بررسی اثرات محیط کشت، تیمار گندزدایی و هورمونی در ریز ازدیادی برخی از پایه‌های رویشی سیب (*Mallus domestica* Borkh.)

نجمه محمدزاده مقدم[1]* و حسن حمیدی[2]

۱*- **نویسنده مسئول:** کارشناس ارشد بخش تحقیقات علوم زراعی-باغی، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی خراسان رضوی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی مشهد (mohamadzadehn@gmail.com)

۲- کارشناس ارشد بخش تحقیقات علوم زراعی-باغی، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی خراسان رضوی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی مشهد

تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۰۲/۱۹ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۵/۱۰/۱۵

چکیده

توسعه پایه‌های رویشی به‌منظور افزایش عملکرد در باغ‌های سیب ضروری است و این امر به در دسترس بودن یک روش ساده و آسان تکثیر پایه‌ها بستگی دارد. در این تحقیق اثر شرایط گندزدایی، محیط کشت و تیمارهای مختلف هورمونی روی میزان آلودگی، تعداد شاخه جانبی، طول شاخه، کالوس‌زایی، میزان شاخه‌زایی و تعداد برگ سه پایه رویشی MM106، MM111 و B9 با استفاده از آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار مطالعه شد. ریز نمونه‌ها پس از شستشوی سطحی با غلظت‌های مختلف کلرید جیوه و هیپوکلریت سدیم گندزدایی شده و سپس در محیط‌های کشت MS تغییر یافته، WPM و DKW کشت شدند. نتایج نشان داد که با استفاده از کلرید جیوه ۰/۱ درصد و اتانول ۷۰ درصد به‌ترتیب به مدت ۳ دقیقه و ۳۰ ثانیه کمترین آلودگی حاصل شد. علاوه براین تفاوت معنی‌داری بین تیمارها و پایه‌ها برای صفات مورد مطالعه مشاهده شد. در این آزمایش، محیط کشت MS تغییر یافته همراه با ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر هورمون بنزیل آدنین با بیشترین درصد رشد، استقرار موفق‌تری داشت. مقایسه میانگین‌ها نشان داد که پایه رویشی MM106 از نظر کلیه صفات مورد مطالعه، نسبت به سایر پایه‌های رویشی، برتری داشت. به‌طوری‌که بالاترین طول شاخه، کالوس‌زایی و تعداد برگ در این پایه مشاهده شد. به‌منظور بررسی تأثیر هورمون روی شاخه‌زایی، سطوح مختلف دو هورمون بنزیل آمینو پورین و ایندول بوتریک اسید استفاده شد. بهترین شاخه‌زایی از تیمار هورمونی۲ میلی‌گرم در لیتر BAP و ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر IBA حاصل شد. نتایج نشان داد که عکس‌العمل ژنوتیپ‌ها نسبت به شرایط *in vitro* متفاوت بود. به‌طوری‌که پایه رویشی B9 پاسخ بهتری نسبت به سایر ژنوتیپ‌ها در صفت شاخه‌زایی نشان داد.

کلید واژه‌ها: سیب، پایه رویشی، کشت درون شیشه‌ای، استقرار و شاخه‌زایی.

مقدمه

سیب از گونه‌های وحشی موجود در آسیا و اروپا بوده و قدمت کشت و پرورش آن به ما قبل تاریخ می‌رسد. از زمان تئوفراست[1] دانشمند گیاه‌شناس روم قدیم (حدود ۲۲۵ سال قبل از میلاد مسیح) ارقام متعددی از سیب در روم مورد ازدیاد قرار می‌گرفته است. اولین بوته‌ها یا دانه‌های سیب به‌وسیله مهاجرین اولیه در طی قرون ۱۶ و ۱۷ میلادی به آمریکا برده شده است. گیاه سیب (*Malus domestica*) متعلق به تیره گلسرخیان (Rosaceae) زیر تیره سیبیان (Pomoiedeae) می‌باشد و با نام علمی *Malus domestica* Brokh. مشهور است. درخت سیب از جمله درختان در مناطق معتدله سردسیری است. میوه سیب خوش عطر و طعم و حاوی مقدار زیادی

1- Theophrastus

پتاسیم، سدیم، کلسیم، برم و فسفر و مقادیر زیادی ویتامین آ و ب می‌باشد (Sanei Shariat Panahi, 1987).

برای ازدیاد گیاهان از دو روش جنسی و غیرجنسی استفاده می‌گردد. در روش ازدیاد جنسی از بذر گیاهان استفاده می‌شود. تکثیر از طریق بذر، موجب می‌شود که نهال‌های حاصل با یکدیگر یکسان نبوده و تفاوت‌های بسیار زیادی را دارا هستند که درنهایت در انجام عملیات کشاورزی به‌صورت مکانیزه مشکل ایجاد می‌کنند. از میان روش‌های تکثیر غیر جنسی، روش کشت بافت از چند دهه است که بسیار مورد توجه قرار گرفته است زیرا که سرعت تولید و دقت در این روش بسیار بالا است. از طرف دیگر از هر گیاه مادری می‌توان اقدام به تولید میلیون‌ها گیاه در کمترین زمان نمود. علاوه بر این با توجه به شناخت و معرفی محیط‌های کشت متنوع در سال‌های اخیر پیشرفت این علم بسیار افزایش یافته و با کاربرد هورمون‌ها در محیط کشت می‌توان به اهداف مختلفی از قبیل القاء کالوس، رویان‌زایی[1]، شاخه‌زایی، ریشه‌زایی و درنهایت تولید گیاه عاری از بیماری دست یافت (Razdan, 1994).

وجود اقلیم‌های مختلف و پستی و بلندی‌های بسیار در ایران سبب شده است که دارای مناطقی با نیازهای متفاوت باشد (Manee, 1993)، لذا دست‌یابی به پایه‌های مناسب برای درختان میوه و تکثیر آسان آن‌ها ضروری و مورد توجه می‌باشد. از طرفی با توجه به نقش پایه در میزان رشد رویشی، زودرسی، میزان عملکرد و مقاومت در برابر بیماری‌ها، انتخاب پایه مناسب نقش بسزایی در برنامه مدیریت باغ خواهد داشت (Sansavinis and Lougi, 1996).

Gurel and Gulsen (۱۹۹۸) در گندزدایی ریز نمونه‌های بادام از هیپوکلریت سدیم ۲ درصد به مدت ۱۰ دقیقه و به دنبال آن چهار مرتبه شستشو با آب مقطر استریل استفاده کردند. Canan و همکاران (۲۰۰۶) ریز نمونه‌های برگرفته از درختان پسته را ۲ بار با اتانل ۷۰ درصد به مدت ۲ دقیقه و یک بار با هیپوکلریت سدیم ۱۵ درصد به مدت ۱۵ دقیقه و نیز شستشو با آب مقطر استریل بعد از هر مرتبه غوطه‌وری در ماده شیمیایی، ضدعفونی کردند.

