

Micro Propagation of Penta Rootstock (*Prunus domestica*) in the Two Culture Media (MS and B5)

Ziba Balapour¹, Hossein Hosseini Moghaddam^{2*}, Mehdi Zarei³ and Mehdi Mollashahi⁴

- 1- M.Sc. Student of Biotechnology, Faculty of Agriculture and Natural Resources, Gonbad Kavous University, Gonbad Kavous, Iran
- 2- ***Corresponding Author:** Assistant Professor, Department of Plant Production, Faculty of Agriculture and Natural Resources, Gonbad Kavous University, Gonbad Kavous, Iran (hhm548@yahoo.com)
- 3- Assistant Professor, Department of Plant Production, Faculty of Agriculture and Natural Resources, Gonbad Kavous University, Gonbad Kavous, Iran
- 4- Assistant Professor, Department of Plant Production, Faculty of Agriculture and Natural Resources, Gonbad Kavous University, Gonbad Kavous, Iran

Received: 14 June, 2018

Accepted: 30 October, 2019

Abstract

Background and Objectives

Culture medium and growth regulators type can influence the growth traits and for determining the most effective medium and hormone compositions an extensive studies are needed; otherwise the culture medium may have a negative effect on the growth traits. In this research the effects of two culture media (B5 and MS) supplemented with two growth regulators (IBA and BAP) with different concentrations (0.5, 0.9, and 1.5 for IBA and 0.4, 0.8, and 1.2 mg/l for BAP) alone or in combination was evaluated. Studied traits were number of leaf per shoot, shoot length, number of regenerated shoots based on completely random plan with 5 replications.

Materials and Methods

Explants provided in the beginning of spring from mother plants growing in open environment. Shoot tips and axillary buds (0.3-0.4 cm long) used as the explants. After washing with tap water, explants were immersed in ethylic alcohol for few seconds (3-4 seconds) then immersed in mercuric chloride (0.005 W/V) for 5 minutes which supplemented with few drops of tween 20 and finally washed three times with sterile distilled water. Disinfected explants cultured on medium under air laminar flow bench. Growth chamber was adjusted to 16 hours light and 25 to 27°C.

Results

The results of variance analysis demonstrated significant differences between media, hormone level and interaction between hormone concentrations for traits studied. The results showed the longest shoot (6.39 cm) and the highest shoot number (13.65) obtained in MS medium supplemented with 0.8 and 0.4 mg/l BAP respectively. In this experiment the highest root number (8.41) and root length (14.75 cm) was observed in B5 and MS medium containing 0.9 and 1.5 mg/l, IBA.

Discussion

Overall the most shoot proliferation of this rootstock occurred in MS medium. New shoots in MS medium showed normal and better growth comparing to shoots obtained in B5 medium, that can be one of the results of higher amount of nitrogen (ammonium nitrite) in MS medium. In B5 medium with all hormone treatments weak growth observed for this plant. In fact this medium was made for herbaceous plants and this is one of the main reasons why penta rootstock did not showed good growth symptoms on this medium.

Keywords: Adaptation, BAP, IBA, Micro propagation

ریزآزیدادی پایه رویشی پنتا (*Prunus domestica*) در دو محیط کشت MS و B5

زیبا بالاپور^۱، حسین حسینی مقدم^{۲*}، مهدی زارعی^۳ و مهدی ملاحاهی^۴

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه گنبد کاووس، گنبد کاووس، ایران
 ۲- *نویسنده مسئول: استادیار، گروه تولیدات گیاهی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه گنبد کاووس، گنبد کاووس، ایران
 (hhm548@yahoo.com)

۳- استادیار، گروه تولیدات گیاهی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه گنبد کاووس، گنبد کاووس، ایران

۴- استادیار، گروه تولیدات گیاهی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه گنبد کاووس، گنبد کاووس، ایران

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۰۸/۰۸

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۰۳/۲۴

چکیده

پژوهشی به منظور بررسی ریزآزیدادی پایه پنتا (*Prunus domestica*) در دو محیط کشت MS و B5 انجام گرفت. این آزمایش به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۵ تکرار انجام شد. در این پژوهش غلظت‌های مختلف هورمون ایندول بوتیریک اسید (صفر، ۰/۵، ۰/۹ و ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر) برای ریشه‌زایی و نیز غلظت‌های مختلف ۶-بنزیل آمینو پورین (۰، ۰/۴، ۰/۸ و ۱/۲ میلی‌گرم در لیتر) برای شاخه‌زایی در دو محیط کشت مورد بررسی قرار گرفتند. صفات مورد مطالعه شامل تعداد برگ، طول ساقه، تعداد شاخه، تعداد ریشه و طول ریشه بود. نتایج تجزیه واریانس اختلاف معنی‌داری بین محیط‌های کشت، سطوح هورمون و اثر متقابل آن‌ها برای صفات مورد مطالعه نشان داد. بر این اساس بیش‌ترین طول ساقه (۶/۳۹ سانتی‌متر) و تعداد شاخه (۱۳/۶۵ عدد) به ترتیب در محیط کشت MS دارای ۰/۸ و ۰/۴ میلی‌گرم در لیتر BAP حاصل شد. در این آزمایش بالاترین میانگین تعداد ریشه و طول ریشه به ترتیب ۸/۴۱ عدد و ۱۴/۷۵ سانتی‌متر در محیط B5 و MS با استفاده از غلظت ۰/۹ و ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر هورمون IBA به دست آمد. نتایج نشان داد گیاهچه‌های رشد یافته در محیط کشت MS دارای رشد بهتری نسبت به گیاهچه‌های رشد یافته در محیط کشت B5 بودند که می‌تواند به دلیل وجود مقادیر بالای نیتروژن در محیط کشت MS باشد. از این پژوهش می‌توان نتیجه گرفت که برای شاخه‌زایی پایه پنتا، محیط کشت MS با هورمون ۰/۴ میلی‌گرم در لیتر BAP و برای ریشه‌زایی محیط کشت B5 با ۰/۹ میلی‌گرم در لیتر هورمون IBA مناسب می‌باشد.

کلیدواژه‌ها: ایندول بوتیریک اسید، ۶-بنزیل آمینو پورین، ریزآزیدادی، سازگاری

مقدمه

نهال‌های حاصله از نظر خصوصیات ژنتیکی تغییر می‌یابند، از چند دهه پیش سعی بر این است تا از روش تکثیر غیرجنسی، به‌ویژه روش‌های کشت بافت برای تولید انبوه پایه‌های سالم و توسعه باغات میوه استفاده شود (Hartmann et al., 1990).

