروه اصلی تقسیم کرده است: ۱. گروه آسیای مرکزی ۲. گروه قفقازی- ایران ۳. گروه اروپایی ۴. گروه دژونگار-زایلیج[۸]. تعداد زیادی از کولتیوارهای محلی در نواحی مختلف و کشورهای تولید کننده رشد می‌کنند (Zhebentyayeva *et al.*, 2012).

ارتفاع درخت زردآلو به ۵ متر می‌رسد. این درخت دارای برگ خزان کننده به شکل قلب، نوک تیز و به رنگ سبز روشن مایل به زرد می‌باشد و جوانه‌های زردآلو نسبت به جوانه‌های سایر دانه‌دارها کوچکتر است، برگ‌های انتهایی نیز به رنگ قرمز دیده می‌شوند که یک مشخصه برای شناسایی این درخت است. شکوفه درشت، تک گل و دارای دنباله دراز هستند و به رنگ سفید متمایل به قرمز

۱- Rosaceae
۲- Prunoideae
۳- Prunus
۴- Vavilou
۵- Xinjing
۶ -Tien-Shan
۷- Kostina
۸- Duzhungar-Zailij

است، این درخت دارای گل‌های هرمافرودیت است (شکل ۱-۳). میوه آن گوشتی و زرد رنگ، با طعمی مطبوع و شیرین بوده و در اواسط تابستان می‌رسد به همین دلیل به آن طلای تابستان نیز می‌گویند، لازم به ذکر است که میوه درخت زردآلو بیشتر روی شاخه‌های یک ساله قوی دیده می‌شود. هسته زردآلو صاف قهوه‌ای و بیضی شکل است. در داخل هسته مغز آن قرار دارد که طعم آن گاهی شیرین و گاهی تلخ می‌باشد و دارای ۴۰ درصد روغن، مقداری پروتئین، قند و ویتامین می‌باشد (سیاری، ۱۳۸۳).



شکل ۱-۳ جوانه و گل باز شده زردآلو (رسول زادگان، ۱۳۷۵)

۱-۶- برنامه‌های اصلاحی

برنامه‌های اصلاحی در کشورهای مختلف جهان بیشتر بر بهبود سازگاری به عوامل محیطی (نیازهای دمایی- کمبود آب)، گسترش فصل برداشت، افزایش کیفیت میوه برای مصرف تازه خوری، باروری، اندازه مناسب درخت و مقاومت به استرس‌های زنده (مقاومت به بیماری شارک به‌وسیله ویروس آبله آلو، قهوه‌ای شدن ریشه به‌وسیله *Manilinia* spp.، بیماری‌های باکتریایی به‌وسیله *Pseudomonas* spp.، *Xanthomonas* arboricda pv. Pruni (smith) Chlorotic Leaf Roll و سندرم تاخیردار در زردآلو) تاکید دارند. از بین این بیماری‌ها، ویروس آبله آلو مهم‌ترین فاکتور محدود کننده کشت زردآلو در اروپا است. در اروپا بیشتر بر روی رقم های مقاوم به

ویروس آبله آلو سرمایه‌گذاری شده است. مارکرهای مولکولی در زردآلو توسعه یافته و در اصل برای مطالعه‌ی ساختمان نقشه‌ها و تنوع ژنتیکی به‌کار رفته است (Zhebentyayeva *et al*., 2012).

زردآلو با وجود صفات مثبت زیادی که دارد مثل بو و مزه خوب چندین نقطه ضعف دارد، در مقایسه با دیگر میوه‌های تابستانه، زردآلو به بیماری حساس‌تر است. درخت زردآلو به زخم بسیار حساس است به‌طوری که در صورت ایجاد کوچکترین زخم، مورد حمله آفات قرار می‌گیرد. اگر چنانچه پوسته به‌راحتی جدا شود یا اینکه تنه حالت پوکی داشته باشد درخت بیمار است. بیماری لکه غربالی درختان میوه نه تنها باعث ضعف درخت و کاهش مقدار و ارزش محصول می‌شود بلکه به‌دلیل لکه‌ها و زگیل‌هایی که روی میوه به‌جای می‌گذارد ارزش صادراتی برگه و قیسی حاصله از میوه‌های آلوده را نیز به نحو بارزی پایین می‌آورد. در ایران تاکنون این بیماری روی درختان زردآلو، گیلاس، آلبالو، گوجه، هلو، شلیل و بادام دیده شده است و خسارت عمده آن بیشتر متوجه درختان زردآلو می‌باشد. علائم این بیماری در سرشاخه، گل، برگ، میوه و جوانه‌های درختان دیده می‌شود؛ منتهی اندام‌های مورد حمله و علائم آن‌ها روی میزبان‌های مختلف با هم فرق دارند. بدین معنی که در زردآلو میوه، برگ و جوانه‌ها مورد حمله قرار می‌گیرند ولی علائم روی سرشاخه‌ها دیده نمی‌شود (اشکان، ۱۳۸۲).

بر مبنای فرآیندهای اصلاحی، مشخصات مورفولوژی و اکولوژی ارقام زردآلو به طور معمول در دو گروه طبقه بندی شده است، ارقام اروپایی و نوع شرقی (Asanuma and Shibamoto, 1968). ارقام شرقی در نواحی سرد و مرطوب کشت می‌شوند، در حالی که ارقام اروپایی در نواحی گرم و خشک کشت می‌شوند. ارقام شرقی خسارات ناشی از بیماری و باران را بیش از ارقام اروپایی تحمل می‌کنند. اما آن‌ها به ارقام اروپایی محدود شده است، اطلاعاتی در مورد ریزازدیادی ارقام شرقی زردآلو وجود ندارد؛ از طرفی تمایل به ریزازدیادی زردآلو به‌دلیل سخت ریشه‌زا بودن این درختان است (فرشاد فر و بخشی خانیکی، ۱۳۸۹).

۱-۷- احتیاجات آب و هوایی

زردآلو از لحاظ احتیاجات آب و هوایی شبیه هلو بوده و از درختان مناطق معتدل گرم به‌شمار می‌آید و سرمای شدید زمستان را نمی‌تواند تحمل کند. این درخت در هوای معتدل گرم بهتر از نقاط دیگر رشد می‌کند در نقاط سرد باید آن را در مقابل آفتاب کاشت. در زمین‌های قابل نفوذ و گرم، بهتر از زمین‌های رسی و مرطوب رشد کرده و محصول می‌دهد. درخت زردآلو در سال‌های اول رشد و به‌خصوص در فصل رشد به آبیاری فراوان نیاز دارند.

نیاز سرمایی زردآلو، کمتر از هلو بوده و برای خاتمه استراحت جوانه‌ها به ۳۰۰-۹۰۰ ساعت دمای زیر هفت درجه سانتی‌گراد نیاز دارد. زمستان‌های نسبتاً سرد و تابستان‌های گرم و خشک برای رشد و باروری زردآلو مناسب است. مقاومت زردآلو به سرمای زمستانه در حدود ۲۵- درجه سانتی‌گراد می‌باشد. گل‌های زردآلو همانند هلو قبل از برگ‌ها ظاهر می‌شوند. اما در مناطقی که زمستان‌های گرم دارند، جوانه‌های زردآلو در معرض ریزش قرار می‌گیرند. گل‌های باز شده زردآلو نسبت به سرمای دیررس بهاره حساس بوده و باید در مناطقی که خطر سرمای دیررس بهاره وجود ندارد، اقدام به کشت این درخت نمود. زیرا زردآلو زودتر از درختان میوه دیگر گل‌های خود را باز می‌کند. گرده افشانی زردآلو توسط حشرات انجام می‌گیرد (جلیلی مرندی، ۱۳۸۷).

۱-۸- کشت بافت

کشت سلول، بافت و اندام گیاهی در محیط کشت مناسب در شرایط درون‌شیشه‌ای و عاری از هر گونه میکروارگانیسم را کشت بافت گویند.

انواع کشت بافت گیاهی شامل کشت جنین، کشت پروتوپلاست، کشت سوسپانسیون سلولی، کشت مریستم، کشت اندام (نوک شاخه، ریشه، برگ و...)، کشت کالوس (فارسی و ذوالعلی، ۱۳۹۰).

یکی از کاربردهای کشت بافت تکثیر رویشی (ریزازدیادی) می‌باشد که در ادامه بیشتر توضیح می‌دهیم.

۱-۹- ریزازدیادی

تکثیر کلون در شرایط این ویترو[۱] را ریزازدیادی می‌نامند. کلون عبارتست از ازدیاد افرادی با محتوی ژنتیکی یکسان با استفاده از تکثیر غیرجنسی. مزیت مهم استفاده از روش‌های تکثیر کلون در شرایط استریل (ریزازدیادی)، تکثیر جوانه جانبی تعداد ساقه را در هر دوره یک ماهه کشت به‌طور متوسط تا ۱۰ برابر افزایش می‌دهد و در یک دوره شش ماهه امکان تولید بیش از یک میلیون گیاه از یک ریزنمونه وجود دارد. برای تکثیر گیاهان به‌وسیله اندام نابجا یا تشکیل جنین لازم است قدرت باززایی داشته باشند. قدرت باززایی به‌وسیله ژنوتیپ، شرایط محیطی (مواد غذایی، تنظیم کننده رشد، شرایط فیزیکی) و مرحله نموی گیاه مشخص می‌شود. (فارسی و ذوالعلی، ۱۳۹۰).

مراحل اصلی فرایند ریزازدیادی از نظر موراشیک در سال ۱۹۷۴ به شرح زیر می‌باشد (Murashinge, 1974):

۱. انتخاب ریزنمونه مناسب، استریلیزاسیون و انتقال به محیط کشت
۲. تکثیر ساقه از ریزنمونه موجود در محیط کشت
۳. انتقال به محیط ریشه‌دهی و سپس انتقال به خاک

۱-۱۰- مشکلات ریزازدیادی گیاهان چوبی نسبت به علفی

از جمله مشکلات کشت بافت درختان چوبی می‌توان به موارد ذیل اشاره کرد:

۱. گونه‌های چوبی در مقایسه با گونه‌های علفی قدرت باززایی کمتری دارند.
۲. سرعت تکثیر گونه‌های چوبی خیلی کمتر از گونه‌های علفی است.
۳. در مورد درختان خواب نقش عمده‌ای دارد (جوانه‌ها باز نشده و رشد طولی رخ نمی‌دهد).
۴. ضدعفونی نمونه‌ها در گونه‌های چوبی که معمولا در محیط آزاد رشد کرده‌اند مشکل‌تر است.
۵. تنوع ژنتیکی در درختان بیشتر از گیاهان زراعی است و این تنوع منجر به نتایج متغیر می‌شود.

۱- In vitro

(; ; Kunneman-Kooij, 1984 Bonga and Durzan, 1982Pierik, 1975)

۱-۱۱- فواید تکثیر کلون در شرایط درون‌شیشه‌ای

۱. سرعت تکثیر در شرایط درون‌شیشه‌ای بیشتر است.

۲. بعضی از گونه‌ها که در *In vivo* تکثیر نمی‌شوند، تکثیرشان از طریق کشت *In vitro* امکان پذیر است.

۳. تولید گیاهان عاری از بیماری در شرایط درون‌شیشه‌ای امکان پذیر است.

۴. تکثیر رویشی به این روش موجب صرفه‌جویی در هزینه‌های سوخت، فضای گلخانه و... می‌شود.

۵. با توجه به شرایط مناسب (محیط کشت، شرایط فیزیکی) امکان تولید در تمام سال وجود دارد.

(Kunneman-Kooij, 1984 **; ;** Pierik, 1975Gebhardt, 1983)

۱-۱۲- نقش تنظیم کننده‌های رشد گیاهی در کشت بافت گیاهی

اکسین در رشد طولی سلول، تقسیم سلولی (در تشکیل کالوس نقش دارد)، تشکیل ریشه نابجا، ممانعت از تشکیل شاخه‌های نابجا و جانبی نقش دارد.

در غلظت‌های کم اکسین تشکیل ریشه‌های نابجا رخ می‌دهد اما درغلظت زیاد منجر به تشکیل کالوس می‌شود.

سایتوکنین اغلب برای تحریک رشد و نمو به‌کار می‌رود. این تنظیم کننده رشد گیاهی به همراه اکسین تقسیم سلولی را تحریک می‌کند. در غلظت‌های بالا از طریق کم کردن چیرگی انتهایی منجر به تولید ساقه نابجا نیز می‌شود.

جیبرلین در تحریک رشد طولی میان‌گره و رشد مریستم یا جوانه‌ها نقش دارد. باعث شکستن خواب جنین‌های ایزوله شده و بذر نیز می‌شود (باقری، ۱۳۷۶).

۱-۱۳- ذغال فعال

ذغال فعال از سوختن چوب در حرارت بالا و در حضور بخار تولید می‌شود.

نکات مهم مربوط به ذغال فعال عبارتند از:

۱. جذب پیگمان‌های فنولی، سمی قهوه‌ای و یا سیاه و سایر ترکیبات ناشناخته غیر رنگی.

۲. جذب ترکیبات آلی (اکسین، سایتوکنین، اتیلن، ویتامین و...) توسط ذغال فعال صورت می‌گیرد. جانسون در سال ۱۹۸۳ اظهار داشت ذغال فعال ABA را جذب می‌کند (Johansson, 1983).

۳. تغییرات نوری محیط می‌تواند تشکیل ریشه را تحت تاثیر قرار دهد.

۱-۱۴- اهمیت ریزازدیادی زردآلو

ریزازدیادی به‌صورت تجاری برای محصولات خشکبار و میوه‌ها از سال ۱۹۷۰ به‌کار برده شده است. اولین بار برای محصولات ریزمیوه مثل توت‌فرنگی و تمشک و برای پایه‌های چندین گونه‌ی درختان میوه مخصوصاً هلو استفاده شده است (Zimmerman and Debergh, 1991). اطلاعات در مورد کشت درون‌شیشه‌ای زردآلو در مقایسه با سایر گونه‌های خویشاوند بسیار نادر است. از آنجایی که قلمه زردآلو به سختی ریشه می‌دهد و معمولاً ارقام زردآلو با پیوند بر روی دانهال بذری زردآلو تکثیر می‌شوند (Reighard *et al.*, 1990). ریزازدیادی به روش‌های درون شیشه‌ای در این گونه اهمیت زیادی دارد چرا که رشد زردآلوها روی ریشه‌های خودشان منطقی‌تر به نظر می‌رسد (Hartmann and Kester, 1975). ثابت شده است که درختان میوه پرورش یافته روی ریشه خودشان جذب مواد تغذیه‌ای بهتر و تولید بالاتری دارند (Thibault and Herman, 1982). در بیشتر محصولات تجاری درختان میوه ریزازدیادی پایه‌ها بسیار مورد توجه قرار گرفته است. در زردآلو اگرچه پیوند روی پایه‌های بذری عمومیت بیشتری یافته و ریشه‌دار کردن قلمه‌ها محدودیت‌هایی دارد، ولی مشکلات و بی‌ثباتی در ریشه‌زایی زردآلو مانع اصلی کاربرد ریزازدیادی به‌صورت تجاری است.

بیشتر گونه‌های زردآلو که از بذر به‌دست می‌آیند هتروزیگوت هستند. بنابراین استقرار موثر پروتکل برای ریزازدیادی زردآلو با ریزنمونه‌های گرفته شده از درختان بالغ اهمیت دارد. بنابراین ریزازدیادی از طریق کلونی‌های برگزیده یک پیشنهاد برای حل مشکل تکثیر انواع زردآلو است. تعداد زیادی مطالعات روی ریزازدیادی زردآلو با استفاده از دانهال‌های جوان، نونهال یا درختان بالغ به‌دست آمده است (Kramarenko, 1999; Schmidt and Ketzel, 1996; Mante *et al.*, 1989Snir, 1984 ; ; ; Perez-Tornero *et al.*, 2000b; Pérez-Tornero *et al.*, 2000aHokanson and Pooler, 2000 ; Paris *et* ; Burgos and Alburquerque, 2003; Gentile *et al.*, 2002Balla and Vertesy, 2001 ; Georgios and Miltiadis, 2006; ; Srinivasan *et al.*, 2005Petri *et al.*, 2005 ;*al.*, 2004 .(Yıldırım, 2006

۱-۱۵- مشکلات ریزازدیادی زردآلو

آلودگی شاخه‌های زردآلو یک مشکل جدی در کشت بافت است. در حالی که پاتوژن‌ها برای درختان مادری کم اهمیت هستند؛ می‌تواند زمانی‌که به کشت درون‌شیشه‌ای منتقل می‌شود باعث اثرات منفی روی گیاه شود (Campbell, 1985؛ Cassells, 2001). بنابراین ضدعفونی موثر شاخه‌ها و کشت درون‌شیشه‌ای از طریق کاربرد آنتی‌بیوتیک برای جلوگیری از رشد و تکثیر باکتری‌ها جز اهداف اصلی مهم هستند.

درختان در فضای باز برای دوره‌های طولانی رشد می‌کنند و اندام‌هایش به‌طور مکرر به‌وسیله میکروارگانیسم‌های مختلف بیرونی و درونی آلوده می‌شود (Campbell, 1985). بیشتر ارگانسیم‌هایی که با آن مواجه شدیم اهمیت ویژه‌ای در درون گیاهان ندارند، اما نتیجه آلودگی زمانی‌که، به‌صورت درون‌شیشه‌ای کشت شده دیده می‌شود، چون باکتری‌ها و اسپور قارچ‌ها روی محیط کشت غنی به سرعت رشد می‌کنند. اولین مرحله در آماده‌سازی گیاه برای کشت بافت، حذف میکروارگانیسم‌ها می‌باشد. کشت مریستم اغلب برای این اهداف بخاطر این‌که بیشتر ارگانیسم‌ها حذف می‌شوند مفید است (Cassells, 1991). بسته به اندازه مریستم، ویروس‌ها همچنین می‌توانند حذف شوند. بنابراین، آن‌ها اغلب به عنوان ریزنمونه‌های اولیه به مقدار زیادی در ریزازدیادی استفاده شده است.

از جمله مشکلات دیگر ریزازدیادی زردآلو می‌توان به شیشه‌ای شدن ریزنمونه‌ها در محیط کشت اشاره نمود. برای رفع این مشکل پیشنهاداتی ارائه شده است. از جمله شرایط ویژه کشت درون‌شیشه‌ای که منجر به شیشه‌ای شدن می‌شود: رطوبت بالا، مقدار بالای تنظیم کننده‌های رشد و نور با غلظت کم مواد غذایی است (Gaspar *et al.*, 1987). بر طبق نظریه دیبرگ[1] ۱۹۸۷ رابطه رطوبت نسبی و پتانسیل آب، فاکتورهای کلیدی درگیر با شیشه‌ای شدن هستند (Debergh, 1987). افزایش غلظت آگار یا عامل ژل‌کننده دیگر، روی دسترسی به آب و ترکیبات مختلف محیط کشت، مخصوصاً سایتوکنین‌ها اثر می‌گذارد (Debergh, 1983). افزایش غلظت آگار شیشه‌ای شدن را در هیبرید هلو و بادام (Martinelli, 1985) و در بادام (Rugini and Verma, 1982) کاهش می‌دهد، همچنین آگار باعث کاهش سرعت تکثیر نیز می‌شود (Ghashghaie *et al.*, 1991). بر طبق نظریه واندراسکاج و دیبرگ[2] ۱۹۸۱، کاهش رطوبت نسبی می‌تواند به‌وسیله قرار گرفتن محیط‌های کشت روی محیط سرد شده انجام شود، آب به‌صورت بخار روی محیط آگار کندانسه شود و این اجازه را می‌دهد که شیشه‌ای شدن کنترل شود (Vanderschaeghe and Debergh, 1987). نتایج مشابه با کار کردن روی *prunus tenella* به‌دست آمده است (Bouza *et al.*, 1992). کاهش رطوبت نسبی، شیشه‌ای شدن را در ادامه برطرف می‌کند اما به‌تدریج سرعت تکثیر کاهش می‌یابد.

مشکل دیگر گیاهان، قهوه‌ای شدن ریزنمونه‌ها در حین کشت درون‌شیشه‌ای است که در مقایسه با گیاهان علفی قهوه‌ای شدن در گیاهان چوبی بیشتر دیده می‌شود (Bagheri *et al.*, 2004)، قهوه‌ای شدن بافت‌های گیاهی اغلب به دنبال صدمه دیدن آن‌ها ایجاد می‌گردد و عموماً نتیجه آن نیز از بین رفتن نمونه مورد کشت می‌باشد. به طورکلی قهوه‌ای شدن در گیاهان به‌وسیله آنزیم پلی فنل اکسیداز (PPO) صورت می‌گیرد (Marks and Simpson, 1990)؛ (Vaughn and Duke, 1984). پیش ماده فنولی این آنزیم در واکوئل‌های سلول‌های گیاهی ذخیره می‌شود و بدین وسیله حضور جداگانه این مواد در واکوئل‌ها از واکنش قهوه‌ای شدن جلوگیری می‌نمایند، درصورت ورود آسیب به سلول‌های

۱- Debergh

۲- Vanderschaege and Debergh

گیاهی این آنزیم و پیش ماده آن با هم مخلوط می‌گردند و قهوه‌ای شدن در بافت رخ می‌دهد. اگر میزان این آنزیم کاهش یابد، از میزان قهوه‌ای شدن بافت‌های گیاهی نیز کاسته می‌شود. جهت جلوگیری از چنین پدیده‌ای می‌توان از آنتی‌اکسیدانت‌هایی مانند اسید آسکوربیک، اسید سیتریک استفاده نمود (Huang *et al*., 2002).