Lane و همکاران (۱۹۸۲) به‌منظور بررسی رشد درختان جهش یافته سیب پاکوتاه در شرایط *in vitro*، مریستم سه رقم سیب مکینتاش را که عادت رشدی مشابه گونه والدین پا کوتاه داشتند، استفاده کردند. در این مطالعه از محیط کشت موراشیگ و اسکوگ[2] حاوی غلظت‌هایی از بنزیل آدنین جهت باززایی استفاده شد. همه ارقام در یک حد مطلوبی از غلظت بنزیل آدنین یعنی۶-۳ میکرو مول دارای حداکثر شاخه‌زایی و افزایش رشد طولی بودند. گر چه تحمل به غلظت بالای سیتوکنین وابسته به عادت رشد بود. برای نمونه، در غلظت ۱۰ میکرومول از بنزیل آدنین، میزان شاخه‌زایی بر حسب درصد به‌ترتیب ۹۰، ۲۰ و ۰ درصد برای ارقام کاملاً پاکوتاه، نیمه پاکوتاه و استاندارد بود.

Mohammadinejad و همکاران (۲۰۱۴) اثر دو نوع محیط کشت DKW[3] و WPM[4] و سه غلظت صفر، ۰/۵ و ۱ میکرو مولار از هورمون بنزیل آدنین (BA) بر ریزازدیادی گردوی ایرانی ژنوتیپ Z60 را مورد بررسی قرار دادند. نتایج نشان داد از نظر شاخص‌های رشد، محیط کشت DKW مؤثرتر از WPMبوده است. هم‌چنین آن‌ها با بررسی اثر دو هورمون BA و کینیتین در سه غلظت ۴/۴، ۶/۶ و ۸/۸ میکرو مولار در محیط کشت DKW بر پرآوری[5] این ژنوتیپ نشان دادند که هورمون بنزیل‌آدنین مؤثرتر از کینتین عمل نموده است و در تمامی تیمارها با افزایش غلظت سیتوکینین‌ها صفات مورد بررسی افزایش یافت.

Tatari Vernosefaderani و همکاران (۲۰۱۲) جهت ازدیاد سه پایه رویشی درختان میوه هسته‌دار شامل

1- Embryogenesis

2- Murashige and Skoog
3- Driver and Kuniyuki Walnut
4- Woody Plant Medium
5- Proliferation

VPK1، سنت جولین A و GF677 در شرایط درون شیشه‌ای از محیط‌های کشت MS تغییر یافته، WPM و Knop استفاده کردند. نتایج نشان داد که بیشترین پرآوری متعلق به پایه رویشی سنت جولین A در محیط MS محتوی ۱ میلی‌گرم در لیتر BAP و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA بود. پرآوری مطلوب در پایه‌های رویشی GF677 و VPK1 در محیط MS محتوی ۰/۶ میلی‌گرم در لیتر BAP و ۰/۰۱ میلی‌گرم در لیتر NAA حاصل شد. هم‌چنین افزایش غلظت تنظیم کننده‌های رشد در پایه GF677 تولید کالوس را به دنبال داشت.

این تحقیق با هدف تعیین شرایط بهینه جهت تکثیر درون شیشه‌ای ژنوتیپ‌های پاکوتاه سیب که از مهم‌ترین پایه‌های سیب می‌باشد، اجرا گردید. علاوه براین در این طرح، مقایسه اثر تیمارهای مختلف گندزدایی و هورمونی و تعیین مناسب‌ترین تیمار برای تکثیر درون شیشه‌ای پایه‌های رویشی سیب انجام شد.

مواد و روش‌ها

در این تحقیق سه پایه رویشی سیب شامل پایه‌های مالینگ مرتون (MM106 و MM111) و بوداگوفسکی (B9) که طی آزمایشات مختلف در مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی خراسان رضوی به‌عنوان پایه‌های برتر شناسایی شده‌اند، جهت تکثیر از طریق کشت بافت مورد مطالعه قرار گرفت. در این طرح از آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار استفاده شد.

ریز نمونه‌های مورد آزمایش از خزانه ژنوتیپ‌های پاکوتاه گزینش شده سیب واقع در مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی خراسان رضوی در فصول مختلف (از تابستان ۱۳۹۰ تا بهار ۱۳۹۱) تهیه شد. ریز نمونه‌های مورد استفاده شامل جوانه‌های انتهایی و جوانه‌های جانبی بودند. شاخه‌های تهیه شده به طول ۲۰-۱۵ سانتی‌متر به آزمایشگاه منتقل، برگ‌های آن حذف گردیده و شاخه‌ها به قطعات کوچک تقسیم شدند که هر یک به طول ۰/۳ تا ۰/۸ سانتی‌متر بودند و در هر قطعه برش خورده حداقل یک جوانه وجود داشت.

ابتدا جهت استقرار جوانه‌ها از محیط کشت‌های WPM (Lloyd and McCown, 1980)، DKW (Driver, and Kuniyuki, 1984) و MS (Murashige and Skoog, 1962) تغییر یافته استفاده شد. شرایط اتاق رشد شامل ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی و شدت نور ۵۰۰۰ لوکس و درجه حرارت ۱±۲۵درجه سانتی‌گراد می‌باشد.

در این آزمایش از سه پایه (MM106، MM111 و B9)، سه نوع محیط کشت (MS تغییر یافته، WPM و DKW) و سه نوع تیمار ضد عفونی به شرح ذیل استفاده گردید.

کلرید جیوه ۰/۱ درصد به مدت ۳ دقیقه + اتانول ۷۰ درصد به مدت ۳۰ ثانیه.

کلرید جیوه ۰/۱ درصد به مدت ۵ دقیقه + اتانول ۷۰ درصد به مدت ۳۰ ثانیه.

هیپوکلریت سدیم ۰/۷۵ درصد به مدت ۱۵ دقیقه + اتانول ۷۰ درصد به مدت ۳۰ ثانیه.

در مرحله استقرار جوانه، از آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار استفاده شد که هر تکرار شامل پنج لوله آزمایش و هر لوله دارای یک ریز قلمه بود.

پس از تهیه ریزنمونه از جوانه‌های انتهایی پایه‌های رویشی مورد مطالعه و شستشوی سطحی، به مدت نیم ساعت زیر آب جاری قرار داده شد. سپس عمل ضدعفونی تحت شرایط تیمارهای مختلف زیر دستگاه لامینارفلو انجام شد. جوانه‌های گندزدایی شده بر روی محیط کشت‌های مختلف جهت استقرار قرار گرفتند. پس از حدود یک ماه، نسبت به اندازه‌گیری درصد آلودگی اقدام گردید. پس از استقرار جوانه‌ها، دو بار واکشت آن‌ها با فاصله زمانی ۲۱ روز انجام شد و درنهایت تعداد شاخه جانبی، طول شاخه، درصد

کالوس‌زایی و تعداد برگ اندازه‌گیری گردید. درصد کالوس‌زایی از تقسیم تعداد ریزنمونه دارای کالوس تقسیم بر تعداد کل ریز نمونه استقرار یافته در محیط کشت به‌دست آمد. درنهایت بهترین محیط کشت و شرایط ضدعفونی جهت استقرار جوانه پایه‌های رویشی مورد مطالعه مشخص گردید.