علاوه بر این باغ‌های احداث شده با پایه‌های رویشی در مقایسه با پایه‌های بذری، محاسنی همچون یکنواختی

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. به‌طور کلی پایه‌های درختان میوه به دو روش جنسی و غیرجنسی تکثیر می‌شوند، ولی با توجه به این‌که در تکثیر جنسی تفرق صفات حاصل شده و

BAP و ۰/۱ میلی گرم در لیتر ایندول بوتیریک اسید (IBA) حاصل شد، همچنین افزودن ۰/۱ و ۰/۵ میلی گرم در لیتر جیبرلین (GA3) افزایشی در پرآوری و طول شاخساره ایجاد نکرد. (Daneshvar Hossini *et al.*, 2010) در مطالعات خود روی پایه رویشی گزیلا ۶ گزارش نمودند که بیشترین میزان پرآوری در محیط کشت MS حاوی ۱ میلی گرم در لیتر BAP و ۰/۵ میلی گرم در لیتر IBA مشاهده شده است. در بیشتر تحقیقات روی GF677 برای تکثیر جوانه از هورمونهای BAP با غلظت ۰/۱ تا ۳ میلی گرم در لیتر به عنوان مهم ترین منبع سیتوکنین استفاده شده است (Ahmad *et al.*, 2003).

(Marin and Andreu, 2004) نشان دادند که، ترکیب محیط کشت روی میزان پرآوری و ازدیاد پایه‌های هسته دارها تأثیر دارد، به طوری که پس از انجام ۹ بازکشت در محیط کشت (Quoirin and QLLepoivre, 1977) در مقایسه با محیط کشت MS و WPM میزان پرآوری به طور معنی داری کاهش یافت. در کشت درون شیشه‌ای، ترکیب محیط کشت روی رشد گیاهچه مؤثر است و این تأثیر در اثر ترکیب نمک‌های موجود در محیط کشت ایجاد می‌شود (Ruzic *et al.*, 2003).

القاء ریشه‌زایی در ریزنمونه‌ها در شرایط کشت بافت از مراحل سخت در فرآیند ریزازدیادی می‌باشد. گزارش‌های زیادی در مورد القاء ریشه‌زایی در گیاهان چوبی با استفاده از اکسین‌های برونزاد همانند IBA، NAA و IAA و اثر متقابل آن‌ها با اکسین‌های درونی که به اندازه کافی سنتز نمی‌شوند، منتشر شده است (Dobranszki and Teixeira, 2010). این محققان گزارش کردند که اکسین‌های خارجی فقط در مراحل اولیه برای تحریک و ظهور ریشه‌های جدید مورد نیاز می‌باشد.

برخی از محققان پس از انتقال گیاهچه‌ها از شرایط درون شیشه‌ای به گلخانه و شرایط غیر استریل نسبت به القاء ریشه‌زایی با قرار دادن قسمت انتهایی ساقه با هورمون‌های گروه اکسین اقدام کردند و مزیت این روش را در کاهش هزینه و زمان رشد نسبت به شرایط درون شیشه‌ای گزارش

اندازه درخت، مدیریت کارا در برنامه‌های داشت و برداشت، مقاومت در برابر آفات و بیماری‌ها، کیفیت بهتر، کشت متراکم و افزایش عملکرد در واحد سطح دارند. این دامنه وسیع کارایی پایه‌های رویشی سرانجام به کاهش هزینه‌های تولید و ایجاد درآمد بالاتر برای باغدار منجر می‌شود (Mahdaviyan *et al.*, 2011). برای تأمین تعداد پایه موردنیاز در بازار لازم است پایه‌های هیبرید جدید با استفاده از تکنولوژی‌های کارآمد و نو در حد انبوه تکثیر شوند که بدین منظور استفاده از کشت بافت کاربرد گسترده‌ای دارد (Pinochet *et al.*, 2003).

آلو با نام علمی پرونوس دامیستیکا (*Prunus domestica*) از دسته ماگنولیوفیتا (Magnoliophyta)، خانواده گلسترخیان (Rosaceae) و سرده پرونوس می‌باشد. پنتا یکی از پایه‌های رویشی آلو می‌باشد. پنتاگزینش حاصل از بذر گرده‌افشانی آزاد رقم ایمپریال اپینوس (Imperial Epineuse) می‌باشد. سازگاری بسیار مناسب با اکثر ارقام هلو و شلیل و تعدادی دیگر از گونه‌های هسته‌دار دارد. پنتا از طریق قلمه و کشت بافت تکثیر می‌شود و مقاوم به خفگی و خشکی می‌باشد. پایه‌های رویشی همچنین به عنوان یک ابزار تربیتی برای رشد درختان پیوند شده بوده و موجب افزایش حاصلخیزی و بهبود بازده از طریق رشد بهتر گیاه، کنترل قدرت گیاه و افزایش عملکرد کمی و کیفی میوه می‌گردد (Massai and Loreti, 2004).

(Ruzic *et al.*, 2003) گزارش کردند، ترکیب محیط کشت و غلظت نمک‌ها نقش مهمی را در ریزازدیادی پایه گیلاس بازی می‌کنند.

(Rogalski *et al.*, 2003) گزارش کردند که بیشترین پرآوری (Proliferation) آلوی Santharosa در محیط حاوی ۲ میلی گرم در لیتر ۶-بنزیل آمینو پیورین (Benzyl amino piurine) و بیشترین ارتفاع شاخساره در محیط دارای ۰/۵ میلی گرم در لیتر BAP حاصل شد. (Ambrozic *et al.*, 1992) بیان کردند، بیشترین پرآوری آلوی Biristica در محیط کشت موراشیک و اسکوگ (Murashige and Skoog) با ۰/۲۵ میلی گرم در لیتر

مدت سه ماه نوساقه‌های رشدیافته به طول ۰/۵ تا ۱ سانتی‌متر به قطعات کوچک حاوی ۱ تا ۲ جوانه تقسیم و در محیط غذایی بالا کشت گردیدند. در تمامی آزمایش‌ها ۳ ریزنمونه در داخل هر یک از بطری‌های شیشه‌ای ۲۸۰ میلی‌لیتری با درب‌های پلاستیکی شفاف حاوی ۳۰ میلی‌لیتر محیط کشت، با $pH = 5/8$ کشت شدند و در شرایط محیطی یادشده قرار داده شدند.

بررسی اثر ترکیبات مختلف هورمونی و محیط کشت شاخه‌زایی و شاخص‌های رشد

بدین منظور، تأثیر دو محیط کشت MS و B5 تمامی ترکیبات غلظت‌های هورمونی IBA با BAP در تولید شاخه‌های جدید، مورد مطالعه قرار گرفت (جدول ۱). پس از ۳۰ روز برخی شاخص‌های رشد مانند تعداد برگ، تعداد شاخه، طول شاخه یادداشت‌برداری گردید.