تیره شدن محیط کشت و از بین رفتن ریز نمونه‌ها که در بعضی از گونه‌ها از جمله گلابی وجود دارد، به علت آزاد شدن ترکیب‌های فنولی از بافت‌های آسیب دیده می‌باشد که پس از اکسیده شدن توسط آنزیم پلی فنول اکسیداز (PPO) موجب رنگی شدن ریز نمونه‌ها و محیط کشت می‌شوند. تعدادی از ریزنمونه‌ها مقداری مواد فنولیک در خود دارند و یا در اثر برش یک سری مواد متابولیک ثانویه در آن‌ها تولید می‌گردد که بعداً اکسید شده و منجر به قهوه‌ای شدن محیط کشت و مرگ ریز نمونه می‌گردد (Aliyu 2005). استفاده از آنتی‌اکسیدانت‌ها مانند اسید آسکوربیک، اسید سیتریک و مواد جاذب مانند ذغال فعال از متداول‌ترین روش‌هایی هستند که برای حل این مشکل استفاده می‌شوند، اما با پرورش گیاه مادری در شرایط مطلوب، بهتر می‌توان قهوه‌ای شدن ریزنمونه‌ها را برطرف نمود (Mayer and Harel, 1979). نور و گرما از عوامل تحریک کننده‌ی فعالیت آنزیم پلی فنول اکسیداز هستند، بنابراین قرار دادن ریزنمونه‌ها در دمای پایین و تاریکی می‌تواند یکی از راه کارهای مناسب باشد (Block and Lankes, 1996) . موفقیت در کشت بافت در درختان میوه خصوصاً گلابی، به‌طور وسیعی با میزان قهوه‌ای شدن بافت‌ها مرتبط است. ارقام گلابی آسیایی بیشتر از ارقام اروپایی در معرض قهوه‌ای شدن هستند، همچنین قهوه‌ای شدن در تابستان بیشتر رخ می‌دهد (Kumar and Zhang, 2008).

فصل دوم:

مروری بر منابع

۲- فصل دوم: مروری بر منابع

کشت و کار زردآلو در برخی از کشورها اهمیت ویژه‌ای دارد، در یونان ببکو[۱] مهم‌ترین رقم زردآلوی *P.armeniaca L* کشت شده می‌باشد. مشکل اصلی این واریته حساسیت به ویروس آبله آلو است[۲] که منجر به کاهش کشت و کار آن در طول سال‌های اخیر شده است. کشت بافت یک روش مطمئن برای تولید انبوه و سالم گیاه در تعداد زیادی از گونه‌های درختان میوه است، درحالی‌که پیوند زدن به عنوان روش مرسوم تکثیر، به‌خاطر انتقال ویروس خیلی خطرناک است. به‌هرحال اطلاعات مربوط به تکثیر درون‌شیشه‌ای زردآلو در مقایسه با دیگر گونه‌های پرونوس محدود است و شرایط بهینه برای پرآوری بستگی به قدرت ژنوتیپ دارد (Pérez-Tornero and Burgos, 2000). از آن‌جایی که در چندین نمونه کاهش ظرفیت برای تولید شاخه‌های جانبی مشاهده شد (Skirvin *et al.*, 1979)؛ (Snir, 1984)؛ (Kataeva and Kramarenko, 1989). برای تکثیر سریع شاخه به روش ریزازدیادی در مرحله استقرار داشتن پروتکل مناسب توصیه می‌شود، در این راستا بنزیل آدنین برای القای شاخه‌دهی به‌وسیله مورای و همکاران در سال ۱۹۹۷ استفاده شده است. نتایج نشان داد که بنزیل آدنین موثرترین سایتوکنین برای پرآوری شاخه‌های زردآلو است.

جورجیوس کوبوریس و همکاران در سال ۲۰۰۶ بر روی اصلاح تکثیر درون‌شیشه‌ای زردآلو رقم ببکو مطالعه کردند. فاکتورهای موثر موفق در استقرار درون‌شیشه‌ای، سرعت پرآوری و ریشه‌دهی رقم زردآلوی ببکو مورد مطالعه قرار گرفت. برای ضدعفونی از اتانول و هیپوکلرید سدیم[۳] استفاده شد و سپس از تیمارهای سرمادهی، تنظیم کننده‌های رشد گیاهی بنزیل آدنین، ایندول استیک اسید، جیبرلین، آنتی‌بیوتیک در کشت زردآلو به‌کار برده شد. بیشترین تعداد ریزنمونه‌ها (ریزشاخه‌های جدید) ۱۸/۷ در محیط غنی شده با ۲/۲ میکرومول بنزیل آدنین به‌علاوه ۰/۵۷ میکرومول ایندول استیک اسید بعد از ۳۰۰ ساعت سرمادهی به‌دست آمد. جیبرلین به مقدار ۱۱/۴ میکرومول اثر مثبت

۱- Bebecou
۲- Plum Pox (ppv)
۳- NaClO

روی پرآوری شاخه همراه با ۴/۴ یا ۸/۹ میکرومول بنزیل آدنین داشت. بالاترین طول شاخه و کارایی به ترتیب در ۲/۲ میکرومول بنزیل آدنین، ۱۱/۴ جیبرلین و ۰/۵۷ ایندول استیک اسید و در ۲/۲ میکرومول بنزیل آدنین به‌علاوه ۰/۵۷ ایندول استیک اسید به‌دست آمد. آنتی‌بیوتیک نئوسفتامی[۱] کمترین اثر را روی رشد شاخه دارد، زمانی‌که کمترین غلظت ۲۵۰ میلی‌گرم در لیتر مورد استفاده قرار گرفت. واکشت هر دو هفته یکبار در محیط حاوی ۲/۲ میکرومول بنزیل آدنین و ۰/۵۷ میکرومول ایندول استیک اسید برای القای شاخه‌دهی صورت می‌گیرد. بیشترین تعداد ریشه‌ها به شاخه (۱:۸) در ۱۹/۶ میکرومول ایندول بوتریک اسید گزارش شد (Georgios and Miltiadis, 2006).

پرز تورنر و همکاران[۲] (۲۰۰۰a) باززایی شاخه‌های نابجا زردآلو در محیط کشت درون‌شیشه‌ای را مورد بررسی قرار دادند. باززایی نابجا یک مرحله کلیدی و کاربردی در تکنیک مهندسی ژنتیک در اصلاح گیاهان است. درختان میوه در تولید شاخه‌های نابجا بسیار متمرد (سرکش) هستند. گزارشات در مورد باززایی شاخه‌های نابجا در محیط درون‌شیشه‌ای از ریزنمونه‌های بالغ پرونوس کم است. در زردآلو باززایی شاخه از طریق القای جوانه نابجا از طریق ریزنمونه یا آندوسپرم به‌طور مکرر انجام می‌گیرد، اما به‌دلیل هتروزیگوتی بالای زردآلو نباید از پایه‌های بذری برای تولید شاخه نابجا استفاده کرد. با توجه به نتایج حاصله، به‌طور نسبی بالاترین درصد باززایی شاخه نابجا به‌طور ثابت از برگ‌های برخی ارقام زردآلو به‌دست آمده است. مثلاً در رقم هلنا[۳]، ریزنمونه‌ها در محیط تکثیر نسبت به محیط طویل شدن فعال‌ترند. بهترین نتایج با TDZ (تیدیازورن) به‌دست آمده است. زمانی که BAP (۶-بنزیل آمینو پیورین) به‌جای TDZ استفاده شد درصد باززایی خیلی پایین آمد. غلظت بالای نفتالین استیک اسید (NAA) یک اثر مهم روی کاهش ترشح مواد فنولیکی دارد. توسعه برگ‌های جوانی که به مدت دو یا سه هفته در تاریکی نگه داشته شده، بهترین نتیجه حاصل گردید (Pérez-Tornero *et al.*, 2000a).

۱- Na-cefotaime

۲- Olaya Pérez-Tornero

۳- Helena

پرز تونر و لورنزو بورگاس[1] (۲۰۰۰) نیازهای مختلف محیط کشت برای ریزازدیادی ارقام زردآلو را مورد مطالعه قرار دادند. فاکتورهای موثر در ازدیاد درون‌شیشه‌ای چندین رقم زردآلو بررسی شد. آن‌ها نشان دادند که اثر مواد مغذی محیط و غلظت بنزیل آدنین بستگی به قدرت ژنوتیپ دارد. در این بررسی از محیط کشت پایه مختلف شامل: WPM، MS و عناصر ماکرو Q&L، عناصر ماکرو MS با NH_4NO_3 به مقدار ۴۰۰ میلی‌گرم در لیتر (M1)، دو برابر غلظت عناصر WPM بدون (K_2SO_4) M2 و حاوی (KNO_3) M3 استفاده شد (Perez-Tornero *et al.*, 1999). به همه محیط‌های کشت، عناصر میکرو، ویتامین، ساکارز، آگار و تنظیم کننده‌های رشد اضافه گردید. به‌طور کلی بهترین نتایج با محیط QL 1977 و تغییر عناصر ماکرو WPM 1981 مشاهده شد. بهترین غلظت بنزیل آدنین با توجه به ژنوتیپ‌های مختلف برای پرآوری شاخه‌ها بین ۱/۷۸-۳/۱۱ میکرومول متفاوت بود. شاخه‌های زردآلو با غلظت‌های مختلف ایندول بوتریک اسید به‌خوبی ریشه‌دار شدند اما بیشتر شاخه‌ها علائم بیماری نکروزه انتهایی را نشان دادند که به‌وسیله فرو بردن نوک‌های شاخه در محلول غلیظ بنزیل آدنین ۲۲/۲ یا ۴۴/۴ میکرومول پیش از انتقال به محیط ریشه‌دهی برطرف شد (Pérez-Tornero and Burgos, 2000).

اسنیر[2] (۱۹۸۴) مشاهده کرد که محیط کشت MS کاملاً در پشتیبانی از رشد رویشی رقم کانینو[3] زردآلو ناموفق است؛ اما در محیط مخصوص گیاهان چوبی WPM (Lloyd and McCown 1980) درصد بالایی از جوانه‌ها (۷۰درصد) بر روی شاخه‌ها رشد کرده و طویل می‌شوند. ریشه‌زایی شاخه‌های رشد کرده در محیطی با نصف غلظت مواد MS به همراه ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر نفتالین اسید استیک (NAA) به خوبی صورت می‌گیرد (Snir, 1984).

۱- Olaya P´erez-Tornero & Lorenzo Burgos

۲- Snir

۳- Canino

مارینو[1] و همکاران (۱۹۹۳) میزان موفقیت ۷۰ درصدی گیاهچه‌های ریشه‌دار شده را با استفاده از محیط ریشه‌زایی MS به همراه ایندول بوتیریک اسید (IBA) گزارش کردند (Marino *et al.*, 1993). پدیده هیپرهیدروسیتی[2] (شیشه‌ای شدن) در محیط کشت‌های درون‌شیشه‌ای به عنوان یک مشکل دیگر در گونه‌های جنس پرونوس[3] گزارش شده است (Rugini and Verma, 1982)؛ (Ledbetter *et al.*, 1996b). کاهش دمای انتهای محیط کشت به مدت چندین هفته در طول مرحله پرآوری یک تیمار موثر در کاهش شیشه‌ای شدن در میان ژنوتیپ‌های ارقام زردآلو است. میزان شیشه‌ای شدن نمونه‌ها در ارقام خاص زردآلو تحت تاثیر نوع ماده ژل کننده محیط کشت نیز می‌باشد (Pérez-Tornero *et al.*, 2001). کارهایی که پیرزـتورنر و همکاران[4] (۲۰۰۰b و ۱۹۹۹) بر روی رقم زردآلو قدیمی اسپانیایی کانینو[5] انجام داده‌اند بیشتر برای شناسایی یک محیط کشت مناسب به منظور پشتیبانی از رشد سالم و افزایش پرآوری بوده است نتایج حاصل از این آزمایش نشان داد که کانینو در غلظت ۱/۷۸ میکرومول بنزیل آدنین بیشترین تعداد شاخه روی محیط M2 و M3 دارد (Pérez-Tornero and Burgos, 2000). در پژوهشی بر روی چهار رقم زردآلوی دیگر توسط این محققین انجام شد مشخص شد که بقای مریستم در محیط کشت به‌طور معنی‌داری تحت تأثیر رقم است و نیز اثرات متقابلی بین غلظت BA با رقم و بین اسید جیبرلیک (GA3) با BA وجود دارد. محیط کشت‌های فاقد BA در همه ارقام، برگ‌های روزت تولید نکردند و رشد شاخه‌های قابل استفاده به عنوان نمونه‌های گیاهی در این محیط کشت‌ها بیشتر بود (Perez-Tornero *et al.*, 1999).

گزارشاتی وجود دارد که نشان می‌دهد ظرفیت تکثیر از طریق شاخساره جانبی در زردآلو کم است یا اصلاً وجود ندارد (Skirvin *et al.*, 1979)؛ (Kataeva and Kramarenko, 1989). مثلاً مبنای اصلی ریزازدیادی رقم کانینو بر انتقال قطعات گره‌ای بریده شده از شاخه‌های طویل شده در طول

۱- Marino
۲- Hyperhydricity
۳- Prunus
۴- Peterz-Tornero
۵- Canino

واکشت قبلی به محیط کشت تازه است (Snir, 1984). مارینو[1] و همکاران ۱۹۹۳ تفاوت‌های سرعت رشدی در محیط درون‌شیشه‌ای را به‌ویژه در ارتباط با منابع مختلف کربنی مورد آزمایش قرار دادند. سوربیتول به عنوان منبع کربنی سرعت پرآوری را در هر دو رقم "Portici" و "San Castrese" همزمان با افزایش غلظت BA (۶-بنزیل آدنین) افزایش داد. سطوح بالای BA (۸/۸ میلی‌مول) در محیط پرآوری باعث بروز پدیده شیشه‌ای شدن در نمونه گیاهی می‌شود مخصوصاً هنگامی که ساکارز به عنوان منبع کربنی محیط باشد. با وجود این‌که سوربیتول سرعت پرآوری را در هر دو رقم افزایش می‌دهد ولی گزارشاتی مبنی بر درصد پایین ریشه‌زایی در هنگام استفاده از سوربیتول به عنوان منبع کربنی در محیط ریشه‌زایی وجود دارد.

ایسام[2] و همکاران (۱۹۹۶) (دانشگاه زاگازیچ - مصر) در مطالعه‌ای اثرات سه محیط کشت مختلف و تغییرات محیط کشت پایه را در دو رقم زردآلو مورد بررسی قرار داده‌اند. ریزنمونه‌ها از نوک شاخه و قلمه به همراه یک گره از کولتیوارهای زردآلوی ال-آمار[3]، هاماوی[4] از شاخه‌های که در مزرعه کشت شده، از درختان عاری از ویروس گرفته شده است. ریزنمونه‌ها در محیط کشت‌های MS، Nitsch&Nitsch، Anderson و محیط کشت MS اصلاح شده مورد ارزیابی قرار گرفتند. استفاده از آنتی‌اکسیدانت باعث کاهش نکروزه و کاهش میزان ترکیبات فنولیکی شد. محیط کشت MS اصلاح شده به‌علاوه سولفات آدنین بهترین محیط برای باززایی گیاهچه بود. تکثیر شاخه در غلظت‌های BAP ۲mg/l و TDZ ۱mg/l و همچنین محیط کشت نصف غلظت MS بهتر از بقیه بود. نتایج این پژوهش نشان داد که برای طویل شدن شاخه، ۱۶ ساعت نور هشت ساعت دوره تاریکی نیاز است و غلظت IBA ۲mg/l برای تحریک ریشه‌زایی مناسب است (Issam *et al.*, 1996).

1- Marino
۲- Isum
۳- El-Amar
۴- Hamawy

وانگ[1] و همکاران در سال ۲۰۱۱ در مطالعه‌ای باززایی شاخه نابجا از قطعات هیپوکوتیل بذرهای زردآلوی بالغ درصدهای ۳۱/۷، ۴۴/۴ و ۴۶/۹ درصد به‌ترتیب در رقم‌های مونیکیو، دورادا و کانینو[2] به‌دست آوردند. فاکتورهای دیگر مورد مطالعه (محیط کشت پایه، تنظیم کننده رشد گیاهی 2.4 D به‌علاوه دوره تاریکی یا تیوسولفانات نقره STS) به‌طور معنی‌داری روی درصد باززایی شاخه هیپوکوتیل رقم کانینو اثر گذاشتند . اثرات پارومایسین[3] روی باززایی هر کولتیوار بستگی به غلظت مصرفی و ژنوتیپ دارد. ۴۰ میکرومول پارومایسین به‌طور کامل بازدارنده باززایی کانینو[4]، برخی جوانه‌ها در ریزنمونه‌های دورادا[5] و مونیکو[6] است. دو تا آنتی‌بیوتیک پارومایسین و کانامایسین[7] اثرات سمی مختلفی روی کانینو نشان دادند. غلظت کمتر کانامایسین (۲۰ میکرومول) نسب به پارومایسین، بازدارنده باززایی نابجای ریزنمونه کانینو می‌باشد. کاربرد ۱۰ میکرومول پارومایسین موجب افزایش معنی‌داری هردو تعداد ریزنمونه و کالوس در مقایسه با ۱۰میکرومول کانامایسین شد. زمانی‌که ۱۰میکرومول پارومایسین به محیط کشت اضافه شد جوانه‌ها به‌خوبی باززا شدند (Wang *et al.*, 2011).

پرز تونر[8] و همکاران (۱۹۹۹) جنبه‌های مختلف معرفی و استقرار درون‌شیشه‌ای ارقام زردآلو از طریق کشت نوک مریستم بررسی کردند. بهترین زمان معرفی مریستم‌های کانینو زمانی که جوانه‌ها شروع به آماس می‌کنند. تنظیم کننده‌های رشد گیاهی مختلف در غلظت‌های مختلف برای چهار رقم، جیبرلین در سه غلظت ۰-۵/۸-۱۱/۴ ماکرومول و ایندول بوتریک اسید در ۰/۰۵ ماکرومول در ۱۲ تیمار مختلف ترکیب شده است. نتایج بسیار متفاوتی به‌دست آمده که بستگی به ژنوتیپ مجزای زردآلو مورد استفاده بود. تیمارها شامل بنزیل آدنین در چهار غلظت ۰-۲/۲-۴/۴-۸/۹ ماکرومول در

۱- Wang
۲- Canino, Dorada, Moniqui
۳- Paromomycin
۴- Canino
۵- Dorada
۶- Moniqui
۷- Kanamycin
۸- O. Pirez-tornero

لیتر بود. به‌طور کلی مریستم‌ها بدون بنزیل آدنین زنده نمی‌مانند. غلظت جیبرلین از دو تا چهار میلی‌گرم در لیتر (۵/۸-۱۱/۴ ماکرومول) محرک طویل شدن شاخه‌ها هستند. جیبرلین بقا مریستم‌ها را تضمین نمی‌کند اما طول شاخه‌ها را افزایش می‌دهد. در زردآلو طول شاخه به‌وسیله جیبرلین بین ۱۰ تا ۲۰ میلی‌متر افزایش می‌یابد که این موضوع برای گیاهان قبل از انتقال به محیط پرآوری اهمیت دارد (Perez-Tornero *et al.*, 1999).

پرز تونر[۱] و همکاران (۲۰۰۱) اثر فاکتورهای مختلف کنترل و برگشت‌پذیری شیشه‌ای شدن در طول کشت درون‌شیشه‌ای *Prunus armeniaca* را مورد مطالعه قرار دادند. از جمله تیمارهای که شیشه‌ای شدن را کاهش می‌دهد اما روی سرعت ریزازدیادی اثر نداشت، استفاده از سیستم سردکننده انتهایی به مدت یک یا دو هفته و آگارژل به عنوان عامل ژل‌کننده در رقم هلنا[۲] در هر دو غلظت ۰/۴۵ و ۰/۵ درصد، در حالی که بهترین نتایج با سیستم سردکننده انتهایی برای دو هفته و استفاده از آگار ۰/۸درصد به عنوان عامل ژل‌کننده در رقم لورنا[۳] به‌دست آمده است. شاخه‌های شیشه‌ای شده بعد از اینکه به مدت سه هفته در زیر سیستم سردکننده انتهایی نگه‌داری شوند به حالت طبیعی برگشتند (Pérez-Tornero *et al.*, 2001).