در مرحله بعد جهت تعیین بهترین تیمار هورمونی برای شاخه‌زایی اقدام گردید. در این آزمایش از محیط کشت MS تغییر یافته استفاده شد زیرا جوانه‌ها در این محیط کشت در آزمایش اول بهترین شرایط رشد را دارا بودند. تیمارهای هورمونی مورد استفاده به این ترتیب بود:

۱- شاهد بدون هورمون

۲- ۱ میلی‌گرم در لیتر BAP + ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر IBA

۳- ۲ میلی‌گرم در لیتر BAP + ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر IBA

۴- ۱ میلی‌گرم در لیتر IBA

۵- ۲ میلی‌گرم در لیتر IBA

در مرحله شاخه زایی نیز از سه پایه MM106، MM111 و B9 و پنج تیمار مختلف هورمونی استفاده شد. این آزمایش نیز مانند آزمایش اول به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار انجام شد که هر تکرار شامل چهار ارلن و در هر ارلن یک ریزقلمه کشت گردید.صفات مورد بررسی در این آزمایش شامل طول شاخه، تعداد شاخه، درصد کالوس‌زایی و تعداد برگ می‌باشد.

تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها و رسم نمودارها به ترتیب با استفاده از نرم‌افزارهای SAS و Excel انجام و مقایسه میانگین‌ها نیز با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال پنج درصد انجام شد.

نتایج و بحث

نمونه‌برداری در این آزمایش از شهریور ۱۳۹۰ تا خرداد ۱۳۹۱ در پنج زمان مختلف مطابق با جدول (۱) انجام شد. بهترین نتیجه با ۸۰ درصد جوانه‌های فعال از ریز نمونه‌های کشت شده در اواخر خرداد ماه حاصل گردید.

اثر پایه و محیط کشت بر کلیه صفات مورد مطالعه معنی‌دار بود. هم‌چنین اثر تیمار گندزدایی بر کلیه صفات به استثنای تعداد شاخه جانبی و در صد کالوس‌زایی درسطح یک درصد معنی‌دار بود. علاوه بر این اثر متقابل پایه، محیط کشت و شرایط گندزدایی برای کلیه صفات به استثنای تعداد شاخه جانبی و در صد کالوس‌زایی معنی‌دار بود (جدول ۲).

مطابق جدول (۳)، بین سه پایه مورد مطالعه، پایه MM106 در مقایسه با سایر پایه‌ها بیشترین تعداد شاخه جانبی، طول شاخه، درصد کالوس‌زایی و تعداد برگ را نشان داد. در ضمن درصد آلودگی کمی در این پایه مشاهده گردید. هم‌چنین نتایج نشان داد که محیط کشت MS تغییر یافته کمترین درصد آلودگی، بیشترین تعداد شاخه جانبی، طول شاخه، درصد کالوس‌زایی و تعداد برگ را داشته است. مقایسه بین شرایط مختلف گندزدایی نشان داد که شرایط گندزدایی A (کلرید جیوه ۰/۱ درصد و اتانول ۷۰ درصد به‌ترتیب به مدت ۳ دقیقه و ۳۰ ثانیه) کمترین درصد آلودگی، بیشترین تعداد شاخه جانبی و طول شاخه را داشته است (جدول ۴).

جدول ۱- اثر زمان نمونه‌برداری بر فعال شدن ریز نمونه‌ها

Table 1. Effect of time of sampling on activation of explants

زمان نمونه‌برداری Time of sampling	شهریور September	آبان November	بهمن February	اوایل اردیبهشت April	اواخر خرداد June
درصد ریز نمونه فعال Percentage of activated explant	30	9	3	10	80

جدول ۲- تجزیه واریانس (میانگین مربعات) درصد آلودگی، تعداد شاخه جانبی، طول شاخه، درصد کالوس‌زایی و تعداد برگ در محیط کشت، شرایط ضدعفونی و پایه‌های مختلف سیب

Table 2. Variance analysis (Mean square) of infection percent, number of lateral branches, stem length, percentage of callus induction and number of leaves on medium, sterile conditions and different rootstocks of apple

منابع تغییرات Source of variation	درجه آزادی df	درصد آلودگی Infection percent	تعداد شاخساره‌های جانبی Number of lateral branches	طول شاخه Stem length	درصد کالوس‌زایی Percentage of callus induction	تعداد برگ Number of leaves
پایه رویشی Rootstock (A)	2	831.29*	0.228**	1.153**	2449.76**	17.11**
محیط کشت Medium (B)	2	16549.91**	0.502**	11.014**	5985**	94.614**
شرایط گندزدایی Sterile conditions (C)	2	8749.338**	0.014ns	1.228**	61.003ns	18.81**
پایه رویشی × محیط کشت A×B	4	405.89ns	0.228**	5.589**	2586.8**	42.55**
پایه رویشی × شرایط گندزدایی A×C	4	126.42ns	0.014ns	0.781**	49.53ns	1.59ns
محیط کشت × شرایط گندزدایی B×C	4	522.95ns	0.014ns	0.393ns	86.61ns	4.73**
پایه رویشی × محیط کشت × شرایط گندزدایی A×B×C	8	519.44*	0.014ns	0.865**	99.23ns	6.47**
خطای آزمایشی Error	54	206.83	0.038	0.183	76.94	1.12

ns، *و **به‌ترتیب غیرمعنی‌دار، معنی‌دار در سطوح احتمال ۵ و ۱ درصد.

ns, * and **: non-significant, significant in 0.05 and 0.01 level, respectively.

جدول ۳- میانگین صفات مورد مطالعه پایه‌های مختلف سیب، محیط کشت و شرایط ضدعفونی

Table 3. Means of studied traits of different rootstocks of apple, medium and sterile conditions

تیمار Treatment	درصد آلودگی Infection percent	تعداد شاخساره‌های جانبی Number of lateral branches	طول شاخه (سانتی‌متر) Stem length (cm)	درصد کالوس‌زایی Percentage of callus induction	تعداد برگ Number of leaves
پایه رویشی Rootstock	38.52b	0.18a	0.78a	23.33a	2.38a
	35.56b	0.016b	0.47b	5.93b	1.33b
	49.63a	0b	0.39b	0.74c	0.82b
محیط کشت Medium	8.15b	0.24a	1.25a	29.07a	3.6a
	57.78a	0b	0.4b	0.93b	0.92b
	57.78a	0b	0c	0b	0c
شرایط ضدعفونی Sterile conditions	28.89b	0.11a	0.53b	10a	1.20b
	30.37b	0.06a	0.35b	12.04a	0.87b
	64.44a	0.07a	0.778a	7.96a	2.45a

A: کلرید جیوه ۰/۱ درصد و اتانول ۷۰ درصد به‌ترتیب به مدت ۳ دقیقه و ۳۰ ثانیه، B: کلرید جیوه ۰/۱ درصد و اتانول ۷۰ درصد به‌ترتیب به مدت ۵ دقیقه و ۳۰ ثانیه، C: هیپوکلریت سدیم ۰/۷۵ درصد و اتانول ۷۰ درصد به‌ترتیب به مدت ۱۵دقیقه و ۳۰ ثانیه.

میانگین‌های دارای حروف مشترک در هر ستون بر اساس آزمون دانکن اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال ۵ درصد ندارند.

A: mercuric chloride 0.1% for 3 minute and ethanol 70% for 30 second, B: mercuric chloride 0.1% for 5 minute and ethanol 70% for 30 second, C: NaOCl 0.75% for 15 minute and ethanol 70% for 30 second

Means having the same letters in each column are not significant at 5% level with Duncan's test.