ریشه‌زایی

ریزنمونه‌هایی به طول ۲ تا ۳ سانتی‌متر در محیط ریشه‌زایی MS و B5 در لیتر و تمامی ترکیبات هورمونی IBA با غلظت‌های مختلف BAP به منظور بررسی اثر متقابل این هورمون‌ها قرار داده شدند. ریزنمونه‌های کشت‌شده ابتدا به مدت ۷ روز در تاریکی نگهداری شدند و سپس به شرایط نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی منتقل شدند. بعد از گذشت ۴ هفته تعداد و طول ریشه‌های تولیدشده ثبت شدند.

انتقال به خاک و سازگاری

به منظور سازگار کردن گیاهچه‌های آماده‌شده، گیاهچه‌ها از ظروف کشت خارج شده و با آب مقطر، به‌طور کامل شست‌وشو داده شدند. گیاهچه‌های آماده‌شده درون گلدان‌های کوچک حاوی بستر ضدعفونی‌شده توسط اتوکلاو، منتقل شدند. بسترکشت در این مرحله مخلوطی از پیت‌خزه و پرلایت بود که به نسبت ۱:۱ با هم مخلوط شدند. به دلیل حساسیت گیاهچه‌ها به تنش‌های محیطی پس از انتقال به محیط بیرون، گلدان‌های دارای گیاهچه‌ها توسط ظروف شفاف پلاستیکی محصور شدند. پس از گذشت یک هفته روی

کردند (Kornova and Popov, 2010).

Mohammadinejad *et al.* (2014) اثر دو نوع

محیط کشت DKW و WPM و سه غلظت صفر، ۰/۵ و ۱ میکرومولار از هورمون بنزیل آدنین (BA) را بر ریزازدیادی گردوی ایرانی ژنوتیپ Z60 مورد بررسی قرار دادند. نتایج نشان داد از نظر شاخص‌های رشد، محیط کشت DKW بهتر از WPM بوده است.

تاکنون، توجه زیادی به پایه‌های رویشی در باغ‌های درختان میوه هسته‌دار نشده است و بیش‌تر این درختان روی پایه‌های بذری استقرار یافته‌اند. با توجه به ضرورت ایجاد تنوع در پایه‌های موجود قابل استفاده برای احداث باغ‌های درختان میوه هسته‌دار، در این تحقیق تأثیر محیط کشت و هورمون‌های گیاهی برای دستیابی به محیط کشت مناسب برای ریزازدیادی پایه پنتا که برای احداث باغ‌های یکنواخت درختان میوه هسته‌دار مناسب است، مورد بررسی و مطالعه قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

آماده‌سازی و استقرار ریزنمونه

برای تهیه ریزنمونه (جوانه انتهایی و جانبی) از شاخه‌های جوان و در حال رشد درختان مادری کشت و صنعت ایتا صدرا در اوایل بهار استفاده گردید. جوانه‌های انتهایی و جانبی به اندازه‌های ۰/۳ تا ۰/۴ سانتی‌متر از شاخه‌ها جدا شدند. فلس‌های اطراف جوانه‌ها حذف گردید؛ سپس قطعات به ترتیب با الکل ۹۶ درصد به مدت ۳-۴ ثانیه، کلرید جیوه ۰/۰۵/۰ درصد (W/V) به مدت ۳ تا ۴ دقیقه، ضدعفونی شدند. در نهایت ۳ نوبت با آب مقطر استریل شستشو و در دو محیط کشت ((MS) Murashige and Skoog, 1969 و (B5) Gamborg *et al.*, 1968) حاوی ۳۰ گرم در لیتر ساکارز و ۷ گرم در لیتر آگار کشت شدند. نمونه‌های کاشته‌شده در اتاق رشد با شرایط محیطی دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و ۱۶ ساعت روشنایی با لامپ‌های فلورسنت سرد سفید قرار داده شدند. به منظور ازدیاد و تهیه ریزنمونه لازم برای آزمایش‌های اصلی، هر ۳ هفته و به

رشد بر روی تمام صفات مورد مطالعه در سطح احتمال یک درصد معنی دار می باشد (جدول ۲).

بیشترین تعداد شاخه ۱۳/۶۵ عدد در محیط کشت MS حاوی ۰/۴ میلی گرم در لیتر BAP تشکیل شد و کمترین تعداد شاخه ۱/۵۳ عدد در محیط کشت MS که حاوی غلظت ۱/۵ میلی گرم در لیتر IBA بود، به دست آمد (شکل ۱). (Karamad et al., 2014) در بررسی اثر محیط کشت و تنظیم کننده های رشد بر ریزازدیادی پایه گزیلا ۶ گزارش کردند که بیشترین تعداد شاخه در محیط کشت WPM حاوی ۲ میلی گرم در لیتر BAP تشکیل شد. نتایج ایشان با نتایج این تحقیق که بیشترین تعداد شاخه در محیط کشت MS حاوی ۰/۴ میلی گرم در لیتر BAP تشکیل شد، مطابقت ندارد. در توجیه آن می توان به تفاوت در نوع محیط کشت اشاره کرد. در کشت درون شیشه ای، ترکیب محیط کشت روی رشد گیاهچه مؤثر است و این تأثیر بر اثر ترکیب نمک های موجود در محیط کشت ایجاد می شود (Reski and Abel, 1985). در بررسی تکثیر درون شیشه ای گزیلا ۵، محیط MS بهترین محیط شناخته شد. در این محیط جذب فسفر و نیتروژن توسط شاخساره ها بیشتر بوده به طوری که افزایش پرآوری و کیفیت بهتر را به دنبال داشت (Ruzic et al., 2000).

پوشش های پلاستیکی سوراخ کوچکی برای تبادل هوا ایجاد شد و با گذشت زمان برای کاهش تدریجی رطوبت و نبودن تنش در گیاهچه ها تعداد این سوراخ ها اضافه شد. در این مدت، برای جلوگیری از فعالیت قارچ ها نیز از هفته دوم به بعد روزانه پوشش های پلاستیکی به مدت ۲۰ تا ۳۰ دقیقه و در هفته های بعد از یک تا چند ساعت برداشته شدند. آبیاری گیاهچه ها در ابتدا با آب مقطر انجام گرفت تا گیاه با شرایط جدید سازگار شود. سپس به منظور کمک به سازگاری با محلول ماکرو و میکرو مربوط به محیط کشت MS که غلظت آن نصف شده بود، آبیاری شدند. پس از آن که گیاهچه ها سازگار شدند، به زمین اصلی منتقل شدند.