تاباکینک[۴] و همکاران (۱۹۸۶) پایه‌های رویشی هلو × بادام به نام‌های هانسن ۲۱۶۸ و هانسن ۵۳۶ از کالیفرنیا را به روش ریزافزایی افزایش انبوه نمودند و بهترین نتیجه را از محیط کشت تاباکنیک و کستر (TK) (Tabachnik and Kester, 1977) به همراه ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر بنزیل آمینو پیورین (BAP) به‌دست آوردند. این پژوهش‌گران همچنین گزارش نمودند که سایتوکنین برای مرحله استقرار و افزایش پرآوری ضروری است و جیبرلیک اسید را برای رشد شاخساره‌ها پیش از مرحله ریشه‌زایی، بسیار موثر دانستند (Kester and Asay, 1986).

۱- O. peâ rez-tornero
۲- Helena
۳- Lorna
۴- Tabachnik

در ایران اولین پژوهش در مورد افزایش درون‌شیشه‌ای دورگه هلو × بادام (GF677) توسط کمالی و همکاران در سال ۱۳۸۰ اجرا شد. این پژوهش‌گران گزارش کردند که بهترین روش گندزدایی استفاده از کلرید جیوه ۰/۱ درصد به مدت شش دقیقه می‌باشد و بیشترین شاخه‌زایی با استفاده از محیط کشت کنوپ[1] تغییر یافته به همراه دو درصد ساکارز و یک میلی‌گرم در لیتر BAP بدون افزودن نفتالین استیک اسید (NAA) به‌دست آمد.

ذوالفقاری نسب و همکاران در سال ۱۳۸۳ با بررسی محیط‌های کشت‌های MS، WPM وM1 (مواد غذایی ماکرو MS با NH_4NO_3 به مقدار ۴۰۰ میلی‌گرم در لیتر) در ریزافزایی درون‌شیشه‌ای دورگه گوجه × زردآلو گزارش کردند که محیط کشت WPM با یک میلی‌گرم در لیتر بنزیل آمینو پورین (BAP) بالاترین نسبت پرآوری با طولی به تقریب سه سانتی‌متر داشتند همچنین با استفاده از غلظت‌های مختلف IBA و NAA با موفقیت ریشه‌دار شدند و بالاترین درصد ریشه‌زایی با IBA و NAA به ترتیب در غلظت‌های ۶/۵ و ۲/۲ میلی‌گرم در لیتر به دست آمد. سازگار کردن شاخساره‌های ریشه‌دار شده به شرایط گلخانه‌ای با استفاده از سیستم مه‌افشانی، با موفقیت (۶۴/۳ ٪) انجام شد.

دژم‌پور و همکاران در سال ۱۳۸۶ بر روی گندزدایی، استقرار و پرآوری در کشت درون‌شیشه‌ای چند دورگه بین گونه‌ای در جنس پرونوس مطالعه کردند. مواد گیاهی از دورگه‌های HS314 (هلو×بادام)، HS302 (گوجه×زردآلو)، HS721 (گوجه×بادام) و HS408 (آلو×زردآلو) در ایستگاه تحقیقات باغبانی سهند به‌دست آمده‌اند به همراه دورگه GF677 (به عنوان شاهد) به‌صورت شاخه‌های تک جوانه در فصل رویشی و خفتگی برداشت شدند. ریزنمونه‌ها پس از شستشوی سطحی با غلظت‌های مختلف هیپوکلریت سدیم و کلرید جیوه گندزدایی شده و سپس در محیط‌های کشت MS تغییر یافته، WPM، Knop تغییر یافته وQL کشت شدند. نتایج نشان داد که هیپوکلریت سدیم ۲/۵ درصد به مدت ۵ تا ۱۰ دقیقه و کلرید جیوه با غلظت‌های۰/۵، ۰/۸ و ۱ گرم در لیتر به مدت ۵ دقیقه به ترتیب برای نمونه‌های علفی، نیمه چوبی و چوبی کمترین آلودگی را دارند. درمرحله استقرار، محیط

۱- Knop

کشت WPM با غلظت نیم میلی‌گرم در لیتر بنزیل آدنین و ۰/۰۵ میلی‌گرم در لیتر نفتالین استیک اسید برایHS408 و HS302 و در محیط MS تغییر یافته با همان میزان تنظیم کننده رشد گیاهی برای HS721 و HS314 بیشترین موفقیت را داشتند. در مرحله پرآوری MS تغییر یافته و نصف غلظت برای HS721، HS314 و GF677 و محیط WPM برای HS408 و HS302 با غلظت یک میلی‌گرم در لیتر به همراه ۰/۰۱ میلی‌گرم در لیتر ایندول بوتریک اسید بهترین محیط کشت بودند.

میری و همکاران در سال ۱۳۸۲ برای جلوگیری از قهوه‌ای شدن نمونه‌های گیاهی در کشت درون‌شیشه‌ای همگروه‌های سیب M9 و M26، نگه‌داری ریزنمونه‌های تازه کشت شده به مدت شش روز در یخچال را توصیه کردند. در به‌نژادی پایه‌های درختان میوه یکی از مهمترین ویژگی‌هایی که در گزینش پایه مد نظر می‌باشد داشتن توانایی افزایش رویشی آسان می‌باشد (Kester, 1975)؛(Layne *et al.*, 1996).

بالا و ورتسی[۱] در سال ۲۰۰۱ در کشت درون‌شیشه‌ای ارقام مختلف زردآلوی مجارستانی در مرحله پرآوری به‌طور موفقیت‌آمیزی از نوک شاخساره‌های سال جاری و از BAP-riboside به‌جای BAP استفاده کردند. آن‌ها همچنین در مرحله ریشه‌زایی از غلظت‌های مختلف NAA وIBA استفاده کردند و بیان داشتند که ریشه‌زایی همه ارقام با موفقیت (بیش از ۹۰ درصد) انجام و ۷۵ تا ۹۵ درصد شاخه‌های ریشه‌دار شده در رطوبت نسبی بالا به شرایط گلخانه سازگار شدند (Balla and Vertesy, 2001).

روزاتی[۲] و همکاران در سال ۱۹۸۰ موفق به ریزافزایی آلوی ژاپنی[۳] با استفاده از ریزنمونه‌های نوک شاخساره پنج تا هفت میلی‌متری این گونه در محیط کشت موراشیگی و اسکوگ شدند. نسبت افزون‌گری شاخساره با استفاده از یک میلی‌گرم در لیتر BAP در هر ماه ۱۰:۱ تا ۲۰:۱ گزارش شد. بالاترین درصد ریشه‌زایی با استفاده از دو تا چهار، میلی‌گرم در لیتر IBA در ۲۱ درجه سانتی‌گراد

۱- Balla and Vertesy

۲- Rosati

۳- *Prunus salicina* cv.Calita

به‌دست آمد. این پژوهش‌گران زمان مورد نیاز برای آغازش رشد ریشه، میزان رشد ریشه و درصد نهایی گیاهان ریشه‌دار شده را با دمای اتاقک رشد مرتبط دانستند (Rosati *et al.*, 1980).

در افزایش درون‌شیشه‌ای پایه‌های پاکوتاه گیلاس، ریزنمونه‌های نوک شاخساره از گیاهان ایزوله شده، با استفاده از ۱/۵ میلی‌گرم در لیترBAP در محیط کشت MS پرآوری بهینه داشتند (Erbenova *et al.*, 2001).

لاوری[۱] و همکاران در سال ۲۰۰۱ در بررسی آغازش شاخه نابجا از مریستم انتهایی بادام و گونه‌های دیگر جنس پرونوس (زردآلو، آلو و هلو) نشان دادند که باززایی شاخساره نابجا، با ۳۰ روز تیمار تاریکی و با استفاده از محیط کشت LP، با دو میلی‌گرم در لیتر BAP، ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر NAA و ۲۵۰ میلی‌گرم در لیتر آنتی‌بیوتیک سفوتاکسیم با موفقیت انجام می‌شود، سپس شاخساره‌ها به محیط دارای جیبرلیک اسید ۱/۴ میلی‌مول GA3، بدون اکسین همراه با نور انتقال دادند، واکشت هر ماه یک‌بار صورت می‌گیرد (Lauri *et al.*, 2001).

حِمِد آی.ای. سلیمان[۲] در سال ۲۰۱۲ تکثیر درون‌شیشه‌ای زردآلو *p.armenica* و ارزیابی پایداری ژنتیکی گیاهان ریزازدیادی شده با استفاده از آنالیز Rapid را مورد مطالعه قرار داد. در این بررسی از مریستم‌های شاخه‌های توسعه یافته رقم El-Hamawey استفاده شد. مریستم‌ها از گیاهان درحال رشد فعال در فصل بهار تهیه شد؛ سپس در پنج نوع محیط پایه (MS, 1/2MS, WP, B5, QL) همراه با تنظیم کننده رشد کشت شد. سرعت بقا نوک‌های مریستم ۸۹/۳ درصد، میانگین تعداد شاخه‌ها ۳/۹۸ و میانگین طول شاخه ۱/۵۸ سانتی‌متر را روی محیط WP غنی شده 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 ریزنمونه‌ها در بهار گرفته شده با فصل‌های دیگر مقایسه شده است. بالاترین میانگین تعداد شاخه جدید (۵/۳۷) در WP غنی شده با ۴ میلی‌گرم Ba و ۰/۵ میلی‌گرم 2ip

۱- Lauri

۲- Hemaid I.A. Soliman

به‌دست آمد. بالاترین درصد ریشه‌دهی شاخه‌های نابجا به میزان ۹۱ درصد، میانگین تعداد ریشه به تعداد ۷/۶۴ و میانگین طول ریشه با ۳/۴۳ سانتی‌متر در هفت روز در تاریکی بر روی محیط MS با ۲ میلی‌گرم IBA و ۰/۵ میلی‌گرم NAA قبل از انتقال به یک دوره ۱۶ ساعت روشنایی به‌دست آمد. در کل ۷۳ درصد گیاهچه‌های زنده مانده و در گلخانه سازگار شدند (Hemaid I.A, 2012).

هاکان یلدریم[۱] و همکاران در سال ۲۰۱۱ ریزازدیادی زردآلو رقم هاچلیل اغلو[۲] به‌وسیله کشت تک گره را مورد بررسی قرار دادند. در این مطالعه چندین فاکتور موثر در کشت درون‌شیشه‌ای، سرعت تکثیر، ریشه‌دهی و سازگاری زردآلو رقم هاچلیل اغلو آزمایش شد. بهترین زمان برای کشت درون‌شیشه‌ای هاچلیل اغلو ماه می[۳] تعیین گردید. اثرات سایتوکنین‌های بنزیل آدنین، کاینتین، تیدیازورن به‌طور جداگانه و همچنین بنزیل آدنین در غلظت‌های مختلف آزمایش شد. مقادیر مختلف بنزیل آدنین و اثرات آن روی تکثیر شاخه بررسی شد؛ یک میلی‌گرم در لیتر بنزیل آدنین بیشترین اثر روی تحریک پرآوری شاخه داشت. بیشترین تعداد شاخه‌ها (۳/۴۲±۰/۱۹) با استفاده از دو میلی‌گرم در لیتر بنزیل آدنین به‌دست آمد. اثر قندها به عنوان یک منبع کربن روی تکثیر شاخه با استفاده از گلوکز، ساکارز، فروکتوز و لاکتوز در سه درصد غلظت مطالعه شد. بهترین نتیجه از بین قندهای مختلف مورد آزمایش در تکثیر شاخه از قند ساکارز به‌دست آمد. بهترین درصد ریشه‌دهی روی محیط MS غنی شده با دو میلی‌گرم در لیتر ایندول بوتریک اسید به‌دست آمد. گیاهان باززایی شده به‌طور موفقیت‌آمیزی به خاک منتقل شدند (Yildrim *et al.*, 2011).

۱- Hakan Yildrim
۲- Hacıhaliloğlu
۳- May

فصل سوم:

مواد و روش‌ها

۳- فصل سوم: مواد و روش‌ها

این پژوهش با هدف بررسی اثرات تنظیم کننده‌های رشد گیاهی بر ریزازدیادی چهار رقم زردآلو ایرانی در دانشکده کشاورزی دانشگاه شاهرود انجام شد.

مراحل انجام این پژوهش شامل سه بخش استقرار، پرآوری و ریشه‌زایی است که در ادامه معرفی می‌گردند.

۳-۱- آزمایش ۱- بهینه‌سازی روش‌های ضدعفونی، محیط کشت و تیمارهای رفع خفتگی در مرحله استقرار شاخساره‌های زردآلو در جوانه‌های خفته و در حال رشد زردآلو در محیط درون‌شیشه‌ای

۳-۱-۱- مواد گیاهی و شرایط کشت

مواد گیاهی از شاخه‌های سال جاری در طول فصل بهار از درختان جوان در حال رشد زردآلوی ارقام جعفری، قوامی، رجبعلی، خیوه‌ای از نهالستان موجود در دانشکده کشاورزی جمع آوری شد.

به منظور مقایسه درصد جوانه‌زنی، این آزمایش در طول فصل زمستان از شاخه‌های یکساله زردآلوی ارقام جعفری و رجبعلی نیز انجام شد.

۳-۱-۲- ضدعفونی قطعات گره‌ای

در این آزمایش جهت بررسی کنترل آلودگی و میزان قهوه‌ای شدن ریزنمونه، از اسید سیتریک، کلرید جیوه، هیپوکلرید سدیم و الکل استفاده شد. برای هر تیمار سه تکرار در نظر گرفته شد و در هر تکرار (شیشه کشت) چهار ریزنمونه کشت گردید. رقم مورد استفاده در این آزمایش جعفری است.

۳-۱-۳- تیمارهای ضدعفونی ریزنمونه

قلمه‌های منتقل شده به آزمایشگاه به قطعاتی با یک گره تقسیم شدند. ریزنمونه‌ها را با مایع ظرفشویی به مدت ۱۰ دقیقه شستشو داده سپس به مدت ۲ ساعت در برابر آب جاری قرار می‌دهیم.

پس از شستشو ریزنمونه‌ها را به زیر هود منتقل کرده و مراحل ضدعفونی سطحی با تیمارهای مختلف را اعمال می‌کنیم.

تیمارهای ضدعفونی شامل:

آزمایش اول:

۱) الکل ۷۰٪ به مدت ۲ دقیقه + اسیدسیتریک به مدت ۳ دقیقه

۲) الکل ۷۰٪ به مدت ۲ دقیقه + اسیدسیتریک به مدت ۳ دقیقه + کلرید جیوه به مدت ۴ دقیقه

۳) الکل ۷۰٪ به مدت ۲ دقیقه + اسیدسیتریک به مدت ۳ دقیقه + هیپوکلرید سدیم به مدت ۲۰ دقیقه

۴) الکل ۷۰٪ به مدت ۲ دقیقه + اسیدسیتریک به مدت ۳ دقیقه + هیپوکلرید سدیم مدت زمان ۲۰ دقیقه + کلرید جیوه ۴ دقیقه

آزمایش دوم:

۱) پس از شستشو نمونه‌ها به زیر هود منتقل شده سپس با کلرید جیوه (۰/۰۱ درصد) به مدت ۴ دقیقه ضدعفونی کرده پس از شستشو با آب مقطر استریل دو بار با اسید سیتریک (۰/۰۷ درصد) هر بار به مدت ۳ دقیقه ضدعفونی می‌کنیم و در نهایت سه بار با آب مقطر استریل هر با به مدت ۵ دقیقه شستشو می‌دهیم.

۲) ریزنمونه به مدت ده دقیقه در اسید سیتریک قرار گرفته سپس با الکل (۷۰ درصد) به مدت ۲ دقیقه و هیپوکلرید سدیم ۲۰ درصد (ماده موثره ۵ درصد) به مدت (۱۰-۱۵-۲۰) دقیقه ضدعفونی می‌کنیم؛ در نهایت سه بار شستشو با آب مقطر استریل هر بار به مدت ۵ دقیقه صورت می‌گیرد.

صفات مورد اندازه گیری: صفات مورد بررسی میزان آلودگی قارچی و باکتریایی برای تعیین بهترین تیمار ضدعفونی و قهوه‌ای شدن ریزنمونه.

۳-۱-۳-۱- ضدعفونی در طول فصل بهار

ریزنمونه‌ها از شاخه‌های که در طول فصل بهار (فروردین تا خرداد) شاخه‌های جدید تولید می‌کند تهیه گردید. ریزنمونه‌ها از قسمت‌های داخلی و هوایی درخت و از شاخه‌های جوان قوی که دارای بافت نرم هستند به دلیل آلودگی کمتر تهیه شدند.

مراحل ضدعفونی کردن ریزنمونه به شرح زیر می‌باشد:

تهیه شاخساره به طول ۱۵ تا ۲۰ سانتی‌متر و حذف برگ‌ها از کنار هر جوانه به گونه‌ای که قاعده برگ‌ها در کنار جوانه باقی بماند صورت گرفت (شکل ۳-۱).

شکل ۳-۱ حذف برگ‌های قلمه

بعد از انتقال شاخساره به آزمایشگاه، قلمه‌ها به دو جوانه یا بیشتر تقسیم شدند. جوانه‌های بریده شده را به‌وسیله دو میلی‌لیتر مایع ظرفشویی و یک میلی‌لیتر توین ۸۰ به مدت ۱۵ دقیقه شستشو داده شدند. سپس به مدت دو ساعت در برابر آب جاری قرار گرفتند.

ریز قلمه‌های شسته شده را به زیر هود منتقل و با کلرید جیوه ۰/۰۱ درصد به مدت دو دقیقه ضدعفونی و سپس با آب مقطر استریل آبکشی شدند.

ریزقلمه‌ها را با اسید سیتریک (آنتی‌اکسیدانت برای جذب ترکیبات فنولی) ۰/۰۷ درصد به مدت سه دقیقه شستشو و یک آبکشی، دوباره قلمه‌ها را با اسید سیتریک به مدت سه دقیقه شستشو شدند و سه بار آبکشی نهایی صورت گرفت.

ریز قلمه‌های استریل شده برروی کاغذ صافی از قبل استریل شده قرار گرفت تا آب اضافی آن جذب شود.

۳-۱-۳-۲- ضدعفونی در طول فصل زمستان

برای کشت قطعه‌های گرهی از درختان چوبی زردآلوی بالغ رقم جعفری و رقم رجبعلی در طول فصل زمستان (بهمن ماه) قلمه‌ها به طول ۱۰ تا ۱۵ سانتی‌متر تهیه و به آزمایشگاه انتقال داده شد. قلمه‌های منتقل شده به آزمایشگاه با استفاده از تیغ اسکارپل فلس‌های جوانه‌ها به دقت برداشته طوری که به جوانه آسیبی وارد نشود (شکل ۳-۲). ریزنمونه‌ها را با مایع ظرفشویی به مدت ۱۰ دقیقه شستشو داده سپس به مدت ۲ ساعت در برابر آب جاری قرار داده شد. پس از شستشو ریزنمونه‌ها را به زیر هود منتقل کرده و مراحل ضدعفونی سطحی و کشت در تیمارهای مختلف تنظیم کننده رشد گیاهی را اعمال شد.

شکل ۳-۲ جوانه‌های فلس‌برداری شده

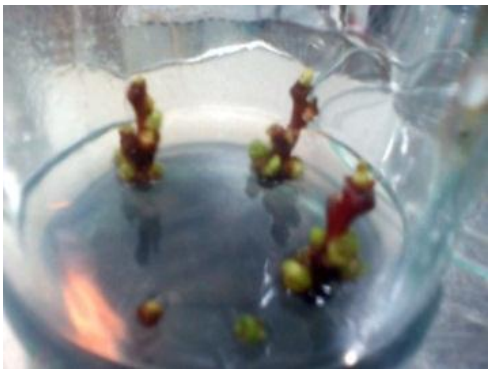
ریزنمونه‌ها را به مدت چهار دقیقه با کلرید جیوه ۰/۰۱ درصد ضدعفونی کرده سپس با اسید سیتریک ۰/۰۷ درصد اتوکلاو شده به مدت سه دقیقه ضدعفونی و پس از آبکشی دوباره به مدت سه دقیقه با اسید سیتریک ضدعفونی کرده و در نهایت سه بار با آب مقطر استریل شسته شدند. پس از استریل ریزنمونه، آن‌ها را روی کاغذ صافی استریل برای آبگیری قرار داده سپس نمونه‌ها در محیط کشت بافت کشت داده شدند.

۳-۱-۴- تهیه محیط کشت

محیط کشت‌هایی که برای مرحله استقرار تهیه می‌شود به‌صورت زیر می‌باشد.

۳-۱-۴-۱- محیط کشت برای جوانه‌های خفته فصل زمستان

ریزنمونه‌های ضدعفونی شده را در محیط کشت WPM (جدول ۳-۱) شامل ۳ درصد ساکارز، ۸ گرم در لیتر آگار، ۴ گرم در لیتر ذغال فعال به همراه ۲ میلی‌گرم در لیتر BAP و ۰/۰۴ میلی‌گرم در لیتر IBA با تیمار تنظیم کننده رشد گیاهی جیبرلین با غلظت‌های چهار، شش، هشت میلی‌گرم در لیتر منتقل شد (شکل ۳-۳). برای ضدعفونی محیط کشت از اتوکلاو در دمای ۱۲۱ درجه به مدت ۲۰ دقیقه استفاده شد. ریزنمونه‌ها پس از کشت در اتاقک رشد با ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.