جدول ٤- میانگین اثر متقابل پایه × محیط کشت × شرایط ضدعفونی برای صفات مختلف

Table 4. Mean interaction effect of rootstock × medium × sterile conditions for different traits

پایه رویشی Rootstock	محیط کشت Medium	شرایط ضدعفونی Sterile conditions	درصد آلودگی Infection percent	تعداد شاخساره‌های جانبی Number of lateral branches	طول شاخه (سانتی‌متر) Stem length (cm)	درصد کالوس‌زایی Percentage of callus induction	تعداد برگ Number of leaves
MM106	MS modified	A	0.00^{i}	0.55^{a}	2.16^{ab}	68.33^{b}	5.87^{a}
		B	0.00^{i}	0.57^{a}	2.41^{a}	85.00^{a}	6.10^{a}
		C	6.67^{hi}	0.50^{a}	2.00^{ab}	56.67^{b}	7.72^{a}
	WPM	A	46.67^{cdef}	0.00^{c}	0.49^{d}	0.00^{d}	0.89^{c}
		B	33.33^{defgh}	0.00^{c}	0.00^{d}	0.00^{d}	0.00^{c}
		C	66.67^{cd}	0.00^{c}	0.00^{d}	0.00^{d}	0.83^{c}
	DKW	A	33.33^{defgh}	0.00^{c}	0.00^{d}	0.00^{d}	0.00^{c}
		B	60.00^{cd}	0.00^{c}	0.00^{d}	0.00^{d}	0.00^{c}
		C	100.00^{a}	0.00^{c}	0.00^{d}	0.00^{d}	0.00^{c}
MM111	MS modified	A	0.00^{i}	0.40^{ab}	1.40^{bc}	6.67^{cd}	3.40^{b}
		B	6.67^{hi}	0.00^{c}	0.72^{cd}	23.33^{c}	1.75^{bc}
		C	13.33^{fghi}	0.11^{bc}	2.12^{ab}	15.00^{c}	6.84^{a}
	WPM	A	26.67^{defgh}	0.00^{c}	0.00^{d}	8.33^{cd}	0.00^{c}
		B	40.00^{cdefg}	0.00^{c}	0.00^{d}	0.00^{d}	0.00^{c}
		C	100.00^{a}	0.00^{c}	0.00^{d}	0.00^{d}	0.00^{c}
	DKW	A	46.67^{cdef}	0.00^{c}	0.00^{d}	0.00^{d}	0.00^{c}
		B	20.00^{efghi}	0.00^{c}	0.00^{d}	0.00^{d}	0.00^{c}
		C	66.67^{bc}	0.00^{c}	0.00^{d}	0.00^{d}	0.00^{c}
B9	MS modified	A	13.33^{ghi}	0.00^{c}	0.10^{d}	6.67^{cd}	0.07^{c}
		B	0.00^{i}	0.00^{c}	0.00^{d}	0.00^{d}	0.00^{c}
		C	33.33^{cdefgh}	0.00^{c}	0.34^{d}	0.00^{d}	0.69^{c}
	WPM	A	53.33^{cde}	0.00^{c}	0.60^{d}	0.00^{d}	0.58^{c}
		B	60.00^{cd}	0.00^{c}	0.00^{d}	0.00^{d}	0.00^{c}
		C	93.33^{ab}	0.00^{c}	2.50^{a}	0.00^{d}	6.00^{a}
	DKW	A	40.00^{cdefgh}	0.00^{c}	0.00^{d}	0.00^{d}	0.00^{c}
		B	53.33^{cde}	0.00^{c}	0.00^{d}	0.00^{d}	0.00^{c}
		C	100.00^{a}	0.00^{c}	0.00^{d}	0.00^{d}	0.00^{c}

A: کلرید جیوه ۰/۱ درصد و اتانول ۷۰ درصد به‌ترتیب به مدت ۳ دقیقه و ۳۰ ثانیه، B: کلرید جیوه ۰/۱ درصد و اتانول ۷۰ درصد به‌ترتیب به مدت ۵ دقیقه و ۳۰ ثانیه، C: هیپوکلریت سدیم ۰/۷۵ درصد و اتانول ۷۰ درصد به‌ترتیب به مدت ۱۵دقیقه و ۳۰ ثانیه.

میانگین‌های دارای حروف مشترک در هر ستون بر اساس آزمون دانکن اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال ۵ درصد ندارند.

A: mercuric chloride 0.1% for 3 minute and ethanol 70% for 30 second, B: mercuric chloride 0.1% for 5 minute and ethanol 70% for 30 second, C: NaOCl 0.75% for 15 minute and ethanol 70% for 30 second.

Means having the same letters in each column are not significant at 5% level with Duncan's test.

بر اساس نتایج تجزیه واریانس اثرات پایه و تیمارهای هورمونی در کشت درون شیشه‌ای سه پایه رویشی سیب، اثر پایه بر کلیه صفات مورد مطالعه به استثنای تعداد برگ در سطح یک درصد معنی‌دار شد (جدول ۵). هم‌چنین اثر تیمارهای هورمونی بر کلیه صفات مورد مطالعه به استثنای درصد کالوس‌زایی در سطح یک درصد معنی‌دار شد. اثر متقابل پایه و تیمار هورمونی در مورد صفات تعداد شاخه و طول شاخه معنی‌دار شد. اما در مورد صفات درصد کالوس‌زایی و تعداد برگ معنی‌دار نبود (جدول ۵).

نتایج مقایسه میانگین اثرات پایه و تیمارهای هورمونی در کشت درون شیشه‌ای سه پایه رویشی سیب (جدول ۶) نشان داد پایه B9 بیشترین تعداد شاخه و بیشترین تعداد برگ را داشته است اما بیشترین طول شاخه و درصد کالوس‌زایی مربوط به پایه MM106 بوده است. بیشترین تعداد شاخه و بیشترین تعداد برگ از تیمار هورمونی ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر IBA +۲ میلی‌گرم در لیتر BAP به‌دست آمد. در حالی‌که بیشترین طول شاخساره مربوط به تیمار هورمونی ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر IBA + ۱ میلی‌گرم در لیتر BAP و بیشترین درصد کالوس‌زایی مربوط به تیمار هورمونی ۱ میلی‌گرم در لیتر IBA و بدون هورمون BAP بود. نتایج نشان داد تیمار هورمونی ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر IBA +۱ میلی‌گرم در لیتر BAP کمترین درصد کالوس‌زایی را داشته است.

مقایسه میانگین اثرات متقابل پایه و تیمارهای هورمونی در جدول (۷) نشان داده شده است. بهترین زمان برای گرفتن نمونه‌ها زمانی است که درخت از خواب زمستانی بیرون آمده و تقریباً فعالیت خود را شروع کرده است زیرا در زمان خواب درخت، مواد فنلی از ریز نمونه آزاد گردیده که اثرات سوء در محیط کشت ایجاد می‌کنند (Kamali, 1995).

زمان نمونه‌گیری می‌تواند بر درصد آلودگی و پاسخ ریزنمونه به کشت مؤثر باشد. به‌طوری‌که جوانه‌ها یا اندام‌های هوایی فعال در مقایسه با زمانی که در حال خواب هستند واکنش بهتری نشان می‌دهند. هم‌چنین آلودگی نیز هر چه به انتهای سال نزدیک می‌شود، افزایش می‌یابد (Bagheri and Vesal, 2003).