روش های آماری مورد استفاده

این آزمایش با دو فاکتور انجام گرفت فاکتور اول شامل محیط کشت در دو سطح و فاکتور دوم ترکیب غلظت های مختلف دو نوع هورمون (جدول ۱) در ۱۳ سطح انجام گرفت. برای تجزیه و تحلیل داده ها از نرم افزارهای آماری SAS 9.1 و از روش حداقل اختلاف معنی دار (LSD) برای مقایسه میانگین ها استفاده شد.

نتایج و بحث

نتایج نشان داد اثر نوع محیط کشت و تنظیم کننده های

جدول ۱- ترکیبات هورمونی محیط کشت ها در مرحله شاخه زایی و ریشه زایی

Table 1. Hormone combinations and concentrations in shoot and root stage

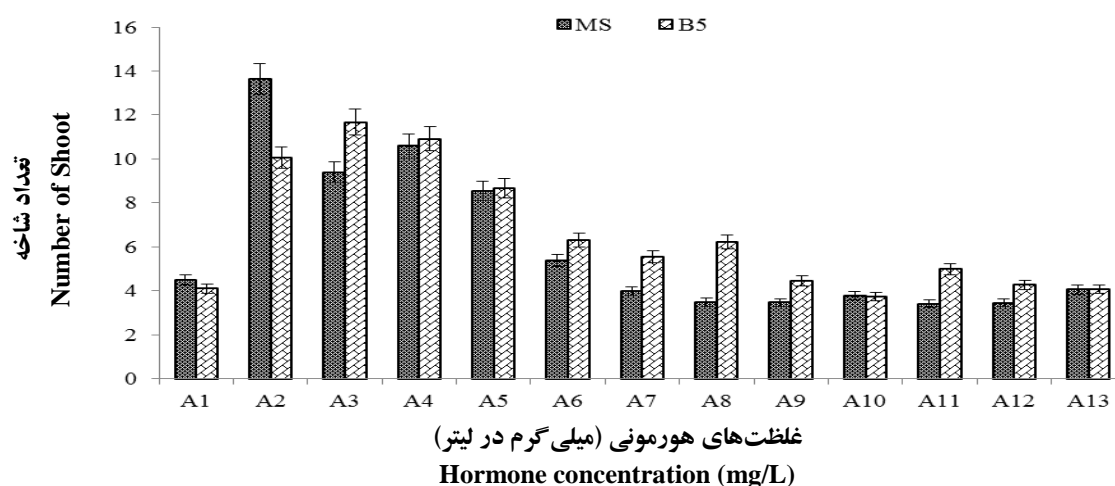
۶-بنزیل آمینوپورین BAP	ایندول بوتیریک اسید IBA	محیط کشت ریشه زایی root proliferation medium	۶-بنزیل آمینوپورین BAP	ایندول بوتیریک اسید IBA	محیط کشت شاخه زایی Shoot proliferation medium
0	0	B1	0	0	A1
0.4	0.5	B2	0.4	0	A2
0.4	0.9	B3	0.8	0	A3
0.4	1.5	B4	1.2	0	A4
0.8	0.5	B5	0.4	0.5	A5
0.8	0.9	B6	0.4	0.9	A6
0.8	1.5	B7	0.4	1.5	A7
1.2	0.5	B8	0.8	0.5	A8
1.2	0.9	B9	0.8	0.9	A9
1.2	1.5	B10	0.8	1.5	A10
0	0.5	B11	1.2	0.5	A11
0	0.9	B12	1.2	0.9	A12
0	1.5	B12	1.2	1.5	A13

جدول ۲- نتایج تجزیه واریانس اثرات محیط کشت و هورمون بر روی صفات مورد مطالعه در پایه رویشی پنتا
 Table 2. The results of variance analysis of culture media and hormone treatments on studied traits of Penta rootstock

میانگین مربعات Mean squares					درجه آزادی df	منابع تغییرات Source of variation
طول ریشه Root length	تعداد ریشه Number of root	طول شاخه Shoot length	تعداد شاخه Number of stem	تعداد برگ Number of leaves		
3.13**	0.16 ^{ns}	0.27 ^{ns}	10.89**	65.75**	1	محیط کشت Medium (A)
173.43**	64.52**	17.45**	100.35**	267.05**	12	غلظت Density (B)
3.02**	1.96**	1.44**	4.87**	27.89**	12	محیط کشت × غلظت A × B
0.14	0.12	0.11	0.16	0.42	64	خطای آزمایش Error
14.06	16.89	15.21	7.32	4.82		ضریب تغییرات (درصد) C.V. (%)

ns و **: به ترتیب عدم وجود اختلاف معنی دار، اختلاف معنی دار در سطح یک درصد.

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



شکل ۱- اثر غلظت‌های مختلف هورمونی روی شاخه‌زایی پایه پنتا

Fig 1. The effect of different hormone concentrations on shoot proliferation of Penta rootstock

تأثیری نداشت و بیشترین تعداد شاخه در این محیط کشت از غلظت ۰/۴ میلی گرم در لیتر BAP حاصل شد (شکل ۲، سمت راست)؛ درحالی که با افزایش غلظت BAP در محیط کشت B5 تعداد شاخساره به طور قابل توجهی افزایش یافت. بالاترین میانگین تعداد شاخساره در محیط کشت B5، در غلظت ۰/۸ و ۱/۲ میلی گرم در لیتر BAP به دست آمد (شکل ۱). همچنین با افزایش تعداد شاخساره، طول شاخساره در محیط کشت MS کاهش یافت.

بر این اساس بیشترین طول شاخه (۶/۵۹ سانتی متر) در

Isikalan *et al.* (2008) نیز محیط کشت MS را

بهترین محیط کشت تولید برای ریزازدیادی بادام (Amygdalus communis L.cv. Nonpareil) معرفی نمودند، آن‌ها همچنین پس از بررسی غلظت‌های مختلف هورمونی BAP در محیط کشت MS، غلظت ۱ میلی گرم در لیتر را مناسب‌ترین غلظت برای تولید شاخه بادام در محیط کشت گزارش کردند.

افزایش غلظت BAP تا حدودی بر روی تعداد

شاخساره تولیدشده از هر ریزنمونه در محیط کشت MS

بررسی کردند بیشترین تعداد برگ از ریزنمونه‌های تیمار شده با غلظت یک و ۰/۵ میلی گرم در لیتر BAP در محیط کشت WPM به دست آمد.