شکل ۳-۳ جوانه‌های کشت شده در محیط WPM

۳-۱-۴-۲- محیط کشت جوانه‌های شاخه‌های فصل جاری در فصل بهار

برای کشت شاخساره در فصل بهار در مرحله استقرار از دو محیط کشت WPM (جدول ۳-۱) و MS (جدول ۳-۲) به همراه سه درصد ساکارز و ۰/۸ درصد آگار استفاده شد.

جدول ۳-۱ عناصر میکرو و ماکرو محیط WPM (Loyd and McCown, 1980)

Ingredient	Woody plant medium (WPM) mg l^{-1}
NH_4NO_3	400
$Ca(NO_3)_2. 4H_2O$	556
$CaCl_2. 2H_2O$	96
$MgSO_4. 7H_2O$	370
KH_2PO_4	170
K_2SO_4	990
$FeSO_4. 7H_2O$	27.8
Na_2EDTA	37.3
$MnSO_4. 4H_2O$	22.3
H_3BO_3	6.2
$ZnSo_4. 7H_2O$	8.6
$Na_2MoO_4. 2H_2O$	0.25
$CuSo_4. 5H_2O$	0.25
Myo-inositol	100
Glycine	2
Thiamine. HCl	1
Pyridoxin. HCl	0.5
Nicotinic acid	0.5

جدول ۳-۲ عناصر میکرو و ماکرو محیط MS (Murashinge and Skoog, 1962)

Ingredient	Murashing and Skoog (MS) mg l^{-1}
Macronutrients (10×)	
KNO_3	1900
NH_4NO_3	1650
$CaCl_2. 2H_2O$	440
$MgSO_4. 7H_2O$	370
KH_2PO_4	170
Micronutrients (100×)	
H_3BO_3	6.2
$MnSO_4. 4H_2O$	22.3
$ZnSo_4. 7H_2O$	8.6
KI	0.83
$Na_2MoO_4. 2H_2O$	0.25
$CuSo_4. 5H_2O$	0.025
$CoCl_2. 6H_2O$	0.025
Iron Source	
Fe EDTA-Na salt	40
Vitamins	
Myo-inositol	100
Glycine	2
Thiamine. HCl	0.1
Pyridoxin. HCl	0.5
Nicotinic acid	0.5

این دو محیط بدون تنظیم کننده رشد گیاهی برای مرحله استقرار تهیه شده و ریز قلمه‌هایی که طی مرحله قبل استریل شده بودند درون این محیط‌ها، کشت شدند (شکل ۳-۴).

شکل ۳-۴ شاخه های کشت شده در مرحله استقرار

۳-۲- آزمایش ۲- بررسی اثر BAP در پرآوری شاخساره‌های زردآلو در محیط درون‌شیشه‌ای

بعد از جوانه زدن ریز قلمه‌هایی که طی مرحله استقرار در طول فصل بهار کشت شدند؛ به محیط پرآوری منتقل شدند. محیط پرآوری شامل محیط کشت با غلظت‌های مختلف تنظیم کننده رشد گیاهی می‌باشد.

۳-۲-۱- تهیه محیط کشت و اضافه کردن تنظیم کننده رشد گیاهی

جوانه‌های باز شده در مرحله استقرار را به‌وسیله پنس استریل از انتها جدا کرده و داخل محیط کشت WPM قرار داده شدند. تمامی تنظیم کننده‌های رشد گیاهی مصرفی قابلیت اتوکلاو شدن را دارند و قبل از تنظیم pH به محیط اضافه می‌شود اما تنظیم کننده رشد گیاهی جیبرلیک اسید توانایی اتوکلاو شدن را ندارد و در برابر دمای بالا ساختار آن تخریب می‌شود، پس برای استریل کردن از فیلتر سلولزی ۰/۲ ماکرو استفاده شد (جدول ۳-۳، جدول ۳-۴).

جدول ۳-۳ ترکیب و غلظت تنظیم کننده رشد گیاهی BAP به منظور پرآوری زردآلو

تنظیم کننده رشد گیاهی BAP			جیبرلیک اسید GA_3	ایندول بوتریک اسید IBA	رقم
۲	۱	۰/۵	۲	۰/۰۵	رجبعلی
۲	۱	۰/۵	۲	۰/۰۵	قوامی
۲	۱	۰/۵	۲	۰/۰۵	خیوه‌ای
۲	۱	۰/۵	۲	۰/۰۵	جعفری

جدول ۳-۴ ترکیب و غلظت تنظیم کننده رشد گیاهی IBA به منظور ریشه‌زایی زردآلو

رقم	تنظیم کننده رشد گیاهی IBA		
رجبعلی	۰/۵	۱	۲
قوامی	۰/۵	۱	۲
خیوه‌ای	۰/۵	۱	۲
جعفری	۰/۵	۱	۲

۳-۲-۲- تنظیم pH محیط کشت

پس از به حجم رسانیدن محیط کشت در مراحل قبلی، نیاز به تنظیم pH می‌باشد. به‌طور کلی pH محیط کشت بین ۵/۸-۵/۷ با استفاده از سود[۱] و اسید[۲] یک نرمال تنظیم شد. در مرحله آخر به میزان ۸ گرم در لیتر آگار به عنوان ماده ژل کننده به محیط کشت اضافه شد. بعد از تهیه محیط کشت آن‌ها را در اتوکلاو در دمای ۱۲۱ درجه به مدت ۲۰ دقیقه استریل کرده و زیر هود کشت بافت درون شیشه‌های استریل شده توزیع شد. ذغال فعال به همراه آگار در مرحله آخر به محیط اضافه شد.

۳-۲-۳- تیمار تنظیم کننده رشد گیاهی در مرحله پرآوری

تنظیم کننده‌های رشد گیاهی که در مرحله پرآوری استفاده شده به شرح ذیل می باشد.

BAP در غلظت‌های ۰/۵، ۱، ۲ میلی‌گرم در لیتر

IBA در غلظت ۰/۰۵ میلی‌گرم در لیتر

GA3 ۲ میلی‌گرم در لیتر

۳-۲-۴- واکشت[۳]

محیط کشت گره‌ها هر دو هفته یک‌بار تعویض شدند. گره‌ها را در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد تحت نور فلورسنت سفید ($55\mu Mm^{-2}s^{-1}$) با ۱۶ ساعت دوره نوری و هشت ساعت دوره تاریکی نگه‌داری شدند. طول دوره مرحله پرآوری یک ماه بود.

۱- NaOH
۲- HCl
۳- Subculture

۳-۲-۵- صفات مورد اندازه‌گیری

در انتهای مرحله پرآوری داده برداری صفاتی چون تعداد شاخه تولید شده، طول شاخساره، کارایی (طول در تعداد شاخه) انجام گرفت.

۳-۳- آزمایش ۳- انتقال شاخه‌های تولیدی به محیط ریشه‌زایی

برای ریشه‌دهی شاخساره‌های پرآوری شده به محیط نصف غلظت محیط MS، ذغال فعال سه گرم در لیتر، ساکارز دو درصد و آگار ۰/۶ درصد منتقل شد. در این محیط کشت IBA (ایندول بوتریک اسید) در غلظت‌های ۰/۵، ۱، ۲ میلی‌گرم در لیتر به عنوان تیمار استفاده شد.

واکشت ریزنمونه‌ها هر دو هفته یک‌بار صورت گرفت. طول دوره این مرحله یک ماه می‌باشد.

۳-۴- آنالیز آماری

۳-۴-۱- آزمایش اول

۳-۴-۱-۱- ضدعفونی ریزنمونه

این آزمایش در سه تکرار انجام شد. بر حسب میزان آلودگی به آن‌ها درجه داده شد. (۰: بدون آلودگی، ۱: کم، ۳: متوسط، ۵:زیاد، ۷: خیلی زیاد)

۳-۴-۱-۲- درصد جوانه‌زنی در مرحله استقرار در طول فصل زمستان

این آزمایش به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار اجرا شد. فاکتور اول دو رقم زردآلوی (رقم جعفری و رقم رجبعلی)، فاکتور دوم عملیات فلس‌برداری و عدم فلس‌برداری و فاکتور سوم غلظت‌های مختلف جیبرلین (چهار، شش، هشت میلی‌گرم در لیتر) بود.

صفت مورد بررسی درصد شکسته شدن جوانه‌های رویشی در حال خواب زردآلو بود.

۳-۴-۱-۳- درصد جوانه‌زنی در مرحله استقرار در طول فصل بهار

آزمایش اول: مقایسه دو محیط کشت MS و WPM در قالب طرح کاملاً تصادفی با نه تکرار اجرا شد.

آزمایش دوم: مقایسه سه رقم زردآلو در محیط MS در قالب طرح کاملاً تصافی با ۱۵ تکرار اجرا شد.

صفت مورد بررسی در این مرحله اندازه‌گیری درصد جوانه‌زنی و تعیین مناسب‌ترین محیط کشت برای مرحله استقرار بود.

۳-۴-۲- آزمایش دوم

این آزمایش در قالب طرح فاکتوریل بر پایه طرح کاملاً تصادفی با پنج تکرار اجرا شد که فاکتور اول شامل چهار رقم جعفری، قوامی، رجبعلی و خیوه‌ای و فاکتور دوم سه تیمار تنظیم کننده رشد گیاهی BAP در غلظت‌های ۰/۵، ۱، ۲ میلی‌گرم در لیتر می‌باشد.

آزمایش با پنج تکرار انجام شد و در هر تکرار ۴ تا ۵ ریز نمونه کشت گردید.

داده برداری صفاتی چون تعداد شاخه تولید شده، طول شاخساره، کارایی (طول در تعداد شاخه) انجام شد.

۳-۴-۳- آزمایش سوم

این آزمایش در قالب طرح فاکتوریل بر پایه طرح کاملاً تصادفی با پنج تکرار اجرا شد که فاکتور اول شامل چهار رقم جعفری، قوامی، رجبعلی و خیوه‌ای و فاکتور دوم سه تیمار تنظیم کننده رشد گیاهی IBA در غلظت‌های ۰/۵، ۱، ۲ میلی‌گرم در لیتر می‌باشد.

۳-۵- نرم افزارهای مورد استفاده

تجزیه داده‌ها با نرم افزار SAS9.1 انجام شد و نمودارها با نرم افزار Excel رسم گردید. مقایسه میانگین تیمارها با استفاده از آزمون LSD صورت گرفت.

فصل چهارم:

نتایج و بحث

۴- فصل چهارم: نتایج و بحث

در این فصل نتایج به‌دست آمده را در بخش‌های جداگانه مورد بررسی قرار داده شد.

۴-۱- آزمایش اول- ضدعفونی و استقرار ریزنمونه‌ها

نتایج حاصل از تجزیه واریانس داده‌های مربوط به مرحله ضدعفونی نمونه‌ها به شرح زیر می‌باشد.

بررسی نتایج آزمایش اول پس از ۱۰ روز، ریزنمونه‌های تیمار اول و چهارم کمترین میزان آلودگی را نشان دادند و بیشترین میزان آلودگی در تیمار سوم مشاهده شده است؛ آلودگی قارچی فقط در تیمار اول به مقدار کم دیده شد (جدول ۴-۱). تیمار سوم بدون سیاه شدگی بافت و در تیمار اول به مقدارکم و تیمار دوم و چهارم به میزان متوسط دیده شده است (جدول ۴-۱). آزمایش دوم ریزنمونه‌های تیمار شده با غلظت ۱ درصد هیپوکلرید سدیم به مدت۱۰-۱۵-۲۰ دقیقه، پس از ۷ روز کشت آلودگی ریزنمونه‌ها بررسی شدند. با افزایش مدت زمان استریل کردن به‌طور طبیعی میزان آلودگی کاهش پیدا کرد ولی گیاه‌سوزی و میزان قهوه‌ای شدن در ریزنمونه‌ها بیشتر مشاهده شد(جدول ۴-۲). در تیمار ضدعفونی با کلرید جیوه آلودگی مشاهده نشد ولی تمامی ریزنمونه‌ها قهوه‌ای شدند. مشکل قهوه‌ای شدن در تیمار کلرید جیوه با افزودن زغال فعال به محیط برطرف می‌شود.

جدول ۴-۱ اثر تیمارهای مختلف ضدعفونی شاخه‌های جانبی بر میزان آلودگی‌های قارچی، باکتریایی و قهوه‌ای شدن بافت در ۱۰ روز پس از کشت در رقم جعفری زردآلو در اسفند ماه

تیمار	آلودگی باکتریایی	آلودگی قارچی	میزان سیاه شدن بافت
محیط کشت فاقد ریز نمونه	۰	۰	۰
الکل+اسیدسیتریک	۳	۱	۱
الکل+اسیدسیتریک+کلرید جیوه	۵	۰	۳
الکل+اسیدسیتریک+وایتکس	۷	۰	۰
الکل+اسیدسیتریک+وایتکس+کلرید جیوه	۳	۰	۳

۰: بدون آلودگی، ۱: کم، ۳: متوسط، ۵:زیاد، ۷: خیلی زیاد

جدول ۴-۲ اثر تیمارهای مختلف ضدعفونی شاخه‌های جانبی بر میزان آلودگی‌های قارچی، باکتریایی و قهوه‌ای شدن بافت در۷ روز پس از کشت در رقم جعفری زردآلو در فروردین ماه

تیمار	آلودگی باکتری	آلودگی قارچی	سیاه شدن بافت
کلرید جیوه+اسید سیتریک	۰	۰	۷
الکل+وایتکس۱۰ دقیقه	۰	۷	۰
الکل+وایتکس۱۵ دقیقه	۰	۳	۱
الکل+وایتکس۲۰ دقیقه	۰	۱	۳

۰: بدون آلودگی، ۱: کم، ۳: متوسط، ۵:زیاد، ۷: خیلی زیاد

هدف از مرحله استقرار، دستیابی به درصد بالایی از کشت‌های سترون و تثبیت واحد گیاهی جدا شده در محیط کشت است (احسان‌پور ۱۳۸۰, خوشخوی ۱۳۷۳). آن‌چه که می‌تواند به عنوان یک معیار کلی در موفقیت تیمارهای ضدعفونی در نظر گرفته شود درصد ریزنمونه‌های استقرار یافته در محیط کشت است که عبارتست از درصد ریزنمونه‌های بدون آلودگی که آغازش رشد نیز در آن‌ها مشاهده شده است. منابع مختلف درصد ریزنمونه‌های استقرار یافته را با نوع محیط کشت، نوع و غلظت تنظیم کننده‌های رشد، نوع ریز نمونه و ژنوتیپ گیاه مرتبط می‌دانند (Perez-Tornero *et al*., 2000b; Channuntapipat *et al*., 2003; Hatchinsun and Zimmerman, 1987; Ruzic *et al*., 2000)، به همین دلیل در ریزافزایی پایه‌های مختلف درختان میوه از محیط‌های کشت متفاوتی استفاده شده است.

در این پژوهش از تیمارهای مختلف برای استریل کردن استفاده شد. از جمله موادی که برای استریل ریزنمونه مورد استفاده قرار گرفت هیپوکلرید سدیم، الکل ۷۰ درصد، کلرید جیوه و اسید سیتریک در تیمارها با غلظت‌های مختلف مورد استفاده قرار گرفت. بهترین نتیجه با کلرید جیوه و اسید سیتریک به‌دست آمد.

۴-۲- درصد جوانه‌زنی در طول فصل زمستان

نتایج تجزیه واریانس اثر جیبرلین و فلس‌برداری در درصد شکست خواب جوانه‌های رویشی دو رقم زردآلو نشان داد که بین تیمارهای فلس‌برداری، تنظیم کننده رشد گیاهی جیبرلین و نوع رقم به‌صورت اثرات ساده و اثر متقابل فلس‌برداری و تنظیم کننده رشد گیاهی جیبرلین، فلس‌برداری و

رقم در سطح یک درصد اختلاف معنی‌داری از نظر درصد شکستن خواب جوانه وجود دارد (جدول ۴-۳).

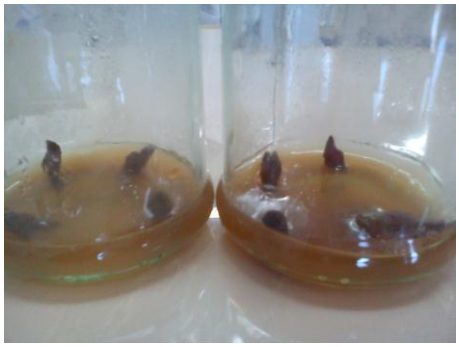
جدول ۴-۳ تجزیه واریانس اثر جیبرلین و فلس‌برداری در درصد شکست خواب جوانه‌های رویشی دو رقم زردآلو

منابع تغییرات	درجه آزادی	درصد جوانه‌زنی
فلس‌برداری	۱	۳۵۴۶۹/۴۴**
تنظیم کننده رشد گیاهی جیبرلین	۲	۲۲۷/۸۶۱**
رقم	۱	۵۱۳/۷۷۷**
فلس‌برداری × تنظیم کننده رشد گیاهی جیبرلین	۲	۲۲۷/۸۶۱**
فلس‌برداری × رقم	۱	۵۱۳/۷۷۷**
رقم × تنظیم کننده رشد گیاهی جیبرلین	۲	۵۴/۵۲۷ns
فلس‌برداری × رقم × جیبرلین	۲	۵۴/۵۲۷ns
خطا	۲۴	۳۳/۷۵
CV%		٪۱۸/۵

ns و ** به ترتیب عدم اختلاف معنی‌دار و معنی دار در سطح احتمال ۱٪

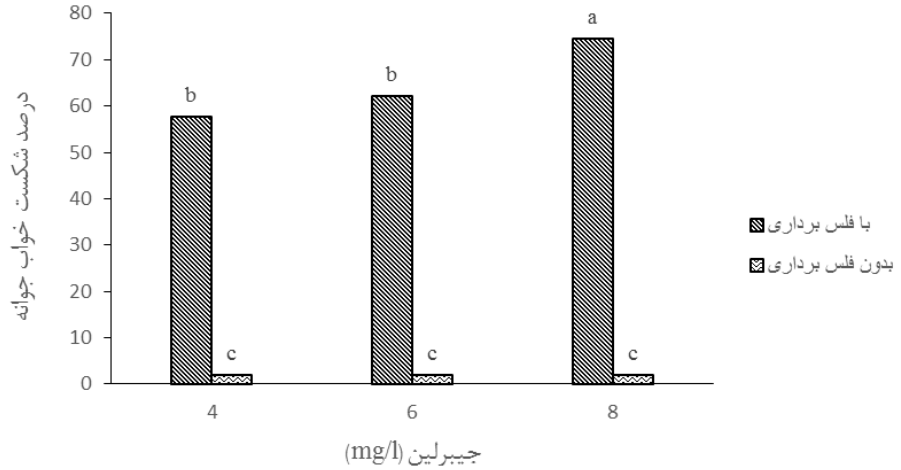
نتایج نشان داده که در صورت عدم فلس‌برداری حتی در هنگام استفاده از تیمارهای تنظیم کننده رشد گیاهی جیبرلین جوانه‌زنی در هیچ کدام از نمونه‌های مورد آزمایش صورت نمی‌گیرد (شکل ۴-۲). در حالت فلس‌برداری به‌طور میانگین ۶۲/۷۷ درصد جوانه‌ها جوانه زدند (شکل ۴-۱).

شکل ۴-۱ شکست خواب در جوانه فلس‌برداری شده زردآلو رقم جعفری دو هفته بعد از کشت



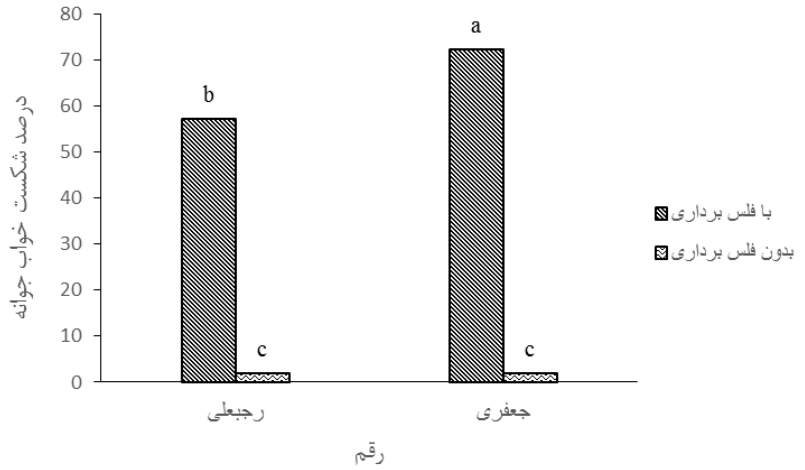
شکل ۴-۲ عدم جوانه‌زنی جوانه فلس‌برداری نشده یک هفته بعد از کشت

بر طبق جدول ۴-۳ اثر متقابل جیبرلین و فلس‌برداری بر درصد جوانه‌زنی ریزنمونه‌ها در سطح یک درصد اختلاف معنی‌داری داشت. در حالت فلس‌برداری بیشترین درصد جوانه‌زنی در غلظت هشت میلی‌گرم در لیتر ۷۴/۵ درصد و کمترین ۵۷/۶۶ درصد در غلظت چهار میلی‌گرم در لیتر مشاهده شد (شکل ۴-۳).