جدول ۵- تجزیه واریانس برای صفات مورد مطالعه در تیمارهای مختلف هورمونی و پایه‌های رویشی سیب در مرحله شاخه‌زایی

Table 5. Variance analysis for studied traits in different treatments of hormone and rootstocks of apple in shooting stage

منابع تغییرات Source of variation	درجه آزادی df	میانگین مربعات Mean squares			
		تعداد شاخساره Number of branches	طول شاخه (سانتی‌متر) Stem length (cm)	درصد کالوس‌زایی Percentage of callus induction	تعداد برگ Number of leaves
پایه رویشی Rootstock (A)	2	4.26^{**}	3.23^{**}	567.04^{**}	31.69^{ns}
تیمارهای هورمونی Hormonal treatments (B)	4	17.18^{**}	1.77^{**}	184.57^{ns}	1172.04^{**}
پایه رویشی × تیمارهای هورمونی A×B	8	2.59^{**}	0.39^{*}	184.57^{ns}	105.64^{ns}
خطای آزمایشی Error	30	0.62	0.13	96.84	48.01

ns، *و **به‌ترتیب غیرمعنی‌دار، معنی‌دار در سطوح احتمال ۵ و ۱ درصد.

ns, * and **: non-significant, significant in 0.05 and 0.01 level, respectively.

جدول ٦- میانگین صفات مورد مطالعه برای پایه‌های مختلف سیب و تیمارهای هورمونی در مرحله شاخه‌زایی

Table 6. Means of studied traits for different rootstocks of apple and hormonal treatments in shooting stage

تعداد برگ Number of leaves	درصد کالوس‌زایی Percentage of callus induction	طول شاخه Stem length (cm)	تعداد شاخساره Number of branches		
13.69[a]	11.11[a]	2.71[a]	2.71[a]	MM106	پایه رویشی Rootstock
14.32[a]	0.00[b]	2.05[b]	2.05[b]	MM111	
16.47[a]	0.00[b]	1.81[b]	1.81[b]	B9	
6.73[b]	0.00[b]	2.25[b]	2.25[b]	شاهد (بدون هورمون) Control	تیمارهای هورمونی Hormonal treatments
25.03[a]	0.00[b]	2.82[a]	2.82[a]	0.1 mg/l IBA + 1 mg/l BAP	
29.40[a]	2.77[ab]	2.34[b]	2.34[b]	0.1 mg/l IBA + 2 mg/l BAP	
6.42[b]	12.96[a]	1.69[c]	1.69[c]	1 mg/l IBA	
6.55[b]	0.00[b]	1.85[c]	1.85[c]	2 mg/l IBA	

میانگین‌های دارای حروف مشترک در هر ستون بر اساس آزمون دانکن اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال ۵ درصد ندارند.

Means having the same letters in each column are not significant at 5% level with Duncan's test.

جدول ۷- میانگین اثر متقابل پایه رویشی × تیمارهای هورمونی برای صفات مختلف در مرحله شاخه‌زایی

Table 4. Mean interaction effect of rootstock × hormonal treatments for different traits in shooting stage

تعداد برگ Number of leaves	درصد کالوس‌زایی Percentage of callus induction	طول شاخه Stem length (cm)	تعداد شاخساره Number of branches	پایه رویشی Rootstock	تیمارهای هورمونی Hormonal treatments
8.08[d]	0.00[b]	2.78[abc]	1.00[e]	MM106	شاهد (بدون هورمون) Control
16.00[cd]	0.00[b]	3.02[a]	2.17[cde]		0.1 mg/l IBA + 1 mg/l BAP
25.56[bc]	10.00[b]	2.90[ab]	2.64[cd]		0.1 mg/l IBA + 2 mg/l BAP
10.28[d]	33.25[a]	2.49[abcd]	1.44[de]		1 mg/l IBA
8.56[d]	0.00[b]	2.36[abcde]	1.00[e]		2 mg/l IBA
7.78[d]	0.00[b]	2.29[bcde]	1.00[e]	MM111	شاهد (بدون هورمون) Control
28.33[abc]	0.00[b]	2.67[abc]	3.50[bc]		0.1 mg/l IBA + 1 mg/l BAP
23.78[bc]	0.00[b]	1.88[def]	2.72[cd]		0.1 mg/l IBA + 2 mg/l BAP
4.61[d]	0.00[b]	1.26[fg]	1.00[e]		1 mg/l IBA
7.11[d]	0.00[b]	2.18[cde]	1.00[e]		2 mg/l IBA
4.33[d]	0.00[b]	1.70[ef]	1.00[e]	B9	شاهد (بدون هورمون) Control
30.75[ab]	0.00[b]	2.78[abc]	4.28[b]		0.1 mg/l IBA + 1 mg/l BAP
38.86[a]	0.00[b]	2.24[bcde]	6.00[a]		0.1 mg/l IBA + 2 mg/l [1] BAP
4.39[d]	0.00[b]	1.32[fg]	1.00[e]		1 mg/l IBA
4.00[d]	0.00[b]	1.02[g]	1.00[e]		2 mg/l IBA

میانگین‌های دارای حروف مشترک در هر ستون بر اساس آزمون دانکن اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال ۵ درصد ندارند.

Means having the same letters in each column are not significant at 5% level with Duncan's test.

نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که با وجود این‌که در ماه‌های آبان الی اردیبهشت درصد آلودگی پایین است ولی جوانه‌ها فعال نمی‌باشند و به دلیل ترشح ترکیبات فنلی محیط کشت قهوه‌ای رنگ می‌شود. در

صورتی که نمونه‌های گرفته شده از ژنوتیپ‌های منتخب در اواخر خرداد ماه به خوبی فعال می‌شوند. نتایج به‌دست آمده از این پژوهش با نتایج Emam (۲۰۰۴) مطابقت دارد. اما با نتایج Ozzambak and Hepaksoy (۱۹۹۷) متفاوت است که علت آن می‌تواند به شرایط جغرافیایی، محیطی و ژنوتیپ وابسته باشد. بنابراین می‌توان با توجه به نتایج این آزمایش زمان نمونه‌برداری برای ریز ازدیادی پایه‌های گزینش شده سیب را در اواخر خرداد ماه توصیه نمود.

با توجه به نتایج به‌دست آمده از آزمایش استقرار جوانه در رابطه با مقایسه سه پایه MM106، MM111 و B9 در همه صفات به جز درصد آلودگی، پایه MM106 برتری معنی‌داری نسبت به دیگر پایه‌های مورد مطالعه داشت. گروه‌بندی نتایج با آزمون دانکن نیز نشان داد که پایه MM106 در مورد صفات تعداد شاخه جانبی، طول شاخه، درصد کالوس‌زایی و تعداد برگ در گروه a و پایه MM111 در مورد کلیه صفات در گروه b و پایه B9 در مورد صفات تعداد شاخه جانبی، طول شاخه و تعداد برگ در گروه b قرار دارد. در مورد صفت درصد کالوس‌زایی در گروه c قرار دارد. بنابراین می‌توان بیان نمود که پایه MM106 پاسخ بهتری به کشت نشان داده است.