در این تحقیق تقریباً پس از دو هفته بعد از استقرار ریزنمونه‌ها روی محیط‌های کشت، اختلاف در رشد اندام‌های رویشی با توجه به نوع محیط کشت مورد استفاده مشهود بود. نمونه‌های مستقر شده روی محیط کشت B5 دارای رشد کندی بودند؛ در حالی که نمونه‌های کشت شده در محیط کشت MS از وضعیت رشدی مناسبی برخوردار بودند. رنگ برگ‌ها در محیط کشت B5 به صورت سبز روشن و در محیط MS سبز تیره بود، به گونه‌ای که رنگ پریدگی و نهایتاً نکروزه شدن در محیط B5 در صورت تأخیر در واگشت نسبت به محیط MS زودتر ایجاد می‌شد. در بررسی ریزازدیادی پایه‌های مختلف درختان میوه، محیط کشت‌های مختلف به کار گرفته شده نشان داد که انواع مختلف ناهنجاری‌های رشد، به نحوی با نوع محیط کشت مرتبط بودند (Ruzic et al., 2000).

بر این اساس بیشترین تعداد ریشه (۸/۴۱ عدد) در محیط کشت B5 دارای غلظت ۰/۹ میلی گرم در لیتر IBA به دست آمد (شکل ۵، سمت چپ). نمونه‌های کشت شده در ترکیبی از هورمون IBA و BAP ریشه‌زایی ضعیفی داشتند. علاوه بر تأثیر محیط کشت بر عملکرد صفات مرتبط با ریزازدیادی در پایه رویشی پنتا، هورمون‌ها نیز به عنوان فاکتور مهمی در تحریک سلول، تشکیل و تکثیر جوانه‌ها و همچنین القاء ریشه‌زایی و رشد آن‌ها نقش دارند. ریشه‌زایی در شرایط درون‌شیشه‌ای یکی از مهم‌ترین مراحل ریزازدیادی است، به ویژه ریشه‌زایی گیاهان چوبی که اغلب به سختی صورت می‌گیرد (Erbenova et al., 2001). توانایی اکسین در توسعه و تشکیل ریشه شناخته شده است. بالاترین میزان ریشه‌زایی در محیط کشت B5 و MS در غلظت ۰/۹ میلی گرم در لیتر IBA به دست آمد (شکل ۶). (Daneshvar Hossini et al., 2010) در بررسی ریزازدیادی پایه رویشی گزیلا ۶ بیشترین ریشه‌زایی را در محیط کشت MS به همراه یک میلی گرم در لیتر IBA گزارش کردند. نتایج این پژوهشگران با نتایج این تحقیق بسیار نزدیک می‌باشد.

محیط کشت MS با غلظت ۰/۸ میلی گرم در لیتر BAP ایجاد شد (شکل ۲، سمت چپ) و کمترین طول شاخه (۰/۷۴ سانتی متر) در محیط کشت B5 با ترکیبی از هورمون ۱/۵ میلی گرم در لیتر IBA و ۱/۲ میلی گرم در لیتر BAP به دست آمد (شکل ۳). در تحقیق حاضر نمونه‌های موجود در محیط کشت B5 طول شاخه بلندتری نسبت به نمونه‌های کشت شده در محیط کشت MS داشتند (شکل ۳). بررسی ریزازدیادی زردآلوی رقم کاینو نشان داد که با افزایش غلظت BAP، شدت پرآوری بسیار بالا و طول شاخساره‌ها حداقل بود (Perez-Tornero et al., 2000) این نتیجه، تقریباً با نتایج این تحقیق هم‌راستا می‌باشد.

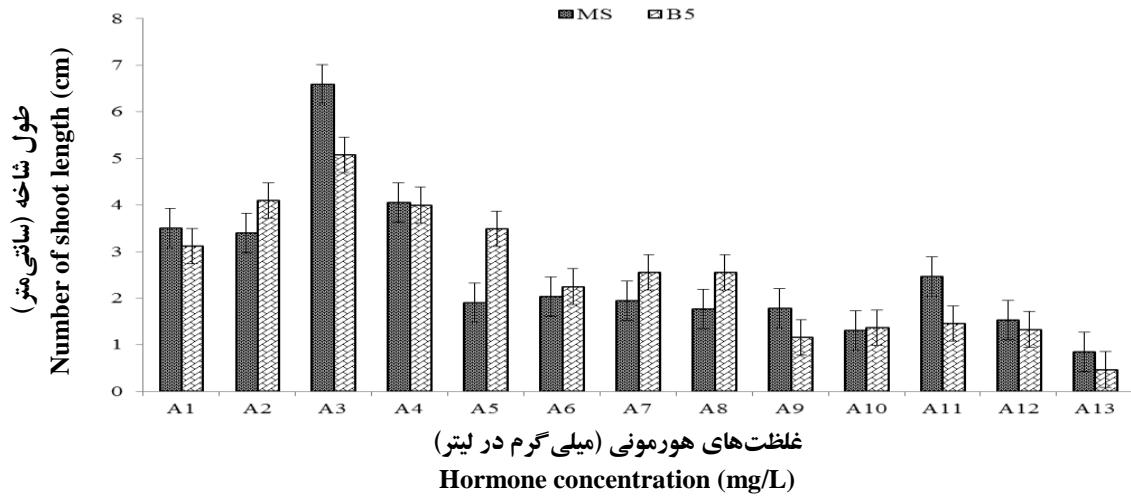
(Nazary Moghaddam and Yadollahi, 2012) در بررسی ریزازدیادی پایه رویشی GF677 بیشترین طول شاخه را در شرایط استفاده از ۱ میلی گرم در لیتر BAP در محیط کشت MS گزارش کردند. نتایج این تحقیق با نتایج به دست آمده از تحقیق حاضر مطابقت دارد. (Bolandi et al., 2016) در تحقیق تأثیر هورمون و محیط کشت بر پتانسیل ریزازدیادی پایه رویشی GF677 بیشترین طول شاخه را در شرایط استفاده از غلظت یک میلی گرم در لیتر BAP در محیط کشت WPM گزارش کردند. در بررسی اثرات محیط کشت، تیمار گندزدایی و هورمونی در ریزازدیادی برخی از پایه‌های رویشی سیب (Mallus domestica Borkh) پایه MM106 بیشترین طول شاخه را داشته و در بین غلظت‌های هورمونی، غلظت هورمونی ۰/۱ میلی گرم در لیتر IBA به همراه یک میلی گرم در لیتر BAP بهترین نتیجه را در برداشت (Mohamadzadeh Moghadam and Hamidi, 2017).