شکل ۴-۳ اثر متقابل جیبرلین و فلس‌برداری در درصد شکست خواب جوانه‌های رویشی زردآلو

اثر تیمار فلس‌بردای در شکست خواب جوانه در دو رقم زردآلو تفاوت معنی‌داری داشت. در حالت فلس‌برداری رقم رجبعلی به میزان ۵۷/۲۲ درصد و جعفری ۷۲/۳۳ درصد جوانه‌زنی داشتند (شکل ۴-۴).



شکل ۴-۴ مقایسه میانگین درصد جوانه‌زنی رقم × فلس‌برداری

نتایج این تحقیق نشان داد که حذف فلس‌ها کمک زیادی به شکسته شدن خواب جوانه در درختان زردآلو در شرایط کشت بافتی می‌کند. شواهد متعددی وجود دارد که نشان می‌دهد در طول دوره استراحت، مواد بازدارنده در فلس جوانه تجمع یافته و از رشد مجدد جلوگیری می‌کنند (طلایی، ۱۳۷۷). اسید آبسزیک بازدارنده‌ی مهم است که باعث خواب گیاه می‌گردد. این ماده در به تاخیر انداختن شکوفایی جوانه‌های جانبی کشت شده سیب موثر است (Dutcher and Powell, 1972 ; Singha and Powell, 1978). افزایش مقدار اسید آبسزیک با شکفتن جوانه‌ها در سیب، آلبالو و هلو رابطه منفی دارد (Mielke and Dennis, 1978; Seeley and Powell, 1981). با حذف این تنظیم کننده رشد گیاهی و اعمال تیمارهای جهت بیدار شدن جوانه‌ها، قدرت جوانه‌زنی به ریزنمونه‌ها برمی‌گردد. تحقیقات در سیب‌های کشت شده در مناطق نیمه گرمسیری نشان می‌دهد که حذف برگ‌ها سه هفته بعد از برداشت بلافاصله باعث شکفتن جوانه‌ها بدون نیاز به استراحت می‌گردد (Janick, 1974 ;Notodimedjo *et al.*, 1981). این مطلب نشان می‌دهد که به احتمال زیاد بازدارنده یا بازدارنده‌های شکوفایی جوانه‌ها در برگ‌ها تولید می‌شوند و قبل از ریزش برگ‌ها به فلس‌های جوانه منتقل می‌شود. در صورتی‌که انتقال بازدارنده‌ها به جوانه قبل ازحذف برگ‌ها صورت بگیرد، شکفتن جوانه‌ها اتفاق نخواهد افتاد (طلایی، ۱۳۷۷). تغییرات در سطوح درون‌زای آبسزیک اسید در جوانه‌ها از آغاز خواب تا شکستن رکود در گونه‌های متعددی گزارش شده است (Rodriguez *et* ;Powell, 1987 ; *al.*, 1991) و میزان آبسزیک اسید طی دوره تیمار سرمایی در جوانه‌ها کاهش می‌یابد. هنگام شکستن رکود مقادیر آبسزیک اسید به کمترین مقدار خود می‌رسد (Dennis and Edgerton, 1961). برخی از گزارش‌ها بیان می‌کند که غلظت آبسزیک اسید آزاد در پاییز افزایش یافته و در اوایل زمستان به حداکثر خود می‌رسد و سپس تا مرحله شکستن رکود کم می‌شود (Lang, 1989Powell, 1987 ; ; ; Wood, 1993).

رقم‌های بررسی شده از لحاظ پاسخ‌دهی به تیمار فلس‌برداری یکسان عمل نکردند و این خود نشان می‌دهد که شکسته شدن خواب جوانه بستگی به ژنوتیپ نیز دارد. میزان نیاز سرمایی و نیاز

گرمایی لازم برای شکسته شدن خواب جوانه‌های زایشی ارقام زردآلو تفاوت‌های قابل توجهی دارند (طلایی، ۱۳۷۷). حذف فلس‌های جوانه واریته‌های زودگل سیب در طول بهار اثر کمی بر شکفتن جوانه دارد اما در واریته‌های دیرگل یا خیلی دیرگل موثر است (Swartz *et al.*, 1984).

برای افزایش جوانه‌زنی جوانه‌های خفته در مرحله استقرار ریزنمونه‌ها در طول فصل زمستان، فلس‌برداری کمک زیادی به باز شدن جوانه‌ها می‌کند. همچنین استفاده از تیمارهای مختلف تنظیم کننده رشد گیاهی سایتوکنین، اکسینی و جیبرلین باعث افزایش جوانه‌زنی می‌شود.

۴-۳- درصد جوانه‌زنی در طول فصل بهار

بر طبق جدول ۴-۴ نتایج به‌دست آمده از تجزیه واریانس داده‌های درصد جوانه‌زنی دو محیط کشت MS و WPM نشان داد که بین محیط کشت‌ها اختلاف معنی‌داری وجود ندارد.

جدول ۴-۴ تجزیه واریانس درصد جوانه‌زنی دو رقم زردآلو در محیط MS و WPM

منابع تغییرات	درجه آزادی df	درصد جوانه‌زنی
محیط	۱	۰/۰۴^{ns}
خطا	۱۶	۱۵۱/۹
CV%		٪۱۶/۰۷

ns: عدم اختلاف معنی‌دار

نتایج تجزیه واریانس درصد جوانه‌زنی سه رقم زردآلو در محیط MS به تنهایی نشان می‌دهد که اختلاف معنی‌داری را در سطح یک درصد در جوانه‌زنی سه رقم زردآلو وجود دارد (جدول ۴-۵، شکل ۴-۵).

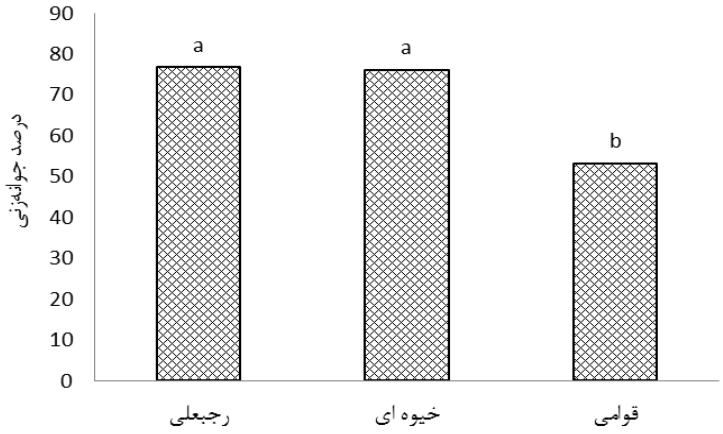
جدول ۴-۵ تجزیه واریانس درصد جوانه‌زنی سه رقم زردآلو در محیط MS

منابع تغییرات	درجه آزادی df	درصد جوانه‌زنی
رقم	۲	۷/۰۱**
خطا	۴۲	۳۸۴/۴
CV%		٪۲۸/۵

**معنی دار در سطح احتمال ٪۱

شکل ۴-۵ جوانه‌زنی در زردآلوی رقم رجبعلی پس از چهار هفته در محیط کشت MS

بر طبق شکل ۴-۶ بین ارقام رجبعلی و خیوه‌ای اختلاف معنی‌داری مشاهده نشده است. در رقم رجبعلی ۷۶/۶۶ درصد جوانه‌زنی و رقم قوامی به مقدار ۵۳/۱۳ درصد کمترین جوانه‌زنی را داشته است.



شکل ۴-۶ درصد جوانه‌زنی سه رقم زردآلو در محیط MS

در ریز ازدیادی به روش باززایی مستقیم گسترده‌ترین مواد گیاهی مورد استفاده در مرحله استقرار قطعات گره‌ای ساقه است. به‌دلیل اینکه امکان استقرار گیاه به‌وسیله کشت شاخه جانبی بیشتر است (Hemaid, 2012). زمانی که آلودگی درونی حضور داشت کشت مریستم برای تولید گیاهان عاری از ویروس در پرونوس‌ها پیشنهاد شد (Boxus and Druart, 1986; Leifert and Waites, 1990).

ذوالفقاری نسب و همکاران (۱۳۸۳) گزارش کردند که در کشت درون‌شیشه‌ای هیبرید طبیعی گوجه و زردآلو محیط کشت MS در مرحله استقرار باعث بافت مردگی انتهای برگ‌ها و نارسایی رشد

می‌شود. پرز- تورنرو و همکاران (۲۰۰۰) محیط کشت WPM را برای ریزافزایی ارقام مختلف زردآلو مناسب تشخیص دادند. در مطالعات دژم‌پور و همکاران (۱۳۸۶) برای نژادگان HS314 (بادام × هلو)[۱] و GF677 در مرحله استقرار و پرآوری، محیط MS تغییر یافته مناسب‌ترین محیط بود در حالی که برای HS302 محیط WPM بهترین نتیجه را داد. ذوالفقاری نسب و همکاران (۱۳۸۳) بهترین نتیجه در مرحله شاخه‌زایی از محیط WPM، تاباکینک و کستر (۱۹۸۶) برای دورگه هلو × بادام، هانسن ۲۱۶۸ و هانسن ۵۳۶ از کالیفرنیا مناسب‌ترین محیط کشت را TK با ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر بنزیل آدنین معرفی کردند ولی در این بررسی اختلاف معنی‌داری در استفاده از محیط کشت WPM و MS در مرحله استقرار مشاهده نشده است. این نتایج همگی موید واکنش متفاوت ژنوتیپ ها به محیط‌های کشت، تنظیم کننده‌های رشد و شرایط کشت می‌باشد. از لحاظ ظاهری گیاه‌سوزی در محیط MS به دلیل وجود اسید بوریک در غلظت بالاتر از محیط WPM مشاهده شد معمولاً یک محیط با غلظت کم آمونیوم یا WPM برای تکثیر پرونوس استفاده می‌شود (Snir, 1984) (شکل ۴-۷).

شکل ۴-۷ سوختگی برگ‌های زردآلو در مرحله استقرار

تنوع ژنوتیپی در تشکیل جوانه نابجا در زردآلو امری بدیهی است (Yildrim *et al.*, 2011). این پدیده در آزمایشات پرز-تورنر و همکاران (۲۰۰۰) نیز مشاهده شده است. آن‌ها از شش محیط کشت مختلف با پنج ژنوتیپ استفاده کردند. در این بین محیط QL بهترین نتیجه را در بین همه ارقام

۱- *Prunus amygdalus* × *P. persica*

داشت. همچنین تمامی ارقام در محیط MS از بین رفتند. رقم کورت[1] بیشترین تعداد شاخه و کارایی را در محیط QL و M2 داشت. اما رقم هلنا تفاوت معنی‌داری در واکنش به این شش محیط نداشت. لورنا بهترین کارایی و بیشترین تولید شاخه‌ها را در QL، WPM، M2، M1 داشته است این تفاوت مهم بین ژنوتیپ‌ها در سایر درختان میوه از جمله سیب (Batrish and Korkhovoi, 1997) یا هلو (Declerck and Korban, 1996) مشاهده شده و مطالعه تک تک هر کولتیوار در کشت بافت لازم می‌باشد. همان‌طور که در جدول ۴-۵ مشاهده شد بین ارقام مختلف در محیط MS نیز از نظر درصد جوانه‌زنی اختلاف وجود دارد.

۴-۴- آزمایش دوم- پرآوری (شاخه‌زایی)

نتایج تجزیه واریانس داده‌ها برای صفت تعداد شاخه نشان داد اثر ساده رقم و تنظیم کننده رشد گیاهی در سطح پنج درصد و اثر متقابل رقم و تنظیم کننده رشد گیاهی در سطح یک درصد معنی‌دار شد، همچنین برای صفت طول شاخه اثرات ساده و اثر متقابل در سطح یک درصد اختلاف معنی‌داری وجود دارد (جدول ۴-۶).

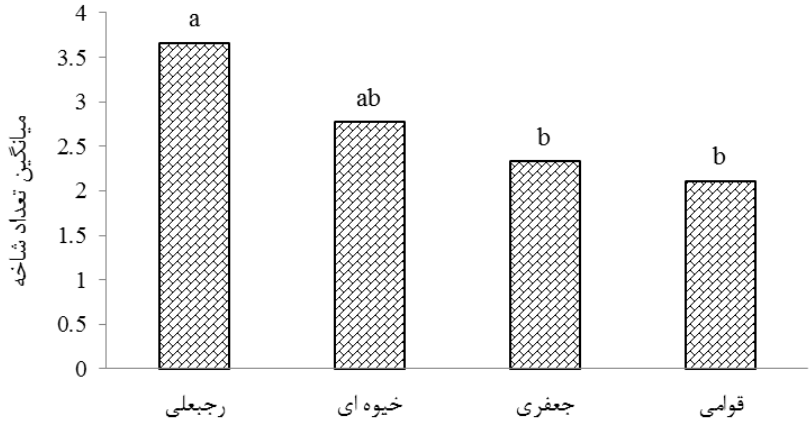
جدول ۴-۶ تجزیه واریانس اثر تنظیم کننده رشد گیاهی و رقم بر پرآوری زردآلو

منابع تغییرات	درجه آزادی (df)	تعداد شاخه	طول شاخه (cm)
رقم	۳	۴/۱۴*	۲۰/۱۸**
تنظیم کننده رشد گیاهی	۲	۴/۲۴*	۲۲/۳۷**
رقم×تنظیم کننده رشد گیاهی	۶	۳/۷۴**	۹/۴**
خطا	۲۴	۱/۰۲	۰/۱۱
CV %		٪۱۸/۰۹	٪۲۲/۶۱

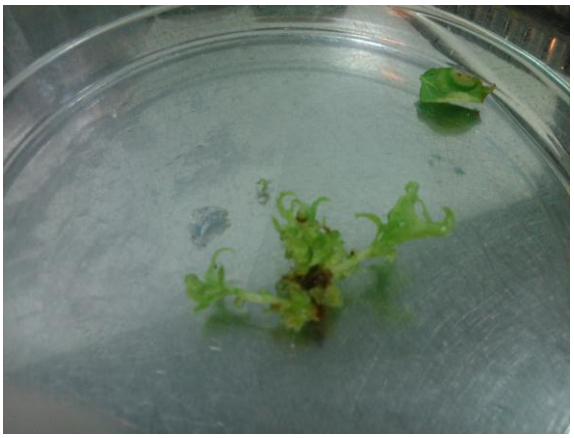
*، ** به ترتیب معنی دار در سطح احتمال ٪۵ و ٪۱

رقم رجبعلی بیشترین میانگین تعداد شاخه ۳/۶۶ و رقم قوامی کمترین میانگین تعداد شاخه را در ۲/۱۱ داشته است. بین ارقام جعفری، خیوه‌ای و قوامی اختلاف معنی‌داری وجود ندارد (شکل ۴-۹، شکل ۴-۸).

۱- currot

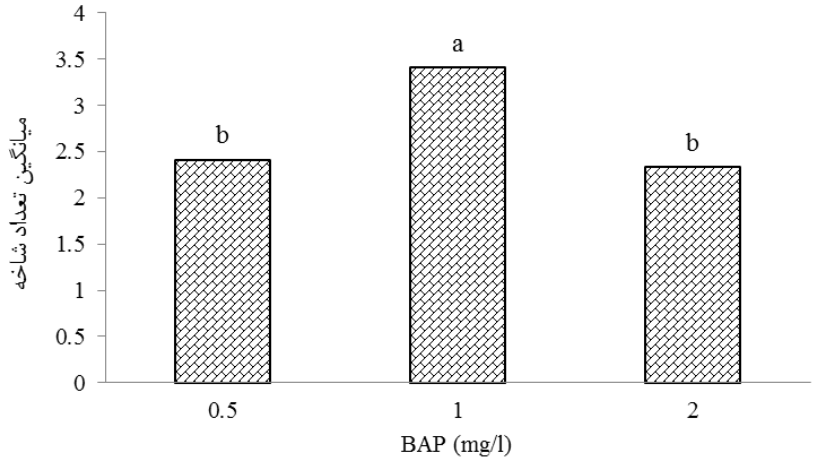


شکل ۴-۸ میانگین تعداد شاخه‌های پرآوری شده چهار رقم زردآلو در کشت درون شیشه ای



شکل ۴-۹ زردآلوی پرآوری شده رقم رجبعلی پس از یک ماه در غلظت یک میلی‌گرم درلیتر BAP

تاثیر تنظیم کننده رشد گیاهی BAP بر تعداد شاخه در غلظت یک میلی‌گرم در لیتر به مقدار ۳/۴۱ بیشترین و بین تیمارهای ۲ و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد (شکل ۴-۱۰).



شکل ۴-۱۰ تاثیر تنظیم کننده رشد گیاهی BAP در تعداد شاخه پرآوری شده زردآلو در کشت درون‌شیشه‌ای

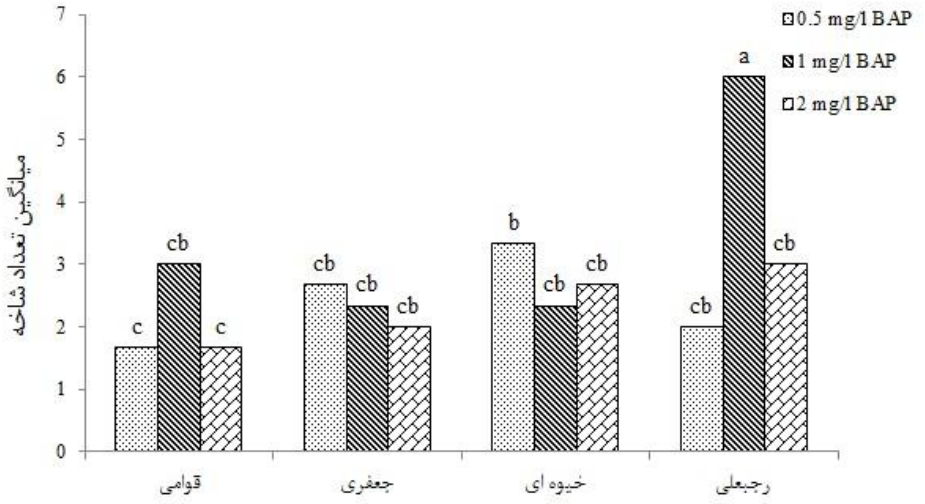
به‌طور معمول بنزیل آدنین بیشترین سایتوکنین مورد استفاده برای پرآوری شاخه زردآلو است (Yildrim *et al.*, 2011 ;Murai *et al.*, 1997). غلظت بالای BA باعث آبکی شدن زردآلو در *prunus mume* گردید (Harada and Murai, 1996 ;Marino *et al.*, 1993). بهترین غلظت BA بین ۱/۷۸ و ۳/۱۱ میکرومول گزارش شده است و غلظت‌های بالاتر موجب تولید برگ‌های روزت، آبکی شدن می‌شود. مورای و همکاران (۱۹۹۷) در بررسی اثر تکثیر درون‌شیشه‌ای رقم باکو با استفاده از غلظت‌های مختلف سایتوکنین برای پرآوری شاخه غلظت ۴/۴ میکرومول (یک میلی‌گرم در لیتر) بنزیل آدنین را برای پرآوری شاخه‌ها مناسب دیدند که با نتایج به‌دست آمده مطابقت دارد.

در مرحله پرآوری برای طویل شدن و ایجاد رشد طولی در پایه رویشی GF677 استفاده از جیبرلیک اسید بسیار سودمند است (کمالی و همکاران ۱۳۸۰). بنابراین در این آزمایش نیز در مرحله پرآوری برای ایجاد رشد طولی به محیط‌های کشت به میزان دو میلی‌گرم در لیتر جیبرلین افزوده شد. جیبرلین در بزرگ شدن سلول نقش دارد که موجب افزایش طول میان‌گره می‌شود. سایتوکنین با افزایش تقسیم سلولی بر تعداد گیاه می‌افزاید. همچنین گزارش شده سایتوکنین موجب تحریک توسعه سلولی نیز می‌شود بزرگ شدن سلول به‌دلیل جذب آب که به‌وسیله کاهش پتانسیل اسمزی سلول تحریک شده و تبدیل لیپیدها به قندهای کاهشی (گلوکز و فروکتوز) صورت می‌گیرد (Arteca, 1996). به‌طور متوسط هر ریزنمونه بسته به محیط کشت و نوع رقم بین ۱/۵ تا ۴ شاخه (طول هر شاخه بین ۰/۵ تا ۱ سانتی‌متر) تولید می‌کند. یک گزارش اخیراً نشان داد که ترکیب ۴mg/l از GA3 به همراه غلظت‌های بالای BA (۱یا ۲ میلی‌گرم در لیتر) طول شاخه را بهبود می‌بخشد و باعث کاهش آبکی شدن در رقم ببکو[۱] می‌شود (Jain and Haggman, 2007). به‌طور کلی منحنی غلظت مصرفی تنظیم کننده‌های رشد گیاهی به شکل زنگوله‌ای است. غلظت‌های پایین‌تر اثرات تحریک کننده دارند به حدی که به ماکزیمم می‌رسد بعد از آن اثر بازدارنده از خود نشان می‌دهد (Arteca, 1996). ذوالفقاری نسب و همکاران نیز گزارش کردند استفاده از یک میلی‌گرم در لیتر بنزیل آدنین در محیط

۱- Bebecou

WPM بیشترین تعداد شاخه را داشت که در این پژوهش غلظت یک میلی‌گرم در لیتر BAP بیشترین تعداد شاخه و غلظت‌های بالاتر اثر منفی بر تعداد شاخه داشت.