نتایج نشان داد سه محیط کشت WPM، MS تغییر یافته و DKW برای اکثر صفات مورد مطالعه اختلاف معنی‌داری دارند. مقایسه میانگین نیز نشان داد که دو محیط کشتWPM و MS تغییریافته در گروه a و محیط کشت DKW در گروه b قرار می‌گیرد. نکته قابل توجه در نتایج این بود که محیط کشت MS تغییریافته در تمامی صفات نسبت به دو محیط دیگر برتری نشان داد. در دو محیط کشت WPM و DKW در هیچ کدام از صفات محیط کشت DKW برتری نشان نداد ولی نتایج در مورد صفات درصد آلودگی، تعداد شاخه جانبی و درصد کالوس‌زایی تفاوت معنی‌داری با هم ندارند. در مورد صفات طول شاخه و تعداد برگ، محیط کشت WPM نسبت به DKW برتری نشان داد. این نتیجه را Markafshy و همکاران (۲۰۰۹) نیز گزارش نمودند.

نتایج نشان داد که محیط کشت MS تغییر یافته با میانگین تولید ۳/۶ عدد برگ، بهترین محیط می‌باشد و محیط کشت WPM با میانگین ۰/۹۲ در مرتبه دوم قرار دارد. اختلاف این دو محیط کشت از نظر تعداد برگ معنی‌دار است. این مطلب را می‌توان به غلظت متفاوت عناصر ماکرو در دو محیط کشت MS تغییر یافته و WPM نسبت داد، زیرا غلظت نمک‌های به کار رفته در محیط کشت MS تغییر یافته نسبت به محیط کشت WPM بیشتر می‌باشد. در رابطه با محیط کشت DKW با توجه به این که این محیط اولین بار برای گردو ساخته و مورد استفاده قرار گرفت برای سیب به هیچ عنوان مناسب نمی‌باشد. Ciccotti و همکاران (۲۰۰۸) نیز این محیط کشت را برای پایه‌های رویشی سیب مورد آزمایش قرار دادند و اظهار داشتند که این محیط برای کشت بافت سیب مناسب نمی‌باشد. بنابراین می‌توان با توجه به نتایج این آزمایش محیط کشت مناسب جهت ریز ازدیادی پایه‌های گزینش شده سیب را MS تغییر یافته توصیه نمود.

نتایج این آزمایش نشان داد که در مورد صفات تعداد شاخه جانبی و درصد کالوس‌زایی بین تیمارهای مختلف تفاوت معنی‌داری وجود ندارد و هر سه تیمار در مورد این دو صفت در گروه a قرار دارند اما در مورد صفت درصد آلودگی که در تیمارهای گندزدایی اهمیت بیشتری دارد بین تیمار گندزدایی هیپوکلریت سدیم ۰/۷۵ درصد و اتانول ۷۰ درصد به‌ترتیب به مدت ۱۵دقیقه و ۳۰ ثانیه با دو تیمار دیگر تفاوت معنی‌داری وجود دارد و این تیمار با میانگین ۶۴/۴۴ درصد آلودگی مناسب به نظر نمی رسد که این نتیجه با نتایج ارائه شده توسط Ghavidel Masole (۲۰۰۳) مطابقت دارد که

در آن گندزدایی با کلریت سدیم تأثیری بر از بین بردن آلودگی نداشت، در صورتی‌که کاربرد کلرید جیوه نتایج مطلوبی را نشان داد. افزایش زمان تماس ریز نمونه با کلرید جیوه باعث کاهش آلودگی شده ولی به علت پلی فنلی شدن بافت‌ها موجب نابودی کشت‌ها می‌شود. این مورد در نتایج آزمایش حاضر نیز مشهود بود به‌طوری‌که در تیمار گندزدایی A (زمان استفاده از کلرید جیوه ۳ دقیقه) تعداد شاخه جانبی، طول شاخه و تعداد برگ بیشتری نسبت به تیمار گندزدایی B (زمان استفاده از کلرید جیوه ۵ دقیقه) مشاهده گردید. بنابراین می‌توان اظهار نمود که بهترین روش گندزدایی برای پایه‌های سیب تیمار A (کلرید جیوه ۰/۱ درصد و اتانول ۷۰ درصد به‌ترتیب به مدت ۳ دقیقه و ۳۰ ثانیه) است.

تیمار مناسب گندزدایی با نتایج Emam (۲۰۰۴) بر روی گردوی ایرانی، Kamali (۱۹۹۵) بر روی پایه GF677، Khaje addeini (۲۰۰۱) بر روی سیب پایه MM106 و Ghavidel Masole (۲۰۰۳) بر روی پایه M26 با تفاوت در زمان گندزدایی مشابه بود که این تفاوت به اندازه ریزنمونه، زمان نمونه‌گیری و پیش تیمارهای گندزدایی مربوط می‌باشد.

با توجه به نتایج به‌دست آمده از این آزمایش برای کشت پایه‌های رویشی سیب می‌توان روش گندزدایی با کلرید جیوه ۰/۱ درصد به مدت ۳ دقیقه را توصیه نمود. مقایسه بین سه پایه رویشی MM106، MM111 و B9 هم در آزمایش اول و هم در آزمایش دوم در این طرح مورد بررسی قرار گرفت و نتایج قابل توجهی به‌دست آمد. در آزمایش اول در خصوص استقرار جوانه، پایه MM106 برتری نشان داد اما در آزمایش دوم بررسی تیمارهای هورمونی در مورد صفت شاخه‌زایی و تعداد برگ، پایه B9 برتری داشت. در مورد صفت طول شاخه و در صد کالوس‌زایی همچنان پایه MM106 برتری داشت، این موضوع را می‌توان به تأثیر هورمون و استفاده از تیمارهای هورمونی مختلف در کشت بافت مرتبط دانست. هم‌چنین با توجه به نتایج مقایسه میانگین اثرات تیمارهای هورمونی در کشت درون شیشه‌ای سه پایه رویشی سیب، پایه B9 در مورد صفت تعداد شاخه با میانگین ۲/۶۵ در گروه a قرار دارد که نسبت به پایه‌های دیگر برتری معنی‌داری نشان داد. هم‌چنین پایه B9 در مورد صفت تعداد برگ با میانگین ۱۶/۴۷ در گروه a قرار گرفت و در مورد این صفت تفاوت معنی‌دار با دو پایه دیگر نداشت. پایه MM111 در مورد صفت تعداد برگ با میانگین ۱۴/۳۲ برگ در گروه a قرار و در مورد سایر صفات در گروه b قرار گرفت. بنابراین می‌توان اینگونه بیان نمود که پایه B9 بهترین پاسخ را نسبت به تیمارهای هورمونی جهت شاخه‌زایی داشته است. این نتایج با نتایج Dradi و همکاران (۱۹۹۶) مطابقت دارد. آن‌ها امکان تکثیر درون شیشه‌ای ۱۱ ژنوتیپ محلب را به‌عنوان پایه برای دو رقم گیلاس مطالعه کردند. در این تحقیق نشان داده شد که میزان پر آوری شاخه در روی محیط کشت مشابه برای پایه‌های مختلف متغیر بود و این‌گونه نتیجه گرفتند که میزان پر آوری تا حد زیادی به ژنوتیپ وابسته است.