در این تحقیق بیشترین (۲۸/۴۵ عدد) و کمترین (۷/۵۵ عدد) تعداد برگ به ترتیب از ریزنمونه‌های تیمار شده با غلظت‌های ۰/۴ میلی گرم در لیتر BAP و ۱/۵ میلی گرم در لیتر IBA در محیط کشت MS به دست آمد (شکل ۴). ترکیب هر مقدار از هورمون IBA و BAP تأثیر چندانی در کاهش یا افزایش تعداد برگ نداشت، به طوری که کمترین تعداد برگ در هر دو محیط کشت از غلظت ۱/۵ میلی گرم در لیتر IBA حاصل شد. (Bolandi et al., 2016) که تأثیر محیط کشت و هورمون بر تکثیر پایه رویشی GF677 را



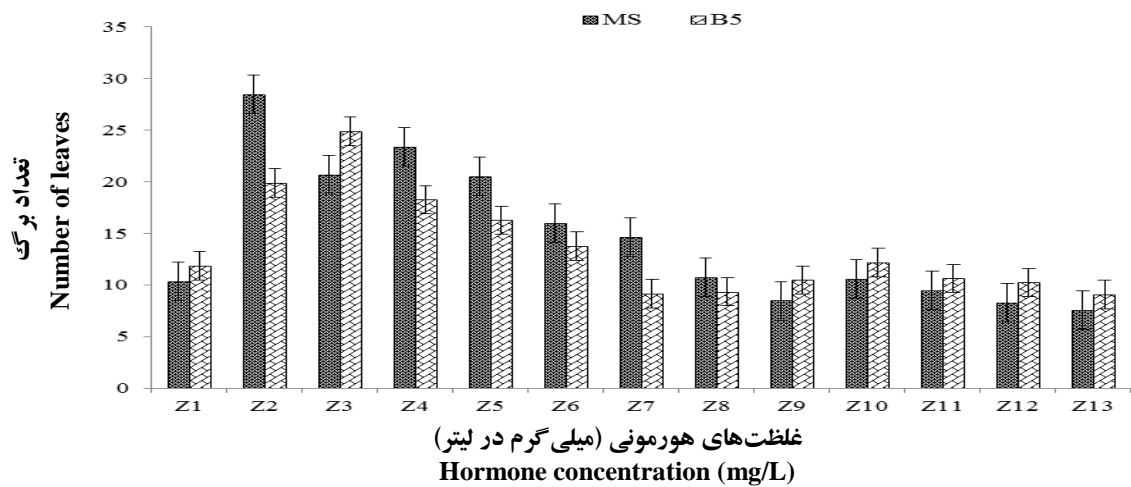
شکل ۲- سمت راست و چپ به ترتیب نشان‌دهنده بیشترین تعداد و طول شاخه؛ در محیط کشت حاوی ۰/۴ و ۰/۸ میلی‌گرم در لیتر BAP

Figure 3. The most shoot proliferation on medium supplemented with 0.4 mg/l BAP: longest shoot on medium containing 0.8 mg/l BAP



شکل ۳- اثر غلظت‌های مختلف هورمونی روی شاخه‌زایی پایه بنتا

Figure 2. The effect of different hormone concentrations on shoot proliferation of Penta rootstock



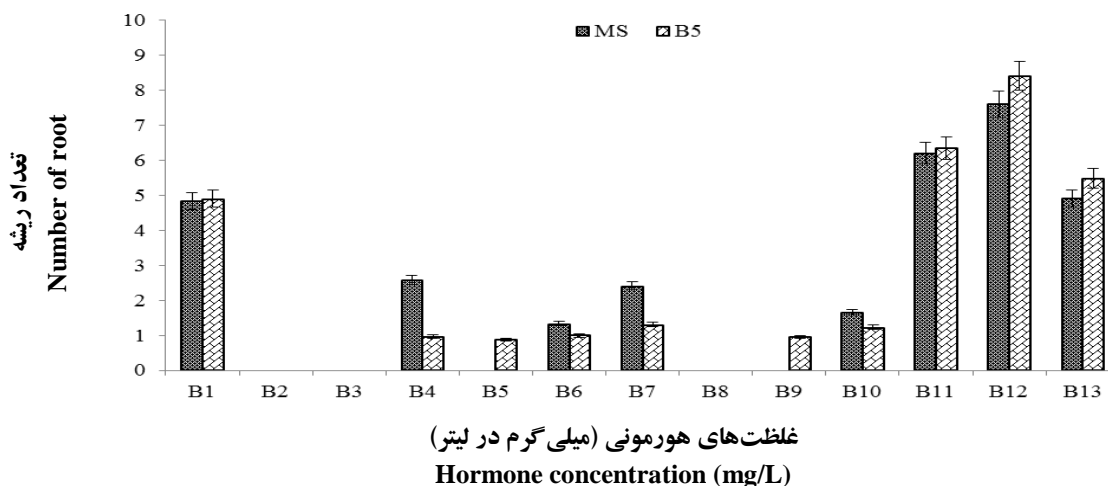
شکل ۴- اثر غلظت‌های مختلف هورمونی روی تعداد برگ تولیدشده

Figure 4. The effect of different hormone concentrations on Number of leaves of Penta rootstock



شکل ۵- سمت راست و چپ به ترتیب دارای بیشترین طول ریشه در محیط کشت MS با هورمون ۱/۵ میلی گرم در لیتر IBA و بیشترین تعداد ریشه در محیط کشت B5 با هورمون ۰/۹ میلی گرم در لیتر IBA

Figure 7. The highest longest root on medium supplemented with 1.5 mg/l IBA and the root number on medium supplemented with 0.9 mg/l IBA



شکل ۶- اثر غلظت های مختلف هورمونی روی ریشه زایی پایه پنتا

Figure 5. The effect of different hormone concentrations on rooting of Penta rootstock

بر این اساس بیشترین طول ریشه ۱۴/۷۵ سانتی متر و ۱۳/۰۸ سانتی متر به ترتیب در محیط کشت های MS و B5 دارای ۱/۵ میلی گرم در لیتر IBA به دست آمد (شکل ۷). Bolandi *et al.* (2016) در تحقیق تأثیر محیط کشت و هورمون بر تکثیر پایه رویشی GF677 بیان کردند بالاترین میانگین طول ریشه در محیط WPM از کاربرد NAA با غلظت ۰/۵ میلی گرم در لیتر و بدون استفاده از هورمون BAP به دست آمد.