بیشترین تعداد شاخه در رقم رجبعلی در غلظت یک میلی‌گرم در لیتر و کمترین تعداد شاخه در رقم قوامی با غلظت ۰/۵ میلی‌گرم درلیتر مشاهده شد (شکل ۴-۱۱).



شکل ۴-۱۱ اثر تنظیم کننده رشد گیاهی BAP بر تعداد شاخه پرآوری شده چهار رقم زردآلو

در ارقام قوامی و رجبعلی در غلظت یک میلی‌گرم در لیتر به ترتیب بیشترین مقدار ۳ و ۶ عدد و کمترین مقدار در رقم قوامی و رجبعلی در غلظت ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر به‌ترتیب برابر ۱/۶۶ و ۲ عدد شاخه پرآوری شده دیده شد. اما در رقم قوامی بین غلظت‌های ۲ و ۰/۵ اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد (شکل ۴-۱۱).

در ارقام جعفری و خیوه‌ای بیشترین مقدار در غلظت ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر به ترتیب به تعداد ۲/۶ و ۳/۳ عدد و کمترین مقدار در رقم جعفری در غلظت دو میلی‌گرم در لیتر ۲ عدد و در رقم خیوه‌ای در غلظت یک میلی گرم در لیتر ۲/۳ عدد مشاهده شده است.

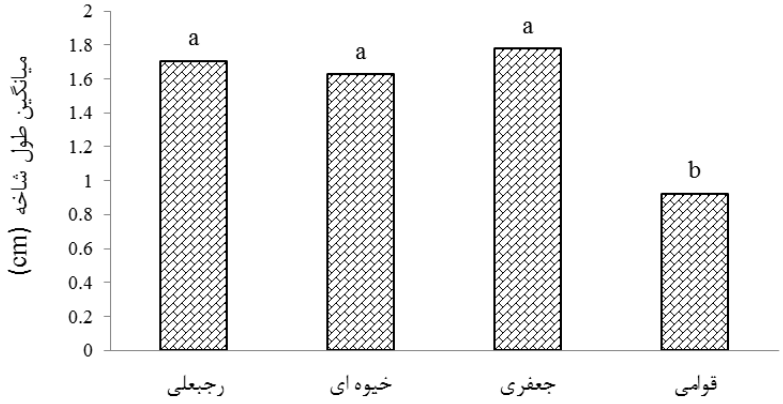
بر طبق شکل ۴-۱۱ تاثیر تنظیم کننده رشد گیاهی روی ارقام رجبعلی و قوامی به‌طور یکسان عمل کرده در غلظت یک میلی‌گرم در لیتر بیشترین مقدار و در غلظت دو میلی‌گرم در لیتر کمترین مقدار دیده شد. در رقم جعفری این روند به‌صورت کاهشی نمایان شد. رقم خیوه‌ای اثری معکوس

نسبت به ارقام قوامی و رجبعلی داشت و در غلظت یک میلی‌گرم در لیتر کاهش دیده شد. تفاوت در تاثیر تنظیم کننده رشد گیاهی در ارقام مختلف نشان دهنده تاثیر ژنوتیپ است.

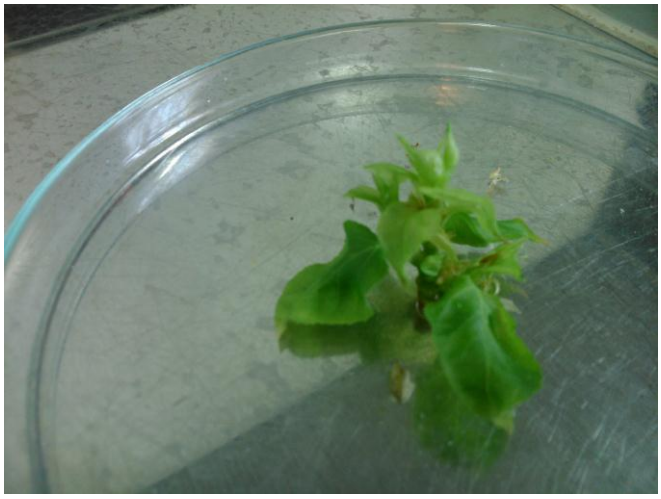
تعداد شاخه‌های جدید هر ریزنمونه در حضور افزایش غلظت بنزیل آدنین افزایش یافته و بهترین نتیجه به‌دست آمده با ۱-۴ میلی‌گرم در لیتر بنزیل آدنین بود (Yildrim *et al.*, 2011). از طرفی مورای و همکاران (۱۹۹۷) مشاهده کردند غلظت‌های بالاتر بنزیل آدنین موجب کاهش تعداد شاخه تولید شده در زردآلو می‌شود. تعداد شاخه‌های زردآلو با افزایش سطح بنزیل آدنین به میزان یک میلی‌گرم در لیتر در ارقام قوامی و رجبعلی افزایش یافت و با افزایش غلظت به میزان دو میلی‌گرم در لیتر تعداد شاخه در ارقام قوامی، رجبعلی و جعفری کاهش معنی‌داری داشت. همان‌طور که قبلا گفته شد کاهش تعداد شاخه با افزایش غلظت نشان دهنده تاثیر ژنوتیپ است که در ارقام ما نیز مشاهده شد. این تفاوت در رقم رجبعلی در غلظت یک میلی‌گرم در لیتر به‌طور واضح نشان داده شد (شکل ۴-۱۱).

بهترین نتایج پرآوری به‌دست آمده در رقم زردآلو کانینو با غلظت ۴ میلی‌گرم در لیتر بنزیل آدنین گزارش شده است (Perez-Tornero *et al.*, 2000b) در صورتی‌که در ارقام دیگر زردآلو یک کاهش پرآوری را در غلظت ۲ میلی‌گرم در لیتر مشاهده شد که ناشی از اثر ژنوتیپ می‌باشد (Marino *et al.*, 1993; Murai *et al.*, 1997). نتایج این تحقیق نیز نشان داد که با افزایش غلظت BAP به میزان دو میلی‌گرم در لیتر تقریبا در تمام ارقام مورد بررسی تعداد شاخه پرآوری شده به طور معنی‌داری کاهش یافت و مناسب‌ترین غلظت BAP برای پرآوری بسته به رقم بین ۰/۵ تا ۱ میلی‌گرم در لیتر است.

رقم جعفری بیشترین طول شاخه به میزان ۱/۷۷ سانتی‌متر و کمترین طول شاخه در رقم قوامی با میانگین۰/۹۲ سانتی‌متر مشاهده شد. بین ارقام رجبعلی و خیوه‌ای اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد (شکل ۴-۱۳، شکل ۴-۱۲).

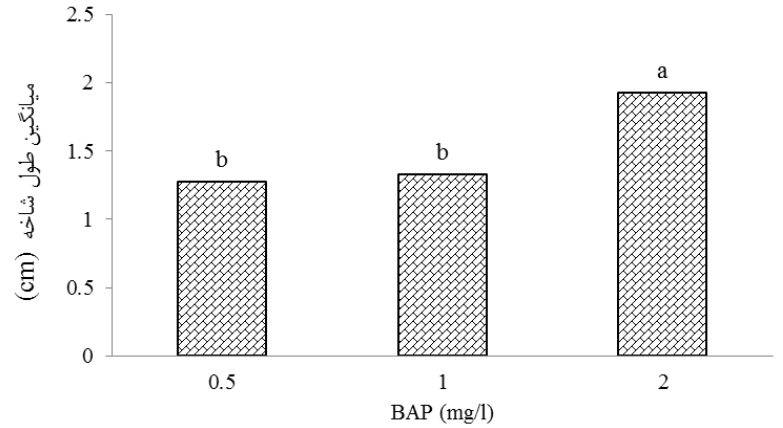


شکل ۴-۱۲ میانگین طول شاخه تولید در چهار رقم زردآلو در شرایط کشت بافتی



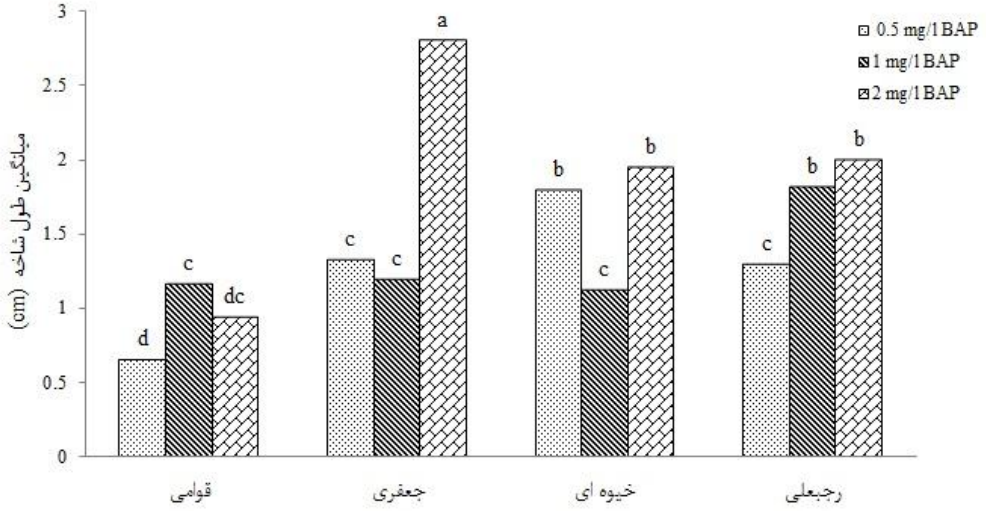
شکل ۴-۱۳ شاخه زردآلو رقم رجبعلی بعد از یک ماه در غلظت دو میلی‌گرم در لیتر BAP

در غلظت دو میلی‌گرم در لیتر از BAP بیشترین طول شاخه با میانگین ۱/۹۲ سانتی‌متر و کمترین طول شاخه در غلظت ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر برابر ۱/۲۷ سانتی‌متر مشاهده شد (شکل ۴-۱۴).



شکل ۴-۱۴ تاثیر BAP بر میانگین طول شاخه زردآلو در شرایط کشت درون‌شیشه‌ای

بیشترین طول شاخه در تیمار دو میلی‌گرم در لیتر BAP در رقم جعفری به میزان ۲/۸ سانتی‌متر و کمترین در غلظت ۰/۵ میلی‌گرم در لیترBAP در رقم قوامی به میزان ۰/۶۶ سانتی‌متر مشاهده شد (شکل ۴-۱۵)



شکل ۴-۱۵ اثر تنظیم کننده رشد گیاهی BAP بر طول شاخه پرآوری شده چهار رقم زردآلو

در ارقام رجبعلی، جعفری و خیوه‌ای بیشترین طول شاخه مربوط به غلظت دو میلی‌گرم در لیتر به ترتیب برابر ۲، ۲/۸ و ۱/۹۵ سانتی‌متر مشاهده شد و کمترین مقدار در رقم رجبعلی در غلظت ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر ۱/۳ سانتی‌متر و در ارقام جعفری و خیوه‌ای در غلظت یک میلی‌گرم در لیتر به ترتیب ۱/۱۹ و ۱/۱۳ سانتی‌متر دیده شد (شکل ۴-۱۵). در رقم قوامی بر خلاف سایر ارقام بیشترین طول شاخه در غلظت ۱ میلی‌گرم در لیتر مشاهده شد (شکل ۴-۱۵).

طول شاخه در رقم رجبعلی با افزایش غلظت مصرفی افزایش یافت اما در رقم قوامی یک کاهش در غلظت دو میلی‌گرم در لیتر مشاهده شد. ارقام خیوه‌ای و جعفری نتایج مشابه داشتند و یک کاهش در غلظت یک میلی‌گرم در لیتر در آن‌ها مشاهده شد همچنین این دو رقم اثر معکوسی نسبت به رقم قوامی داشتند (شکل ۴-۱۵).

در رقم قوامی بیشترین طول شاخه در غلظت یک میلی‌گرم در لیتر و کمترین مقدار در غلظت ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر را نشان داد در حالی که در سایر ارقام غلظت دو میلی‌گرم در لیتر طول شاخه بهتری تولید کرد.

پرز-تورنر و همکاران (۱۹۹۹) اظهار داشتند زمانی‌که ارقام کانینو[۱] و کورت[۲] در محیط با ۴ میلی‌گرم در لیتر جیبرلین به همراه دو میلی‌گرم در لیتر BA قرار گرفتند بیشترین طول شاخه را داشتند. جیبرلین در غلظت‌های مختلف به‌صورت اثر متقابل در ژنوتیپ بر تولید شاخه‌های بزرگتر اثر دارد؛ همچنین در غیاب تنظیم کننده رشد گیاهی جیبرلین و بنزیل آدنین شاخه‌ها خیلی کوچک باقی می‌مانند. نتایج این پژوهش نیز نشان داد که در غلظت کم BAP طول شاخه‌ها کمتر رشد می‌کند. به‌هرحال طول شاخه در غلظت‌های مختلف بنزیل آدنین در ارقام مختلف نتایج متفاوتی دارد به‌طوری که مارینو و همکاران (۱۹۹۳) گزارش کردند غلظت ۰/۵ میلی‌گرم بنزیل آدنین بهترین نتیجه را در رقم پورتیچی و سان کسترز[۳] دارد. تاثیر مثبت بنزیل آدنین و جیبرلین روی تکثیر شاخه در گونه‌های چوبی دیگر نیز به‌وسیله والز و بوکسوس[۴] (۱۹۸۷) نیز گزارش شد.

تعداد شاخه در شکل ۴-۸ و طول شاخه در شکل ۴-۱۲ در رقم قوامی کمترین مقدار را دارد. تاثیر تنظیم کننده رشد گیاهی در شکل ۴-۱۰ بر تعداد شاخه به‌صورت زنگوله‌ای شکل است و همان‌طور که گفته شد مشابه اثر تنظیم کننده رشد گیاهی در گیاهان مختلف است اما در شکل ۴-۱۴طول شاخه روندی افزایشی دارد با افزایش غلظت تنظیم کننده رشد گیاهی طول شاخه بزرگتر می‌شود به‌دلیل تاثیر تنظیم کننده رشد گیاهی جیبرلین بر افزایش طول میان‌گره می‌باشد.

در رقم قوامی تاثیر تنظیم کننده رشد گیاهی بر تعداد و طول شاخه به‌صورت مشابه دیده شد (شکل ۴-۱۵ و شکل ۴-۱۱). همچنین در رقم خیوه‌ای اثر مشابهی بین تعداد و طول شاخه وجود دارد که تاثیر آن برعکس نمودار قوامی می‌باشد. رقم رجبعلی در نمودار طول شاخه به‌صورت افزایشی اما در تعداد شاخه به‌صورت زنگوله‌ای شکل مشابه رقم قوامی دیده شد. طول شاخه در رقم جعفری مشابه رقم خیوه‌ای است اما در تعداد شاخه‌ها یک روند کاهشی مشاهده شد (شکل ۴-۱۵ و شکل ۴-۱۱).

۱- Canino
۲- Currot
۳- San Castrese and Portici
۴- Valles and Boxus

یک رابطه بین طول و تعداد شاخه وجود دارد که در منابع مختلف به آن اشاره شده است. رزاتی[1] و همکاران (۱۹۸۰) در ریزازدیادی آلوی ژاپنی، پرز– تورنرو[2] و همکاران (۲۰۰۰) در ریزازدیادی زردآلوی رقم کانینو و ذوالفقاری نسب و همکاران (۱۳۸۳) بر روی ریزازیادی دورگه زردآلو×گوجه نشان دادند که با افزایش غلظت BAP و افزایش شدت بازازیی و تعداد شاخه، طول شاخساره‌ها در حداقل بود به‌طوری که برای دستیابی به شاخساره‌های با طول مناسب، لازم بود ۲ تا ۳ بار واکشت در طول مرحله پرآوری انجام شود.

۴-۵- آزمایش سوم- ریشه‌زایی

در بیشتر مطالعات انجام شده در ریزازدیادی ارقام زردآلو ریشه‌دهی آسان در کشت درون‌شیشه‌ای گزارش شده است (Pérez-Tornero and Burgos, ; Perez-Tornero *et al.*, 2000b 2000a) اگرچه میزان ریشه‌دهی بسته به ژنوتیپ متفاوت است. همچنین برای بهتر ریشه دادن زردآلوها یک دوره القای تاریکی مناسب است (Perez-Tornero *et al.*, 2000b) از این رو در این پژوهش از ذغال فعال به منظور تاریک نمودن محیط کشت استفاده شد. زردآلوهای کشت شده در مرحله پرآوری به محیط ریشه‌زایی منتقل شدند اما متاسفانه به دلیل وجود آلودگی درونی بعد از ۲۰ روز کشت اکثریت نمونه‌ها از بین رفتند.

همان‌طور که قبلا نیز اشاره شد آلودگی مشکل جدی در کشت بافت است. وجود این پاتوژن‌ها در گیاه مادری اهمیت کمتری دارد؛ چون باکتری‌ها و قارچ‌ها در محیط غنی از مواد غذایی و ساکارز قرار می‌گیرند به سرعت رشد می‌کنند. عوامل درونی ممکن است پس از کشت ظهور پیدا نکند همچنین آلودگی درونی موجب کاهش رشد نیز می‌شود. این میکروارگانیسم‌ها با گیاهان کشت شده بر سر تغذیه رقابت می‌کنند و با افزایش تراکم و تولید ترکیبات سمی، سبب افزایش مرگ و میر، نوسان در رشد، نکروز بافت، کاهش شاخه‌زایی و ریشه‌دهی و به‌طور کلی سبب کاهش بازده تولید و حتی بازدارندگی کامل از کشت می‌گردند (گوران و همکاران، ۱۳۹۲).

۱- Rosati

۲- Perez-Tornero

۴-۶- نتیجه‌گیری

ارقام زردآلو به طور موثر با روش‌های اصولی ریزازدیادی شد که در اینجا توضیح داده شده است. شناسایی کشت درون‌شیشه‌ای و استقرار بهتر انجام می‌شود اگر شاخه‌های جانبی به عنوان ریزنمونه اصلی استفاده شود.

نتایج نشان داد در مرحله استقرار تفاوتی بین استفاده از دو محیط کشت MS و WPM وجود ندارد، همچنین فلس‌برداری در طول فصل زمستان کمک زیادی به باز شدن جوانه‌ها در این مرحله می‌کند. از نظر درصد جوانه‌زنی بین ژنوتیپ‌های مختلف در محیط MS در طول فصل بهار تفاوت وجود دارد. بیشترین درصد جوانه‌زنی جوانه‌های خفته در رقم رجبعلی در فصل زمستان در حالت فلس‌برداری به‌طور میانگین ۶۲/۷۷ درصد و در فصل بهار به میزان ۷۶/۶۶ درصد مشاهده شد.

استفاده از محیط WPM برای کشت زردآلو در مرحله پرآوری مفید است. استفاده از بنزیل آدنین به همراه جیبرلین در افزایش طول شاخه و پرآوری زردآلو تاثیر زیادی دارد. بهترین طول شاخه در غلظت دو میلی‌گرم در لیتر بنزیل آدنین و دو میلی‌گرم در لیتر جیبرلین در رقم جعفری و کمترین طول شاخه در غلظت نیم میلی‌گرم در لیتر در رقم قوامی حاصل شده است. بیشترین تعداد شاخه در غلظت یک میلی‌گرم در لیتر بنزیل آدنین به همراه ۰/۰۵ میلی‌گرم در لیتر ایندول بوتریک اسید در رقم رجبعلی و کمترین تعداد شاخه در غلظت نیم میلی‌گرم در لیتر در رقم قوامی مشاهده شده است.

در مرحله ریشه‌زایی از محیط کشت نصف غلظت MS استفاده شد. به دلیل وجود آلودگی درونی پس از ۲۰ روز کشت اکثر نمونه‌ها از بین رفتند.