مقایسه میانگین صفات مورد مطالعه نشان داد که غلظت ۲ میلی‌گرم در لیتر هورمون بنزیل آمینو پورین (BAP) نسبت به دیگر تیمارهای اعمال شده مناسب‌تر می‌باشد. Godarzi (۱۹۹۵) در پژوهشی که بر روی کشت بافت پایه رویشی گیلاس انجام داد بیان کرد که غلظت ۱ میلی‌گرم بنزیل آدنین نسبت به غلظت‌های ۰/۵، ۲، ۳ و ۴ میلی‌گرم در لیتر مناسب‌تر می‌باشد. تنها در صفت تعداد برگ غلظت ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر از خود برتری نسبی نشان داد معهذا در کلاس‌بندی نتایج آزمون دانکن با غلظت ۱ میلی گرم در لیتر در کلاس a قرار گرفتند. Markafshy و همکاران (۲۰۰۹) نیز بیان نمودند که اختلاف معنی‌داری بین کاربرد دو غلظت ۰/۵ و ۱ میلی‌گرم در لیتر BAP برای ریز ازدیادی پایه GF677 وجود ندارد.

هورمون IBA که یک اکسین به شمار می‌رود و مانند دیگر اکسین‌ها باعث ریشه‌زایی در گیاهان می‌گردد، در این آزمایش غلظت‌های صفر، ۰/۱، ۱ و ۲ میلی‌گرم در لیتر از این هورمون مورد استفاده قرار گرفت که در مورد صفات تعداد شاخه، تعداد برگ و طول شاخه غلظت ۰/۱ برتری و در مورد صفت درصد کالوس‌زایی غلظت ۱ میلی‌گرم در لیتر برتری نشان داد. در این رابطه Godarzi (۱۹۹۵) نیز بیان نمود که غلظت زیاد اکسین نه تنها باعث القای ریشه‌زایی نمی‌گردد بلکه در برخی موارد باعث کند شدن آن نیز می‌گردد.

مسأله مورد بررسی دیگری که در این پژوهش صورت گرفت بحث کاربرد توام دو هورمون BAP و IBA در محیط کشت بود، که نتایج تجزیه واریانس اختلاف معنی‌داری را بین سطوح مختلف نشان داد. بررسی نتایج مقایسه میانگین نشان داد صفاتی نظیر تعداد برگ که توسط هورمون BAP القا می‌گردند با افزایش غلظت هورمون IBA کاهش می‌یابد.

Kamali (۱۹۹۵) نشان داد بسته به هدف مورد نظر بهتر است این دو هورمون به طور جداگانه در محیط کشت به کار برده شود. در مورد کشت بافت پایه رویشی گیلاس، Godarzi (۱۹۹۵) خلاف این مورد را گزارش نمود و اظهار داشت که در حضور NAA هورمون BAP تأثیر بیشتری بر شاخه‌زایی می‌گذارد، البته بیان شد غلظت هورمون NAA نباید در سطوح بالا به کار رود و هم‌چنین در مواردی که اکسین داخلی در سطح بالایی قرار دارد نباید از NAA همراه با BAP برای شاخه‌زایی در محیط کشت استفاده شود.

در بین تیمارهای هورمونی زمانی که هورمون بنزیل آدنین با غلظت ۲ میلی‌گرم در لیتر وIBA با غلظت ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر استفاده شد بهترین نتیجه در تعداد برگ مشاهده گردید. در مورد اثرات متقابل پایه و هورمون بر خلاف اثر جداگانه پایه‌ها، که پایه MM106 نسبت به B9 برتری داشت، پایه B9 با غلظت هورمونی IBA ۰/۱ + BAP ۲ بهترین نتیجه را برای صفت تعداد برگ و تعداد شاخه جانبی از خود نشان داد (در جدول (۷) با میانگین ۶ برای صفت تعداد شاخه جانبی و ۳۸/۸۶ برای صفت تعداد برگ در گروه a قرار گرفته است).

در اندازه‌گیری طول شاخه نمونه‌ها مشخص گردید که پایه MM106 با میانگین ۲/۷۱ سانتی متر بیشترین طول شاخه را داشته و در بین غلظت‌های هورمونی غلظت هورمونی ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر IBA به همراه یک میلی‌گرم در لیتر BAP بهترین نتیجه را در بر داشت و بر خلاف آن چه در صفت تعداد برگ مشاهده شد اثر متقابل پایه و تیمار گندزدایی در آزمایش اول نیز این امر را تصدیق می‌کند به طوری که پایه MM106 در آزمایش اول هم بلندترین شاخه‌ها را دارا بود.

پارامتر دیگری که در تکنیک کشت بافت اهمیت دارد مساله تولید شاخه جانبی می‌باشد، زیرا در مرحله واکشت نمونه‌ها، شاخه‌های جانبی تولید شده را می‌توان جدا نمود و هر یک را به‌عنوان یک ریز نمونه در محیطی جداگانه کشت نمود. حتی در برخی موارد که رشد شاخساره‌ها قوی باشد از هر شاخساره می‌توان چندین ریزنمونه تهیه کرد و با این کار سرعت تکثیر بسیار افزایش می‌یابد. به همین منظور بررسی این صفت در مورد ریزازدیادی پایه‌های سیب نشان داد که محیط کشت MS تغییر یافته نسبت به دو محیط دیگر مورد آزمایش تولید شاخه جانبی بیشتری نمود (جدول ۳).

Isikalan و همکاران (۲۰۰۸) نیز محیط کشت MS را بهترین محیط کشت تولید شاخه برای ریز ازدیادی بادام (*Amygdalus communis* L.cv. Nonpareil) معرفی نمودند، آن‌ها هم‌چنین پس از بررسی غلظت‌های مختلف هورمون BAP در محیط کشت MS، غلظت ۱ میلی‌گرم در لیتر را مناسب‌ترین غلظت برای تولید شاخه بادام در محیط کشت اعلام نمودند. نتایج نشان داد که در بین تیمارهای هورمونی اعمال شده، غلظت هورمونی ۰/۱ میلی گرم در لیتر

IBA + ۲ میلی‌گرم در لیتر BAP با میانگین ۳/۷۹ بهترین نتیجه را برای تولید شاخه جانبی دارا بود. علاوه براین، پایه B9 در همین محیط کشت بیشترین شاخه جانبی را تولید کرد. در مورد صفت تولید کالوس با توجه به آزمون دانکن در تیمارهای مختلف هورمونی مشاهده شد که کالوس‌زایی در تیمارهای هورمونی ۱ میلی‌گرم در لیتر BAP + ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر IBA و هم‌چنین ۱ میلی‌گرم در لیتر IBA در گروه ab قرار دارند. تیمار هورمونی ۲ میلی‌گرم در لیتر IBA با میانگین ۱۲/۹۶ در گروه a قرار گرفته و بیشترین کالوس‌زایی را داشته است. نتایج حاصل از این تحقیق با نتایج Zimmerman (۱۹۹۳) که بیان داشت غلظت‌های بالای اکسین سبب ایجاد کالوس و مانعی برای رشد شاخه و ریشه است، مطابقت دارد.

نتیجه‌گیری

به‌طورکلی نتایج نشان داد که محیط کشت MS تغییر یافته همراه با ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر هورمون بنزیل آدنین با بیشترین درصد رشد، استقرار موفق‌تری داشت. هم‌چنین پایه رویشی MM106 از نظر کلیه صفات مورد مطالعه، نسبت به سایر پایه‌های رویشی، برتری نشان داد. در این آزمایش، بیشترین شاخه‌زایی از تیمار هورمونی۲ میلی‌گرم در لیتر BAP و ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر IBA حاصل شد. علاوه براین پایه رویشی B9 پاسخ بهتری نسبت به سایر ژنوتیپ‌ها در صفت شاخه‌زایی نشان داد.