Tatari Vernosefadrani *et al.* (2012) جهت ازدیاد سه پایه رویشی درختان میوه هسته دار شامل Vpk1، سنت جولین A و GF677 در شرایط درون شیشه ای از محیط های کشت MS تغییر یافته، WPM و Knop استفاده کردند و به

Tatari Vernosefadrani *et al.* (2012) جهت ازدیاد سه پایه رویشی درختان میوه هسته دار شامل Vpk1 و GF677 و (P.insititia) A، سنت جولین (P.Cerasiferae)، سنن جولین (هیرید هلو - بادام) در شرایط درون شیشه ای از محیط های کشت MS تغییر یافته، WPM و Knop استفاده کردند و به این نتیجه رسیدند که در محیط کشت MS حاوی یک میلی گرم در لیتر IBA کمترین تعداد ریشه و در محیط کشت MS حاوی یک میلی گرم در لیتر NAA بیشترین تعداد ریشه را تولید کردند.

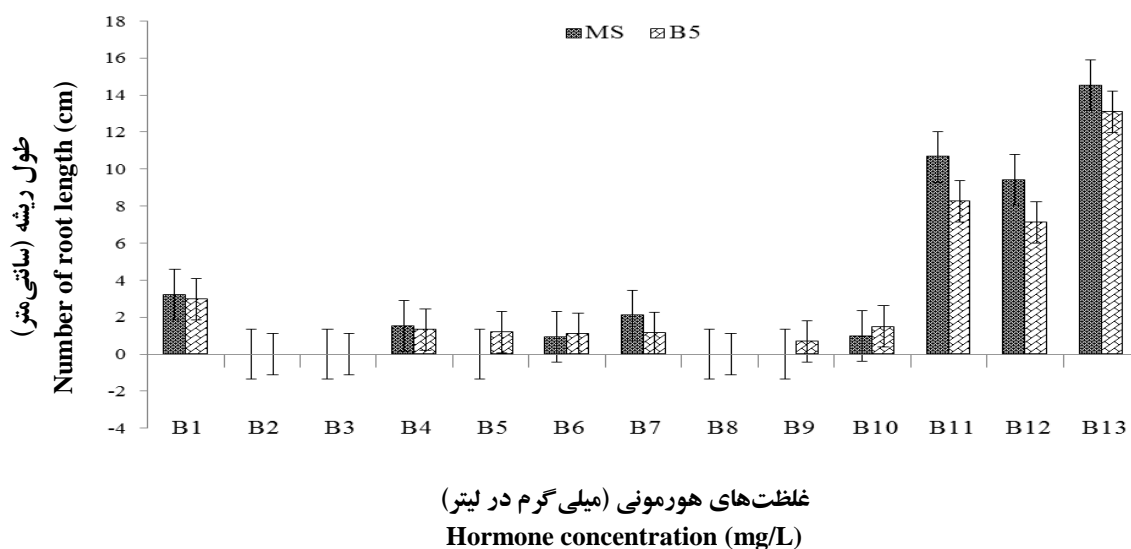
Ahmad *et al.* (2003) سه هورمون IBA، NAA و IAA را برای ریشه زایی جوانه های GF677 به کار بردند و بهترین پاسخ را در استفاده از هورمون IBA گزارش کردند.

پیت خزه و ورمی کولایت ۹۲ درصد موفقیت در سازگار کردن گیاهچه‌ها حاصل شد (Channuntapipat *et al.*, 2003). در روشی دیگر مشابه با این مطالعه، سازگاری موفق گیاهچه‌های زردآلو بعد از انتقال آن‌ها به گلدان‌های دارای پیت و پرلیت به نسبت ۱:۱ و کاهش تدریجی رطوبت حاصل شد (Perez-Tornero *et al.*, 2000).

موفقیت ریزازدیادی به توانایی انتقال گیاهچه‌ها به بستر گلدان و سازگار کردن موفق آن‌ها به شرایط محیط بیرون بستگی دارد. گیاهچه‌های پنتا در مرحله انتقال، در گلدان‌های کوچک و سرپوش دار دارای بستر ضدعفونی شده پیت خزه و پرلیت به نسبت ۱:۱ سازگاری خوبی با شرایط محیط بیرون از خود نشان دادند (شکل ۸).

این نتیجه رسیدند که پایه‌های سنت جولین A و Vpk1 در محیط MS حاوی یک میلی‌گرم در لیتر NAA و پایه GF677 در محیط MS حاوی یک میلی‌گرم در لیتر IBA ریشه‌هایی با طول بیشتر تولید کردند.

(Karamad *et al.*, 2010) گزارش کردند که گیاهچه‌های گزیلا ۶ در مرحله انتقال، در گلدان‌های جی‌فی (gefi) دارای بستر ضدعفونی شده کوکویت و پرلیت سازگاری بالایی داشتند، ایشان بیان کردند گیاهچه‌هایی که در محیط کشت مایع با غلظت دو میلی‌گرم بر لیتر IBA ریشه‌دار شده بودند، از نظر کیفیت و کمیت، ریشه‌زایی بهتری داشتند و نسبت به تنش‌های محیطی سازگارتر بودند. اگرچه در سازگاری ارقام بادام بدون اشاره به نسبت ترکیب



شکل ۷- اثر غلظت‌های مختلف هورمونی روی ریشه‌زایی پایه پنتا

Figure 6. The effect of different hormone concentrations on rooting of Penta rootstock



شکل ۸- گیاهچه‌های پنتا پس از انتقال به خاک

Figure 8. In-vitro derived Penta new plant after transplanting

نتیجه گیری

به طور کلی، در مقایسه اثر انواع محیط کشت و تنظیم کننده های رشد بر ریزادیدادی پایه رویشی پنتا و با در نظر گرفتن تمامی عوامل می توان بیان کرد که بیشترین شاخه زایی پایه پنتا در محیط کشت MS حاصل شد که می تواند به دلیل وجود مقادیر بالای نیتروژن (نیترات آمونیوم) در ترکیب آن باشد. گیاهچه ها در محیط MS شاداب تر، دارای رشد طبیعی تر و بیش تری نسبت به گیاهچه های رشد یافته در محیط کشت B5 بودند. به طور کلی می توان گفت ریز نمونه ها در نمک MS از رشد کیفی مطلوب تر و نرمال تری برخوردار بودند. در مقابل گیاهچه هایی که در نمک B5 رشد یافته بودند، حالت بدشکل و شیشه ای شده داشته و ساقه ها آبدار، برگ ها باریک و لوله ای و دارای رشد غیرطبیعی بودند. محیط کشت B5 از نظر ترکیبات با محیط کشت MS در مقادیر مواد مورد استفاده تفاوت دارد، فاقد گلیسین است ولی دارای تیمین بیشتری از محیط کشت MS است. در این تحقیق بیشترین ریشه زایی در محیط کشت B5 به دست آمد.