۴-۷- پیشنهادات

- ✓ به‌دلیل آلودگی درونی زیاد در درختان میوه کشت مریستم توصیه می‌شود به‌دلیل سرعت تکثیر بالا نسبت به ویروس.
- ✓ استفاده از سوربیتول به عنوان منبع کربنی به‌دلیل افزایش سرعت پرآوری جایگزین ساکارز می‌شود.
- ✓ استفاده از تنظیم کننده رشد گیاهی‌های سایتوکنینی کاینتین، زآتین، 2ip و بررسی تاثیر تنظیم کننده رشد گیاهی‌ها بر مرحله پرآوری.
- ✓ بررسی اثر محیط کشت‌های MS, Knops برای مرحله پرآوری زردآلو.
- ✓ استفاده از تنظیم کننده رشد گیاهی‌های اکسینی NAA, IBA برای مرحله ریشه‌زایی.
- ✓ استفاده از روش فلس‌برداری در طول فصل زمستان و کشت بافت در خارج از فصل رشد.
- ✓ برطرف کردن نیاز سرمایی شاخه‌های یکساله رویشی در یخچال سپس انجام مراحل کشت بافت.
- ✓ به‌دلیل وجود آلودگی زیاد در کشت درختان استفاده از نهال‌های یکساله و ضدعفونی با استفاده از کلرید جیوه نیز پیشنهاد می‌گردد.

فهرست منابع

۵- منابع

احسان‌پور، ع. ا. و امینی، ف. **(۱۳۸۰)**. کشت سلول و بافت گیاهی. چاپ اول. انتشارات جهاد دانشگاهی اصفهان.

اشکان، م. (۱۳۸۲). بیماریهای درختان میوه هسته‌دار. ترجمه. انتشارات مرکز نشر دانشگاهی. ص ۴۱۶.

باقری، ع. **(۱۳۷۶)**. مبانی کشت بافت گیاهی. ترجمه. انتشارات دانشگاه فردوسی مشهد.

سلطانی، ا. **(۱۳۸۷)**. دایره المعارف طب سنتی گیاهان دارویی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی ایران، جلد ۱، ص:۲۴۴

سیاری، م. **(۱۳۸۳)**. تولید میوه‌های معتدله و نیمه گرمسیری. ترجمه انتشارات دانشگاه ایلام. ص ۲۹۳-۳۰۰.

جلیلی مرندی، ر. **(۱۳۸۷)**. میوه‌کاری، انتشارات جهاد دانشگاهی واحد آذربایجان غربی. چاپ چهارم. ص ۱۴۳-۱۴۴.

خبرگزاری مهر. **(۱۳۹۲)**. (http://www.Mehrnews.com)

خوشخوی، م. **(۱۳۷۳)**. فنون کشت بافت برای گیاهان باغبانی. چاپ اول. انتشارات دانشگاه شیراز.

دژم‌پور، ج. گریگوریان، و. مجیدی ا و اصغرزاده، ن. **(۱۳۸۶)**. گندزدایی، استقرار و پرآوری درکشت درون شیشه ای چند دو رگه بین گونه ای در جنس پرونوس. **مجله علوم و فنون باغبانی ایران**. جلد ۸ شماره ۳ ص ۱۶۵ تا ۱۷۴.

ذوالفقاری نسب، ر. خسروشاهلی، م. گریگوریان، م. و مطلبی آذر، ع. **(۱۳۸۳)**. بررسی افزایش درون شیشه‌ای دورگه طبیعی زردآلو× گوجه. **مجله علوم و فنون باغبانی ایران**. جلد ۵ شماره ۲ ص ۸۱ تا۹۲.

رسول زادگان، ی. **(۱۳۷۵)**. میوه کاری در مناطق معتدله. انتشارات دانشگاه صنعتی اصفهان. چاپ دوم. ص .۹۶

طلایی، ع. **(۱۳۷۷)**. فیزیولوژی درختان میوه مناطق معتدله. انتشارات دانشگاه تهران.

فارسی، م. ذوالعلی، ج. **(۱۳۹۰)**. اصول بیوتکنولوژی گیاهی. ترجمه انتشارات دانشگاه فردوسی مشهد.

فرشاد فر، م. بخشی خانیکی، غ. **(۱۳۸۹)**. مبانی بیوتکنولوژی و کشت بافت گیاهی، دانشگاه پیام نور، دانشکده علوم کشاورزی. ص ۲۲۹.

کمالی، ک. مجیدی ا. و ضرغامی، ر. **(۱۳۸۰)**. تعیین مناسبترین محیط کشت و شرایط رشد جهت ریزازدیادی. پایه‌های رویشی GF677 (هیبرید هلو×بادام). **مجله نهال و بذر**. ۱۷ص ۳۸ تا ۴۷.

گوران، ع. مظفری، ع. ا. قادری، ن. **(۱۳۹۲)**. بررسی اثر ترکیبات مختلف ضدمیکروبی روی ضدعفونی سطحی ریزنمونه انگور .*Vitis vinifera* L در شرایط درون‌شیشه‌ای. **ششمین همایش یافته‌های پژوهشی کشاورزی- دانشگاه کردستان**.

میری، س. واعظ لیواری، م. ب. خلیقی، ا و قائم مقام، س .ع. **(۱۳۸۲)**. کاهش اکسیداسیون فنولی و پرآوری درون‌شیشه‌ای شاخساره همگروه های سیب M9 و M26. **مجله علوم و فنون باغبانی ایران**. ۱۴۵-۱۵۴ :۴

Aliyu, O.M., **(2005)**. Application of tissue culture to cashew (Anacardium occidentale) breeding: an appraisal. **African J Biotechnology**. 13, 1485-1489.

Armeniacae, S. (**2007)**. Who monographs on selected medicinal plants (World Health Organization). Department of Technical Cooperation for Essential Drugs and Traditional Medicine. Vol 3, 390.

Arteca, R.N. **(1996)**. Plant Growth Substances Principles and Applications. **Springer**. 332pp.

Asanuma, N and Shibamoto, K. (**1968)**. In: K. Inoue (ed.). Encycropedia of Hotriculture. Seibundo-Shinkousha Pub., Tokyo. (In Japanese). 122-126.

Asma, B.M. **(2000)**. Kayısı yetiştiriciliği. Evin matbaası.Malatya. 243pp.

Bagheri, M., Ziaratnia, M and Hosseini, M. **(2004)**. In vitro Culture of Trees. Ferdowsi Univ. Press: 245 (Translated in Persian).

Balla, I and Vertesy, J. **(2001)**. In vitro culture of Hungarian apricot (*Prunus armeniaca* L.) varieties. **Acta Hort**. 560, 395-398.

Batrish, I.V and Korkhovoi, I.V. **(1997)**. The composition of nutrient medium and the efficiency of shoot induction in vitro from apple leaf explants, Russ. **J. Plant Physiol**. 44, 381-385.

Block, R., Lankes, C. **(1996)**. Measures to prevent tissue browning of explants of apple rootstock M.9 in vitro establishment. **Gartenbauwisssenschaft**. 61, 11-17.

Bonga, J.M and Durzan, D.J. **(1982)**. Tissue Culture in Forestry. **Springer**.

Bouza, L., Jacques, M., MazieÁre, Y and Arnaud, Y. **(1992)**. In vitro propagation of Prunus tenella Batsch cv Firehill_Control of vitrification_Increase of the multiplication rate and growth by chilling. **Sci. Hort. Amsterdam**. 52, 143-155.

Boxus, E and Druart, E. **(1986)**. Virus-free Through Tissue Culture. . In: Y. E S. Bajaj, ed. Biotechnology in Agriculture and Forestry. Trees I. Berlin Heidelberg, New York: **Springer-Verlag**. 1, 24-30.

Burgos, L and Alburquerque, N. **(2003)**. Ethylene inhibitors and low kanamycin concentrations improve adventitious regeneration from apricot leaves. **Plant Cell Reports**. 21, 1167-1174.

Campbell, R. **(1985)** Plant Microbiology, Arnold, London, p. 191

Cassells A.C. **(2001)** Contamination and its impact on tissue culture. **Acta Hortic**. 560: 353‑359

Channuntapipat, C.h., Sedgley, M. and Collins, G. **(2003)**. Micropropagation of almond cultivars ‘Non pareil’ and ‘Ne Plus Ultra’ and the hybrid rootstock Titan × Nemagard. **Sci. Hort**. 98:473-484.

Debergh, P.C. **(1983)**. Effects of agar brand and concentration on the tissue culture medium. **Physiol. Plant**. 59, 270-276.

Debergh, P.C. **(1987)**. Improving micropropagation. **Intl. Assoc. plant tissue culture Newsletter**. 51, 2-10.

Declerck, V and Korban, S.S. **(1996)**. Influence of growth regulators and carbon sources on callus induction, growth and morphologenesis from leaf tissues of peach (*prunus persica* L Batsch). **J. Hort. Sci**. 71, 49-55.

Dennis, F.G and Edgerton, L.J. **(1961)**. The relationship between an inhibitor and rest in peach flower buds. Proceedings**. J. Ame. Soc. Hort. Sci**. 77, 107-116.

Dutcher, R.D and Powell, L.E. **(1972)**. Culture of apple shoots from buds in vitro. **J. Amer. Soc. Hort. Sci**. 97, 511-514.

Erbenova, M., Paprstein, F and Sedlak, J. **(2001)**. In vitro propagation of dwarfed rootstocks for sweet cherry. **Acta Hort**. 560, 477-480.

Faustm, M., Suranyi, D and Nyujto, F. **(1998)**. Origion and dissemination of apricot. **In: Janick (ed) Horticultural Reviews**. 22, 225-266.

Gaspar, T., Kevers, C., Debergh, P., Maene, L., Paques, M and Boxus, P. **(1987)**. Vitrification: morphological, physiological and ecological aspects. **Springer**. 152-166.

Gebhardt, K. **(1983)**. In vitro Kultur von Kimbeeren: Massenermehrung und Eignung for den Gatterichen Anbau. **Mitt. Klosterneuburg Rebe Wein Obstbau Fruchwertung**. 33, 24-30.

Gentile, A., Monticelli, S and Damiano, C. **(2002)**. Adventitious shoot regeneration in peach (*Prunus persica* L.) Batsch. **Plant Cell Reports**. 20, 1011-1016.

Georgios, K and Miltiadis, V. **(2006)**. Improvement of in vitro propagation of apricot cultivar 'Bebecou'. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**. 85, 173–180.

Ghashghaie, J., Brenckmann, F and Saugier, B. **(1991)**. Effects of agar concentration on water status and growth of rose plants cultured in vitro. **Physiol. Plant**. 82, 73-78.

Harada, H and Murai, Y. **(1996)**. Micropropagation of Prunus mume. **Plant Cell Tiss. Org**. 46, 265–267.

Hartmann, H.T and Kester, D.E. **(1975)**. Plant propagation, principles and practices. **Prentice-Hall, Englewood Cliffs, NJ**.

Hatchinsun, F.J. and Zimmerman, H.R. **(1987)**. Tissue culture of temperate fruit and nut trees. In: J. Janick,(ed.). **Horticultural Reviews**. Van Nostrand Reinhild Company Inc.9, 37-349 p.

Hemaid I.A, S. **(2012)**. In vitro propagation of apricot *(Prunus armeniaca* L.) and assessment of genetic stability of micropropagated plants using RAPD analysis. **World Applied Sciences Journal**. 19, 674-687.

Hokanson, K.E and Pooler, M.R. **(2000)**. Regeneration of ornamental cherry (*Prunus*) taxa from mature stored seed. **HortScience**. 35, 745-748.

Huang, L.C., Lee, Y.L., Huang, B.L., Kou, C.I and Shaw, J.F. **(2002)**. High polyphenol oxidase activity and low titratable acidity in browning bamboo tissue culture. **In Vitro Cellular & Development Biology-Plant**. 38: 358-365.

Issam, A., Hassaballa, Moughieth, M.G., Hagagy, N.A and Zagazig Univ, N.S. **(1996)**. Micropropagation of Two apricot (*Prunus armeniaca* L) cultivars. **Egypt Hort Science**. 31, 131-132.

Jain, S.M and Haggman, H. **(2007)**. Protocols for micropropagation of woody trees and fruits. **Springer**. 267-278.

Janick, J. **(1974)**. The apple in Java. **Hort. Sci**. 9, 13-15.

Johansson, L. **(1983)**. Effects of activated charcoal in anther cultures. **Physiologia Plantarum**. 59, 397–403.

Kataeva, N.V and Kramarenko, M.A. **(1989)**. Clonal micropropagation of apricot **Byuletten "Glavnogo Botanicheskogo Sada"**. 153 69-73.

Kester, D.E and Asay, R.N. **(1986)**. Hansen 2168 and Hansen 536 two new hybrid rootstocks. **HortScience**. 21, 331-332.

Kramarenko, L.A. **(1999)**. Micropropagation of apricot and field performance of in vitro propagated plants. **Acta Hort**. 488, 417-420.

Kumar, B., Zhang, Y. **(2008)**. Adventitious shoot regeneration from the leaves of some pear varieties (*Pyrus spp*.) grown in vitro. **Front. Agric. China**. 1, 82‑92.

Kunneman-Kooij, W. **(1984)**. Inventarisatie van de toepassingsmogelijkheden van weefselkweek voor vegetatieve vermeerdering van houtige boomkwekerijgewassen hide extra info., 64.

Lang, G.A. **(1989)**. Manipulation of fruiting. C. J. Wright (Ed.). **Butter Words.** , 414.

Lauri, P., Caboni, E and Damiano, C. **(2001)**. In vitro adventitious shoot regeneration from vegetative apices of almond and other Prunus species. **Acta Hort**. 560, 403-406.

Ledbetter, C.A., Peterson, S and Palmquist, D. **(1996b)**. In vitro tolerance of six clonally propagated Prunus accessions. **J Genet Breed**. 50, 1-6.

Leifert, C and Waites, W.M. **(1990)**. Contaminants of plant tissue cultures. In: Newsletter, International Assoc. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**. 60, 2-13.

Loyd, G., McCown, B. **(1980)**. Commercially feasible micropropagation of mountain laurel, Kalmia latifolia, by use of shoot tip culture. **Proc. Int. Plant Prop. Soc**. 30, 421-427.

Mante, S., Scorza, R and Cordts, J.M. **(1989)**. Plant regeneration from cotyledons of Prunus persica, Prunus domestica and Prunus cerasus. . **Plant Cell Tissue and Organ Cult**. 19, 1-19.

Marino, G., Bertazza, G., Magnanini, E and Altan, A.D. **(1993)**. Comparative effects of sorbitol and sucrose as main carbon energy sources in micropropagation of apricot. **Plant Cell Tissue Organ Cult**. 34, 235–244.

Marks, T. and Simpson, S. **(1990)**. Reduced phenolic oxidation at culture initiation in vitro following the exposure of field-grown stockplants to darkness or low levels of irradiance. **Hortic. Sci**. 65: 103-111.

Martinelli, A. **(1985)**. Factors affecting in vitro propagation of the peach_almond hybrids `Hansen 2168' and `Hansen 536'. **Acta Hortic**. 173, 237-244.

Mayer, A.M., Harel, E. **(1979)**. Polyphenol oxidases in plants. **Phytochemistry**. 18, 193-251.

Mielke, E.A and Dennis, F.G. **(1978)**. Hormonal Control of Flower Bud Dormancy in Sour Cherry. III. Effects of Leaves, Defoliation and Temperature on Levels of Abscisic Acid in Flower Primordia. **J. Am. Soc. Hort. Sci**. 103, 446.

Murai, Y., Harada, H and Yamashita, H. **(1997)**. In vitro propagation of apricot (*Prunus armeniaca* L.) cv. 'Bakuoh junkyou'. **J. Jpn. Soc. Hortic**. **Sci** 66, 475–480.

Murashinge, T. **(1974)**. Plant propagation through tissue culture. **Ann. Rev. Plant Physiology**. 25, 135-166.

Murashinge, T., Skoog, F. **(1962)**. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiol. Plant**. 15, 473-497.

Notodimedjo, S., Danoesastro, H., Sastrosumarto, S and Edwards, G.R. **(1981)**. Shoot growth, flower initation and dormancy of apple in the tropics. **Acta Hort**. 120, 179-186.

Paris, R., Pratesi, D and Negri, P. **(2004)**. In vitro morphogenic ability of mature or embriyogenic apricot tissue. **Acta Hort**. 663, 487-490.

Pérez-Tornero, O and Burgos, L. **(2000)**. Different media requirements for micropropagation of apricot cultivars. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**. 63, 133–141.

Perez-Tornero, O., Burgos, L and Egea, J. **(1999)**. Introduction and establishment of apricot in vitro through regeneration of shoots from meristem tips. **In Vitro Cell. Dev. Biol.--Plant**. 35, 249-253.

Pérez-Tornero, O., Egea, J., Olmos, E and Burgos, L. **(2001)**. Control of hyperhydricity in micropropagated apricot cultivars. **In vitro Cell Develo Biol – Plant**. 37, 250–254.

Pérez-Tornero, O., Egea, J., Vanoostende, A and Burgos, L. **(2000a)**. Assessment of factors affecting adventitious shoot regeneration from in vitro cultured leaves of apricot. **plant science**. 158, 61-70.

Perez-Tornero, O., Lopez, M., Egea, J and Burgos, L. **(2000b)**. Effect of basal media and growth regulators on the in vitro propagation of apricot (*Prunus armeniaca* L.) cv. "Canino". **Journal of Horticultural Science & Biotechnology**. 75, 283-286.

Petri, C., Alburquerque, N and Burgos, L. **(2005)**. The Effect of aminoglycoside antibiotics on the adventitious regeneration from apricot leaves and selection of NptII-transformed leaf tissue. . **Plant Cell Tissue and Organ Culture**. 80, 271-276.

Pierik, R.L.M. **(1975)**. Plantenteelt in kweekbuizen. Thieme, Zutphen, the Netherland. 164.

Powell, L.E. **(1987)**. Hormonal aspects of bud and seed dormancy temperate zone woody plants. **HortScience**. 22, 845-850.

Reighard, G.L., Cain, D.W and Newall, W.C. **(1990)**. Rooting and survival potential of hardwood cuttings of 406 species, cultivars, and hybrids of Prunus. **HortScience**. 25, 517–518.

Rodriguez, E.A., Canal, M.J and Sanchez Tames, R. **(1991)**. Seasonal changes of plant growth regulator in corylus. **J. Plant Physiol**. 138, 29-32.

Rosati, P., Marino, G and Swierczewski, C. **(1980)**. In vitro propagation of Japanese plum (*Prunus salicina Lindl.* cv. Calita). **J. Amer. Soc. Hort. Sci**. 105, 129-129.

Rugini, E and Verma, D.C. **(1982)**. Micropropagation of difficult-to-propagate almond *(Prunus amygdalus*, Batsh) cultivar. **Plant Sci. Lett**. 28, 273-281.

Ruzic, D., Saric, M., Cerovic, R. and Culafic, L. **(2000)**. Relationship between the concentration of macroelements their uptake and multiplication of cherry rootstock Gisela 5 in vitro. **Plant Cell. Tiss. Org. Cult**. 63:9-14.

Schmidt, H and Ketzel, A. **(1996)**. In vitro techniques in sweet cherry breeding. **Acta Hort**. 410, 111-114.

Seeley, S.D and Powell, L.E. **(1981)**. Seasonal changes of free and hydrolyzable abscisic acid in vegetative apple bud. **J. Am. Soc. Hort. Sci**. 106, 405-409.

Singha, S and Powell, L.E. **(1978)**. Response of apple buds cultured in vitro to abscisic acid. **J. Am. Soc. Hort. Sci**. 103, 620-622.

Skirvin, R.M., Chu, M.C and Rukan, H. **(1979)**. Tissue culture of peach, sweet and sour cherry and apricot shoot tips. **Trans Illi State Horti Soc**. 113, 30-38.

Snir, I., **(1982)**. In vitro propagation of 'Canino' apricot. **Hort. Sci**. 19 229-230.

Snir, I. **(1984)**. In vitro propagation of ‘Canino’ apricot. **HortScience**. 19, 229-230.

Srinivasan, C., Isabel, M.G and Scorza, R. **(2005)**. Prunus spp. almond, apricot, cherry, nectarine, peach and plum, in: Biotechnology of fruit and nut crops. . **Biotechnology in Agriculture No**. 29 512-542.

Swartz, H.J., Geyer, A.S., Powell, L.E and Lin, S.C. **(1984)**. The role of bud scales in the dormancy of apples. **J. Am. Soc. Hort. Sci**. 109, 745-749.

Tabachnik, L and Kester, E.K.D. **(1977)**. Shoot culture for almond and almond–peach hybrid clones in vitro. **HortScience**. 12, 545-547.

Thibault, B and Herman, L. **(1982)**. Culture of Bartlett on its own roots: comparisons with quince and French seedling rootstocks. **Acta Hortic**. 124 21-26.

Turkstat. **(2009)**. PrimeMinistry of Turkey, Turkish Statistical Institute. (www.tuik.gov.tr).

Valles, M and Boxus, P. **(1987)**. Micropropagation of several *Rosa hybrida* L. cultivars. **Acta Hortic**. 212, 611–617.

Vanderschaeghe, A.M and Debergh, P.C. **(1987)**. Technical aspects of the control of the relative humidity in tissue culture containers. **Medelingen van de Faculteit Landbouwwetenschappen Rijksuniversitat Gent**. 52, 1429–1437.

Vaughn, K.C. and Duke, S. **(1984)**. Function of polyphenol oxidase in higher plants. **Physiol Plant**. 60: 106-112.