References

Bagheri, A.R. and Vesal, C.R. (2003). Tissue cultures operations of plant. Publication of Imam Reza University. 200 P. [In Farsi]

Canan, C., Ozalsan, M., Toremen, H., Sarpkaya, K., and Iskender, E. (2006). *In vitro* micrografting of pistachio, *Pistacia vera* L. Var. siirt, on wild pistachio rootstocks. Journal Cell and Molecular Biology, 5: 25-31

Ciccotti, A.M., Bisognin, C., Battocletti, I., Salvadori, A., Herdemetens, M., and Jarausch, W. (2008). Micropropagation of apple proliferation-resistant apomictic malus sieboldii genotypes. Agricultural Research, 6(2): 445-458.

Dradi, G., Vito, G., and Standardi, A. (1996). *In vitro* Mass propagation of eleven *Prunus mahaleb* ecotypes. Acta Horticulturae, 410: 477-483.

Driver, J.A. and Kuniyuki, A.H. (1984). *In vitro* propagation of Paradox walnut rootstock. Horticultural Science, 19: 507-509.

Emam, M. (2004). Asexual regeneration of mature Juglans regia by shoot tip culture. Pajouhesh and Sazandegi, 63(2):10-15. [In Farsi]

Ghavidel Masole, A. (2003). Micropropagation base maling 26 (M26) and diamond confusion by in vitro method. M.Sc. Thesis, Islamic Azad University, Science and Research Branch. [In Farsi]

Godarzi, R. (1995). Study on the cherry rootstock propagation through tissue culture. M.Sc. Thesis, Tarbiat Modares University. 108 P. [In Farsi]

Gurel, S. and Gulsen, Y. (1998). The effects of IBA and BAP on *in vitro* shoot production

of Almond (*Amygdalus communis* L.). Turkish Journal of Botany, 22: 375-379.

Isikalan, C., Akbas, F.A., Namli, S., Tikat, E., and Basaran, D. (2008). *In vitro* micropropagation of almond (*Amygdalus communis* L.cv. Nonpareil). African Journal Biotechnology, 7(12): 1875-1880.

Kamali, K. (1995). Determination of the most suitable culture medium and growth conditions for micropropagation of Gf677 (hybrid of almond × peach) rootstocks. M.Sc. Thesis, Tarbiat Modares University. 101 P. [In Farsi]

Khaje aldeini, M. (2001). Study on the micropropagation of apple base of MM106 (Maling merton 106) by using tissue culture technique. M.Sc. Thesis, Islamic Azad University, Science and Research Branch. [In Farsi]

Lane, W.D., Looney, N.E., and Mage, F. (1982). A selective tissue culture medium for growth of compact (dwarf) mutants of apple. Theoretical and Applied Genetics, 61(3): 219-223.

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

Manee, A. 1993. Introduction of wild fruit trees in the service parks. Third Issue. Department of Parks and Green Spaces in Tehran. [In Farsi]

Markafshy, A.C., Motlabiazar, R., Hajiloo, G., and Dezhampour, G. (2009). *In vitro* plant production GF677 rootstock. The sixth Iranian Horticultural Science Conference. Guilan University, Rasht, Iran. pp:163-65. [In Farsi]

Mohammadinejad, Sh., Gholami, M., and Asnaashari, M. (2014). The effect of culture media and cytokinin on the primary steps of walnut micro propagation, selected genotype 305. Journal of Plant Production, 37(3): 83-92. [In Farsi]

Murashige, T. and Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. Physiologia Plantarum, 15: 473-497.

Ozzambak, E. and Hepaksoy, S. (1997). Investigations on *in vitro* proliferation of sour cherry cv. Heimanns Rubinweichsel. Acta Horticulturae, 447: 155-156.

Razdan, M.K. (1994). An introduction to plant tissue culture. Oxford and IBH publishing co. PVT. LTD. New Dehli, India. 398 P.

Sanei Shariat Panahi, M. (1987). Botany.Tehran University Press. 314 P. [In Farsi]

Sansavinis, S. and Lougi, S. (1996). Performance of sweet cherry cultivar on new clonal rootstocks. Acta Horticulturae, 410: 363-371.

Tatari Vernosefaderani, M., Mosavi, C.A., and Bozari, N. (2012). Micropropagation of

some clonal rootstocks of stone fruits. Seed and Plant Improvment Journal, 28(1): 53-66. [In Farsi]

Zimmerman, R.T. (1993). Factors affecting *in vitro* propagation of apple cultivars. Acta Horticulturae, 131: 263-270.

Investigating the Effects of Medium, Sterilization and Hormonal Treatment on Micropropagation of Some Apple (*Mallus Domestica* Borkh.) Rootstocks

N. Mohamadzadeh Moghadam[1]* and H. Hamidi[2]

1- *Corresponding Author: M.Sc., Horticulture Crops Research Department, Khorasan Razavi Agricultural and Natural Resources Research and Education Center, AREEO, Mashhad, Iran
2- M.Sc., Horticulture Crops Research Department, Khorasan Razavi Agricultural and Natural Resources Research and Education Center, AREEO, Mashhad, Iran

Received: 9 May, 2015 Accepted: 4 January, 2017

Abstract

Background and Objectives

In order to increase yield in apple orchards, multiplication of rootstocks is essential, and it depends on the availability of a simple and easy proliferation method of rootstocks. The study investigated the effect of disinfection, culture condition and plant growth regulators on the rate of contamination, number of lateral branches, stem length, number of leaves, callus creation and the rate of branch creation of rootstocks MM106, MM111 and B9.

Materials and Methods

A factorial experiment was carried out as a completely randomized design with three replications. Surface sterilization of explants with different concentrations of mercuric chloride and sodium hypochlorite (mercuric chloride 0.1% for 3 minutes and ethanol 70% for 30 seconds; mercuric chloride 0.1% for 5 minutes and ethanol 70% for 30 seconds; NaOCl 0.75% for 15 minutes and ethanol 70% for 30 seconds) was done and then explants were cultivated in modified MS, WPM and DKW mediums. The evaluated characters were infection percent of explant, number of lateral branches, stem length, percentage of callus induction and number of leaves. Data were analyzed using SAS software. The analysis of variance on the test data was performed at 5% level and comparison to the middle of the Duncan test.

Results

Results showed that using a mercuric chloride (0.1%) and ethanol (70%) respectively for 3 Minutes and 30 Seconds achieved the least contamination. Results showed significant differences between plant hormone and rootstocks for traits. In this test, the modified MS medium with 0.1 mg/L BA hormones with the largest percentage growth had more successful establishment. Average comparisons showed that rootstock MM106 in terms of all traits had a significant difference with other rootstocks. The highest stem length, number of leaves and callus creation were shown in rootstock MM106. In order to investigate the effect of hormone levels on branch creation, different levels of BAP (6-Benzylaminopurine) and IBA (Indole-3-butyric acid) were used. The best medium was the culture containing 0.1 milligrams per liter IBA plus 2 milligrams per liter BAP.

Discussions

In general, the present results showed that genotypes respond differently to *in vitro* conditions. The rootstock B9 by the above method showed better response to branch creation trait than other genotypes.

Keywords: Apple, Rootstock, In vitro, Establishment and proliferation.