برای شاخه زایی تیمار هورمونی ۰/۴ میلی گرم در لیتر BAP در محیط کشت MS و ۰/۸ و ۱/۲ میلی گرم در لیتر BAP در محیط کشت B5 مناسب می باشد و برای ریشه زایی تیمار هورمونی ۰/۹ میلی گرم در لیتر IBA در هر دو محیط کشت مناسب می باشد. با توجه به نتایج به دست آمده پایه پنتا توانایی ازدیاد از طریق کشت بافت را به خوبی دارد.

سپاسگزاری

مؤلفان بر خود لازم می دانند از خانم مهندس سراوانی و مامی زاده مسولین محترم آزمایشگاه دانشگاه گنبد کاووس که در اجرای این تحقیق همکاری صمیمانه ای داشتند سپاسگزاری و قدردانی نمایند.

تضاد منافع

مؤلفان از مدیریت محترم مجله می خواهند تا سیاست جاری مجله را دنبال کنند و از این نظر اختلافی ندارند.

سهم نویسندگان

نویسندگان به ترتیب طبق آنچه در لیست نویسندگان آمده از مزایای مادی و معنوی مقاله سهم خواهند برد.

References

- Ahmad, T., Rahman, H., Ahmad M. S. and Laghari M. H. (2003). Effect of culture media and growth regulators on micropropagation of peach rootstock GF677. *Pakistan Journal of Botany*, 35(3), 331-338.
- Ambrozic, B., Smole, J. and Sifter, A. (1992). Micropropagation of a plum ecotype (*Prunus domestica* L.) as rootstock for apricot. *Acta Horticulturae*, 300(11), 111-114.
- Andreu, P. and Marin J. A. (2004). Micropropagation enhance *in vitro* establishment and multiplication of new cultivars from field grown plants of Adesoto101 (*Prunus insititia*) rootstock. *Acta Horticulturae*, 658(91), 605-609.
- Bolandi, A. R., Hamidi H. and Rezagholy A. A. (2016). Effects of culture media and growth regulators on propagation of rootstock GF677 in tissue culture condition. *Journal of Plant Researches*, 29(1), 1-14. [In Farsi]
- Channuntapipat, C., Sedgley M. and Collins G. (2003). Micropropagation of almond cultivars nonpariel and neplus ultra and the hybrid rootstocks titan nemagard. *Scientia Horticulturae*, 98(4), 473-484.
- Daneshvar Hossini, A.R., Ganji Moghadam E. and Anahid S. (2010). Effects of media cultures and plant growth regulators in micropropagation of Gisela 6 rootstock. *Annals of Biological Research*, 1(2), 135-141. [In Farsi]
- Dobranszki, J. and Teixeira da Silva, J.A. (2010) Micropropagation of apple a review. *Biotechnology Advances*, 28(4), 462-488.

- Erbenova, M., Paprstein F. and Sedlak J. (2001). In vitro propagation of dwarfed rootstocks for sweet cherry. *Acta Horticulturae*, 560(95), 477-480.
- Hartmann, H. T., Kester, D. E. and Davies F. T. (1990). *Plant propagation, principles and practices*. New Jersey, USA: Prentice-Hall International.
- 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 of Biotechnology*, 7(12), 1875-1880.
- Karamad, Z., Ganji Moghaddam, E. and Bolandi A. R. (2014). The effect of culture media and growth regulators on propagation of Gisela 6 rootstock. *Journal of crops improvement*, 16(2), 339-351. [In Farsi]
- Kornova, K. and Popov, S. (2010). Effect of growth regulators for *ex vitro* rooting during adaptation of in vitro propagated plants to non-sterile condition. *General and Applied Plant Physiology*, 36 (1-2), 69-72.
- Mahdaviyan, M., Bozari, N. and Abdollahi, H. (2011). Effects of culture media and growth regulators on proliferation and rooting of a vegetative mahlab rootstock (SL-64). *Seed and Plant Production Journal*, 26(1), 15-26. [In Farsi]
- Massai, R. and Loreti F. (2004). Preliminary observations on nine peach rootstocks grown in a replant soil. *Acta Horticulturae*, 658(26), 185-192.
- Mohamadzadeh Moghadam, N. and Hamidi H. (2017). Investigating the effects of medium, sterilization and hormonal treatment on micropropagation of some apple (*Mallus domestica* Borkh.) rootstocks. *Plant Productions*, 40(1), 41-54. [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. *Plant Productions*, 37(3), 83-92. [In Farsi]
- Nazary Moghaddam, R. and Yadollahi A. (2012). Micropropagation of GF677 rootstock. *Journal of Agricultural Science*, 4(5), 131-138. [In Farsi]
- Perez-Tornero, O., Egea, J., Vanoostende, A. and Burgos L. (2000). Assessment of factors affecting adventitious shoot regeneration from in vitro cultured leaves of apricot. *Plant Science*, 158(1-2), 61-70.
- Pinochet, J., Fernandez C., Cunill, M., Torrents J., Felipe, A., Lopez, M. M., Lastra, B. and Penyalver, R. (2002). Response of new interspecific hybrids for peach to root-knot and lesion nematodes and crown gall. *Acta Horticulturae*, 592(99), 707-716.
- Quoirin, M. and Lepoivre, P. (1977) Improved medium for in vitro culture of *Prunus* sp. *Acta Horticulturae*, 78(54), 437-442.
- Reski, R. and Abel, W. O. (1985). Induction of budding on chloronemata and caulonemata of the moss, *Physcomitrella patens*, using isopentenyladenine. *Planta*, 165(3), 354-358.
- Rogalski, M., Moraes, L. K., Felisbino, C., Crestani, L., Guerra, M. P. and Silva, A. L. (2003). Acclimatization of micropropagated *Prunus* sp. rootstock. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 25(2), 279-281.
- Ruzic, D., Saric, M., Cerovic, R. and Culafic, L. (2000). Relationship between the concentration of macro elements, uptake and multiplication of cherry rootstock Gisela 5 in vitro. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 63(1), 9-14.
- Ruzic, D., Saric, M., Cerovic, R. and Culafic, L. (2003). Contents of macroelements and growth of sweet cherry rootstocks in vitro. *Biologia. Plantarum*, 47, 463-465.

Tatari Vernosefaderani, M., Mosavi, C. A. and Bozari, N. (2012). Micropropagation of some clonal rootstocks of stone fruits. *Seed and Plant Improvement Journal*, 28(1), 53-66. [In Farsi]



© 2019 by the authors. Licensee SCU, Ahvaz, Iran. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution-Non Commercial 4.0 International (CC BY-NC 4.0 license) (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>)