Viss, P.R., M Brooks, E and Driver, J. A. **(1991)**. A simplified method for the control of bacterial contamination in woody plant tissue culture. **In Vitro Cell. Dev. Biol** 27: 42.

Wang, H., Alburquerqueb, N., Burgosb, L and Petri, C. **(2011)**. Adventitious shoot regeneration from hypocotyl slices of mature apricot (*Prunus armeniaca* L.) seeds: A feasible alternative for apricot genetic engineering. **Scientia Horticulturae**. 128, 457–464.

Wood, B.W. **(1993)**. Hydrogen cyanamide advances pecan bud-break and harvesting. **J. Amer. Soc. Hort. Sci**. 118, 690-693.

Yigit, D., Yigit, N and Mavi, A. **(2009)**. Antioxidant and antimicrobial activities of bitter and sweet apricot (*Prunus armeniaca* L.) kernels. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**. 42, 346-352.

Yıldırım, H. **(2006)**. 'Hacıhaliloğlu' kayısı (*Prunus armeniaca* L.) çeşidinin in vitro Çoğaltımı (In vitro propagation of apricot (*Prunus armeniaca* L.) cultivar "Hacıhaliloğlu") Doktora Tezi. **Dicle Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü**. 127.

Yildrim, H., Onay, A., Tilkat, E and Akturk, Z. **(2011)**. Micropropagation of the apricot (*Prunus armeniaca* L.) cv. Hacıhaliloğlu by means of single node culture. **Turk J Agric For**. 35, 55-64.

Zhebentyayeva, T., Ledbetter, C., Burgos, L and Llacer, G. **(2012)**. Fruit Breeding Handbook of Plant Breeding. **Springer**. 8, 415-418.

Zimmerman, R.H and Debergh, P.C. **(1991)**. Micropropagation of temperate zone fruit and nut crops. **Micropropagation: Technology and application. Boston: Kluwer Academic**. 231-246.

بررسی اثر روش های مختلف ضدعفونی در کنترل آلودگی های سطحی و میزان سیاه شدگی بافت درکشت درون شیشه‌ای ریزنمونه گره شاخه زردآلو

زهرا خزاعی کجوری[1*]، مهدی رضایی[2]، ، شاهرخ قرنجیک[2]، حسن قربانی قوژدی[3]

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد علوم باغبانی دانشگاه شاهرود. ۲- استادیار دانشکده کشاورزی دانشگاه شاهرود. ۳- مربی دانشکده کشاورزی دانشگاه صنعتی شاهرود.

چکیده

در این مطالعه مناسب‌ترین روش ضدعفونی سطحی در کشت درون شیشه‌ای زردآلو بررسی شد. مواد گیاهی از رقم جعفری زردآلو در دانشکده کشاورزی دانشگاه صنعتی شاهرود تهیه شد. تیمارهای ضدعفونی بر روی جوانه‌های خفته شاخه‌های یکساله در بهمن ماه شامل: ۱) الکل + اسیدسیتریک ۲) الکل + اسیدسیتریک + کلرید جیوه ۳) الکل + اسیدسیتریک + هیپوکلرید سدیم ۴) الکل + اسیدسیتریک + هیپوکلرید سدیم (مدت زمان ۲۰ دقیقه) + کلرید جیوه، پس از شکسته شدن خواب جوانه در فروردین ماه شامل ۱) کلرید جیوه + اسید سیتریک ۲) الکل ۷۰ درصد + هیپوکلرید سدیم به مدت ۱۰-۱۵-۲۰ دقیقه بود. ریزنمونه‌ها پس از شستشوی سطحی با آب جاری و ضدعفونی، در محیط WPM کشت شدند. نتایج حاصل از آزمایش اول نشان داده است که تیمار اول و چهارم میزان آلودگی باکتریایی متوسط در تیمار دوم زیاد و تیمار سوم خیلی زیاد بوده است. آلودگی قارچی فقط در تیمار اول دیده شده و بقیه بدون آلودگی بودند. سیاه شدن بافت در تیمار اول کم و در تیمار دوم و چهارم متوسط و تیمار سوم بدون سیاه شدگی بوده است. نتایج آزمایش دوم، تیمار اول آلودگی قارچی و باکتریایی به خوبی کنترل شده ولی تمام ریزنمونه‌ها قهوه‌ای شدند؛ در تیمار دوم با افزایش مدت زمان ضدعفونی بوسیله هیپوکلرید سدیم آلودگی بهتر کنترل شده ولی گیاه‌سوزی بیشتری دیده شده است.

کلمات کلیدی: ضدعفونی سطحی، کشت درون شیشه‌ای، زردآلو

مقدمه

آلودگی در کشت‌های درون شیشه‌ای یک مشکل جدی به ویژه در گیاهان چوبی چند ساله است. اولین و بهترین مرحله در استقرار کشت‌های درون شیشه‌ای هر گیاه حذف میکروارگانیسم‌ها است. تکثیر نوک شاخه و شاخه‌های جانبی در مقایسه با ریزنمونه‌های دیگر مثل: مریستم‌ها آسان‌تر است. کشت مریستم اغلب برای تولید گیاهان عاری از ویروس استفاده می‌شود گیاهانی که آلودگی درونی دارند (Cassells, 1991)(و همچنین در ریزازدیادی برای استقرار ریزنمونه‌های ضدعفونی شده توصیه می‌شود.

جلوگیری از آلودگی میکروبی در کشت بافت بستگی زیادی به موفقیت ریزازدیادی دارد. ارگانیسم‌های درونی (انگلی) و بیرونی (قارچی) می‌توانند باعث کاهش شدید رشد گیاهان تکثیر شده در هر مرحله از رشد شوند (Cassells, 1991); (Debergh and Vanderschaeghe, 1988); (Leifert *et al.*, 1991). آلودگی باکتریایی اغلب به سختی تشخیص داده می‌شود به‌دلیل اینکه آنها بیشتر منشا درونی دارند و در بافت گیاهی وجود دارند (Debergh and Vanderschaeghe, 1988)((Viss *et al.*, 1991); (De Fossard and De Fossard, 1988);. گیاهان آلوده شده ممکن است هیچ علائم قابل مشاهده‌ای نداشته باشند، کاهش تکثیر و سرعت ریشه‌دهی یا مرگ (Leifert *et al.*, 1989). افزایش میکروارگانیسم‌ها به‌علت تکنیک ضعیف استریل کردن یا محیط استریل شده نامناسب باشد که می تواند با آموزش یا بررسی محیط اصلاح شود، اما حذف آلودگی‌های درونی مشکل‌تر است (Buckley *et al.*, 1995).

مشکل دوم گیاهان چوبی، قهوه‌ای شدن ریزنمونه‌ها در حین کشت درون شیشه‌ای است. در مقایسه با گیاهان علفی قهوه‌ای شدن در گیاهان چوبی بیشتر دیده می‌شود (Bagheri *et al.*, 2004)، قهوه‌ای شدن بافت‌های گیاهی اغلب به دنبال صدمه دیدن آنها ایجاد می‌گردد و عموماً نتیجه آن نیز از بین رفتن نمونه مورد کشت می‌باشد. به طورکلی قهوه‌ای شدن در گیاهان به وسیله آنزیم پلی فنل اکسیداز (PPO) صورت می‌گیرد (Marks and Simpson, 1990)؛ (Vaughn and Duke, 1984). پیش ماده فنولی این آنزیم در واکوئل‌های سلول‌های گیاهی ذخیره می‌شود و بدین

وسیله حضور جداگانه این مواد در واکوئل‌ها از واکنش قهوه‌ای شدن جلوگیری می‌نمایند، درصورت ورود آسیب به سلول‌های گیاهی این آنزیم و پیش ماده آن با هم مخلوط می‌گردند و قهوه‌ای شدن در بافت رخ می‌دهد. اگر میزان این آنزیم کاهش یابد، از میزان قهوهای شدن بافت‌های گیاهی نیز کاسته می‌شود. جهت جلوگیری از چنین پدیده‌ای می‌توان از آنتی اکسیدانت‌هایی مانند اسید آسکوربیک، اسید سیتریک استفاده نمود (Huang *et al.*, 2002).

مواد و روش‌ها

در این آزمایش جهت بررسی کنترل آلودگی و میزان قهوه‌ای شدن ریزنمونه، از اسید سیتریک، کلرید جیوه، هیپوکلرید سدیم و الکل استفاده شد. برای هر تیمار سه تکرار در نظر گرفته شد و در هر تکرار (شیشه کشت) چهار ریزنمونه کشت گردید.

مواد گیاهی: برای کشت قطعه‌های گرهی از درختان چوبی زردآلوی بالغ رقم جعفری در دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی شاهرود استفاده شد. قلمه ها به طول ۱۰ تا ۱۵ سانتی‌متر تهیه و به آزمایشگاه انتقال داده شد.

تیمارهای ضدعفونی ریزنمونه: قلمه‌های منتقل شده به آزمایشگاه به قطعاتی با یک گره تقسیم شدند. ریزنمونه‌ها را با مایع ظرفشویی به مدت ۱۰ دقیقه شستشو داده سپس به مدت ۲ ساعت در برابر آب جاری قرار می‌دهیم. پس از شستشو ریزنمونه‌ها را به زیر هود منتقل کرده و مراحل ضدعفونی سطحی با تیمارهای مختلف را اعمال می‌کنیم.

تیمارهای ضدعفونی شامل:

آزمایش اول:

۱) الکل ۷۰٪ به مدت ۲ دقیقه + اسیدسیتریک به مدت ۳ دقیقه

۲) الکل ۷۰٪ به مدت ۲ دقیقه + اسیدسیتریک به مدت ۳ دقیقه + کلرید جیوه به مدت ۴ دقیقه

۳) الکل ۷۰٪ به مدت ۲ دقیقه + اسیدسیتریک به مدت ۳ دقیقه + هیپوکلرید سدیم به مدت ۲۰ دقیقه

۴) الکل ۷۰٪ به مدت ۲ دقیقه + اسیدسیتریک به مدت ۳ دقیقه + هیپوکلرید سدیم مدت زمان ۲۰ دقیقه + کلرید جیوه ۴ دقیقه

آزمایش دوم:

۱) پس از شستشو نمونه‌ها به زیر هود منتقل شده سپس با کلرید جیوه (۰.۰۱ درصد) به مدت ۴ دقیقه ضدعفونی کرده پس از شستشو با آب مقطر استریل دو بار با اسید سیتریک (۰.۰۷ درصد) هر بار به مدت ۳ دقیقه ضدعفونی می‌کنیم و در نهایت سه بار با آب مقطر استریل هر با به مدت ۵ دقیقه شستشو می‌دهیم.

۲) ریزنمونه به مدت ده دقیقه در اسید سیتریک قرار گرفته سپس با الکل (۷۰ درصد) به مدت ۲ دقیقه و هیپوکلرید سدیم ۲۰ درصد (ماده موثره ۵ درصد) به مدت (۱۰-۱۵-۲۰) دقیقه ضدعفونی می‌کنیم؛ در نهایت سه بار شستشو با آب مقطر استریل هر با به مدت ۵ دقیقه صورت می‌گیرد.

استقرار ریزنمونه: ریزنمونه‌های ضدعفونی شده را در محیط کشت WPM شامل ۳ درصد ساکارز، ۸ گرم در لیتر آگار به همراه ۲ میلی‌گرم در لیتر تنظیم کننده رشد گیاهی BAP و ۰.۰۴ میلی‌گرم در لیتر IBA منتقل شد. برای ضدعفونی محیط کشت از اتوکلاو در دمای ۱۲۱ درجه به مدت ۲۰ دقیقه استفاده شده است. ریزنمونه‌ها پس از کشت در اتاقک رشد با ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

صفات مورد اندازه گیری: صفات مورد بررسی میزان آلودگی قارچی و باکتریایی برای تعیین بهترین تیمار ضدعفونی و قهوه‌ای شدن ریزنمونه.

نتایج و بحث

در این بررسی، یکی از مشکلات اساسی و محدودکننده در کشت درختان چوبی چندساله، آلودگی محیط‌های کشت، توسط باکتریها و قارچها بود. بنابراین از مواد ضدعفونی کننده مختلفی برای ضدعفونی نمودن ریزنمونه‌ها استفاده شد. مهمترین ماده ضدعفونی کننده‌ای که در اغلب پژوهش‌های کشت بافت استفاده شده است، هیپوکلرید سدیم می‌باشد (Mashayekhi, K. 2001، Mashayekhi, K. and Neumann, K. H. 2006) بنابراین در این پژوهش نیز ابتدا از این

ماده برای گندزدایی ریزنمونه‌ها استفاده شد. بررسی نتایج آزمایش اول پس از ۱۰ روز، ریزنمونه‌های تیمار اول و چهارم کمترین میزان آلودگی را نشان دادند و بیشترین میزان آلودگی در تیمار سوم مشاهده شده است؛ آلودگی قارچی فقط در تیمار اول به مقدار کم دیده شد (جدول ۱). تیمار سوم بدون سیاه شدگی بافت و در تیمار اول به مقدارکم و تیمار دوم و چهارم به میزان متوسط دیده شده است (جدول ۱). آزمایش دوم ریزنمونه‌های تیمار شده با غلظت ۱ درصد هیپوکلرید سدیم به مدت۱۰-۱۵-۲۰ دقیقه، پس از ۷ روز کشت آلودگی ریزنمونه‌ها بررسی شدند. با افزایش مدت زمان استریل کردن به‌طور طبیعی میزان آلودگی کاهش پیدا کرد ولی گیاه‌سوزی و میزان قهوه‌ای شدن در ریزنمونه‌ها بیشتر مشاهده شد(جدول ۲). در تیمار ضدعفونی با کلرید جیوه آلودگی مشاهده نشده ولی تمامی ریزنمونه‌ها قهوه‌ای شدند. مشکل قهوه‌ای شدن در تیمار کلرید جیوه با افزودن ذغال فعال به محیط برطرف می‌شود.

جدول ۱- اثر تیمارهای مختلف ضدعفونی شاخه‌های جانبی بر میزان آلودگی‌های قارچی، باکتریایی و قهوه‌ای شدن بافت در ۱۰ روز پس از کشت در رقم جعفری زردآلو در اسفند ماه

تیمار	آلودگی باکتریایی	آلودگی قارچی	میزان سیاه شدن بافت
محیط کشت فاقد ریز نمونه	۰	۰	۰
الکل+اسیدسیتریک	۳	۱	۱
الکل+اسیدسیتریک+کلرید جیوه	۵	۰	۳
الکل+اسیدسیتریک+وایتکس	۷	۰	۰
الکل+اسیدسیتریک+وایتکس+کلرید جیوه	۳	۰	۳

۰: بدون آلودگی ، ۱: کم، ۳: متوسط، ۵:زیاد، ۷: خیلی زیاد

جدول ۲- اثر تیمارهای مختلف ضدعفونی شاخه‌های جانبی بر میزان آلودگی‌های قارچی، باکتریایی و قهوه‌ای شدن بافت در۷ روز پس از کشت در رقم جعفری زردآلو در فروردین ماه

تیمار	آلودگی باکتری	آلودگی قارچی	سیاه شدن بافت
کلرید جیوه+اسید سیتریک	۰	۰	۷
الکل+وایتکس۱۰ دقیقه	۰	۷	۰
الکل+وایتکس۱۵ دقیقه	۰	۳	۱
الکل+وایتکس۲۰ دقیقه	۰	۱	۳

۰: بدون آلودگی ، ۱: کم، ۳: متوسط، ۵:زیاد، ۷: خیلی زیاد

منابع

Bagheri, M., M. Ziaratnia and M. Hosseini 2004. In vitro Culture of Trees. Ferdowsi Univ. Press: 245 (Translated in Persian).

Buckley, P. M, T. N. De wilde and B. M. Reed 1995. Characterization and identification of bacteria isolated from micropropagated mint plants. In Vitro Cell. Dev. Biol 31: 58-64.

Cassells, A. C. 1991. Problems in tissue culture: culture contamination. In Debergh, P.C. & Zimmerman, R.H. (Eds) Micropropagation. Netherlands: Kluwer Academic Publishers: 31-44.

De Fossard, R. A. and H. De Fossard 1988. Coping with microbial contaminants and other matters in a small commercial micropropagation laboratory. Acta Hort 225: 167-176.

Debergh, P.C. and A.M. Vanderschaeghe 1988. Some symptoms indicating the presence of bacterial contaminants in plant tissue culture. Acta Hort 255: 77-81.

Huang, L. C., Y. L. Lee, B. L. Huang, C. I. Kou and J. F. Shaw 2002. High polyphenol oxidase activity and low titratable acidity in browning bamboo tissue culture. In Vitro Cellular & Development Biology-Plant. 38: 358-365.

Leifert, C., H. Camotia, S. M. Wright, B. Waites, V. A. Cheyne and W. M. Waites 1991. Elimination of Lactobacillus plantarum, Corynebacterium spp., Staphylococcus saprophyticus

and Pseudomonas paucimobilis from micropropagated Hemerocallis. Chaisya and Delphinium cultures using antibiotics. Journal of Applied Bacteriology 71: 307-330.
Leifert, C., W. M. Waites and J. R. Nicholas 1989. Bactrial contamination of micropropagated plant tissue cultures. Appl. Bact 67: 353-361.
Marks, T. and S. Simpson 1990. Reduced phenolic oxidation at culture initiation in vitro following the exposure of field-grown stockplants to darkness or low levels of irradiance. Hortic. Sci 65: 103-111.
Vaughn, K. C. and S. Duke 1984. Function of polyphenol oxidase in higher plants. Physiol Plant 60: 106-112.
Viss, PR., E. M Brooks and J. A. Driver 1991. A simplified method for the control of bacterial contamination in woody plant tissue culture. In Vitro Cell. Dev. Biol 27: 42
Mashayekhi, K. 2001. The protein synthesis spectrum during the induction phase of somatic embryogenesis in carrot (Daucus carota L.) cultures and the role of nitrogen forms for embryo development. A thesis of Doctor of Science in Agriculture. Justus Liebig University, Giessen. 97 p.
Mashayekhi, K. and Neumann, K. H. 2006. Effects of boron on somatic embryogenesis of Daucus carota. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 84: 279-283.

The effect of sterilization methods on control external contamination and tissue browning in apricot shoot culture

Z. Khazaei[1]*, M. Rezaei[2], Sh. Gharanjik[2] and H. Ghorbani[3]

1- M.Sc. student, Dept. of Horticultural Sciences, Shahrood University.
2- Assistante professor of Shahrood University.
3- Instructor of Shahrood University
*za_khazaei@yahoo.com

Abstract

In this research, several different sterilization methods in apricot invitro culture was studied. The shoot explant of a apricot cultivar " Jafari " was collected from a commercial orchard in agriculture college of Shahrood university. Sterilization treatments on dormant bud in February was including: 1. Alcohol+ Citric acid, 2. Alcohol+ Citric acid+Hgcl2, 3. Alcohol+ Citric acid + NaOCl(20 min), 4. Alcohol+ Citric acid + NaOCl(20 min) + Hgcl2 and treatments after bud breaks in April was including:1.Hgcl2 + Citric acid, 2. Alcohol 70% + NaOCl for 10, 15, 20 minutes. The explants after rinsing in water and sterilization treatment, cultured in woody plant medium (WPM). The result of first experiment showed the medium bacterial contamination in first and forth treatments and infection in the second and third treatment is the high and very high, respectively. The fungi contamination only observed in first treatment. The tissue browning was low and medium in first, second and forth treatment respectively. However third treatment haven't any tissue browning. In the second experiment result showed that contamination was decrease with increasing the sterilizing time by NaOCl, but the explant burning was increase.

Key words: Sterilization, In vitro culture, Apricot

Abstract

In this study the effects of the plant growth regulators on micropropagation of several Iranian apricot's cultivars was investigated in order to achieve high capacity of propagation by tissue culture. The shoot explants of "Jafari", "Ghavami", "RajabAli" and "Khiveei" apricot's cultivars were provided from a training orchard in agriculture department of Shahrood University. The Nodes after surface sterilized with HgCl and citric acid were establishments in the MS and WPM mediums. The results of the two media did not show a significant difference in the apricot bud sprouting. The average of Rajabali cultivar bud sprouting percent in removed scales bud was 62.77 in dormant winter shoots and 76.66% in the vegetative spring shoots. Proliferation of bud sprouting explants examined on WPM medium supplemented with three concentrations of (0.5, 1 and 2) mg/l BAP and IBA at 0.05 mg/l in several varieties of apricot. The maximom shoot number and shoot length obtained at concentration of 1 mg/l in "RajabAli" apricot cultivar and 2 mg/l of BAP "Jafari" apricot cultivar, respectively. In order rooting of proliferation shoots, three concentrations of IBA (0.5, 1 and 2 mg/l) were examined. The results of rooting experiment were not successful and lost explants.

Key word: Apricot, Plant growth regulators, Micropropagation

Shahrood University of Technology

Faculty Agriculture

Study on the effects of plant growth regulators on micropropagation of three Iranian apricot cultivars

Zahra Khazaei Kojori

Supervisors:

Dr. Mahdi Rezaei

Dr. Shahrokh Garanjik

September 2014