Plant Prod., 43(2) (2020) 241-254 ISSN (P): 2588-543X
DOI: 10.22055/ppd.2019.27439.1667 ISSN (E): 2588-5979

Effect of Different Media and Growth Regulators on Micropropagation of GF677

Mohammad Gerdakaneh[1]*, Hedieh Badakhshan[2], Maryam Mohamadi[3] and Issa Arji[4]

1- ***Corresponding Author:** Assistant Professor, Crops and Horticultural Science Research Department, Kermanshah Agricultural and Natural Resources Research and Education Center, AREEO, Kermanshah, Iran (mgerdakaneh@gmail.com)
2- Assistant Professor, Department of Agronomy and Plant Breeding, Faculty of Agriculture, University of Kurdistan, Sanandaj, Iran
3- M.Sc. Graduate of Plant Biotechnology, Faculty of Agriculture, University of Kurdistan, Sanandaj, Iran
4- Associate Professor, Department of Production Engineering and Plant Genetics, Faculty of Science and Agriculture Engineering, Razi University, Kermanshah, Iran

Received: 31 October, 2018 Accepted: 16 January, 2019

Abstract

Background and Objectives

GF677 is a widely used rootstock for peach, nectarine and almond. It is vigourous and adapts well to limestone soils and drought. Due to low efficiency of propagation trough cutting, tissue culture is a good and fast method for propagation of disease-free plants of GF677. *In vitro* multiplication efficiency in GF677 is widely dependent on the type of culture medium and growth regulators. Therefore, the aim of this study was to determine the conditions required to optimize micropropagation methods for GF677 rootstock from nodal explants.

Materials and Methods

This experiment was conducted during 2015 at the laboratory of plant tissue culture at Agricultural and Natural Resources Research Center of Kermanshah, using a factorial in a completely randomized design with three replications. Sterile nodal explants were cultured onto different media of MS, WPM and B5 supplemented with benzyl adenine (BA) at concentrations of 0.25, 0.5, 1, 2 and 4 mg/L and indole-3-butyric acid (IBA) at concentrations of 0, 0.1, 0.25 and 0.5 mg/L. Elongated shoots of GF677 were cultured on MS medium supplemented with 0.25, 0.5, 1.0 and 2.0 mg/l IBA and 0.0, 0.1, 0.2 and 0.5 mg/l BA for rooting. Factorial analysis of variance was carried out and differences between means were scored with LSD tests.

Results

The effect of different culture media (MS, B5 and WPM) and plant growth regulators (BA and IBA) on a number of shoots per proliferated explant of GF677 proved that the highest rate of adventitious shoot initiation, percentage of egeneration, shoot length and diameter, number and length of nodal, leaf number and multiplication was obtained in MS medium containing 1 mg/l BA + 0.5 mg/l IBA. Cytokinin stimulates the initiation and activity of axillary meristems, which result in shoot formation. This study showed that the number of shoots increased as concentration of BA increased to a certain amount. As concentration of BA increased to 1 mg/l, the number of shoots increased, too. It seems that there is a positive correlation between concentration of BA and the number of shoots to a certain concentration of BA. At concentrations higher than 1 mg/l

BA the number of shoots increased. One of the possible reasons can be the reductive effect of higher concentrations of BA. Apparently, a certain amount of BA is required to obtain the best effect. Higher concentrations of BA cause formation of high amount of callus, which is not appropriate in tissue culture. The results of this experiment confirmed the positive influence of the growth regulator on the number of roots per shootlet. Among the various plant growth regulators used, the highest rate of rooting (33%) and the number of roots per shootlet (1.62) were obtained on MS medium containing 1.0 mg/l IBA and 0.5 mg/l BA. The concentration of auxin during rooting period strongly influenced the quality of root system during the rooting period. Rooted plants were transferred to a combination of terrestrial environments, including perlite, sand and soil in the ratio of 1: 2: 1, respectively. Among rooted plantlets that were acclimatized and transferred to the potting mix successfully, 90% survived and grew naturally after strengthening and transferring to the soil.

Discussion

The shoot multiplications are influenced by the media and growth regulators. The MS medium gave the best results for the proliferation of cultures from explant among the tested media (MS, B5 and WPM). Growth regulators compounds have significant effects on different traits and these changes depend on type and concentration of hormone. Both cytokinin and auxins are important in micropropagation for GF677 rootstock.

Keywords: Auxin**,** Cytokinin, Explant, Regeneration

اثر نوع محیط کشت و تنظیم‌کننده‌های‌رشد بر ریزازدیادی پایه‌رویشی GF۶۷۷ (دورگ بین هلو و بادام)

محمد گردکانه[1]*، هدیه بدخشان[2]، مریم محمدی[3] و عیسی ارجی[4]

۱-***نویسنده مسئول:** استادیار بخش تحقیقات علوم زراعی و باغی، مرکز تحقیقات، آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان کرمانشاه، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرمانشاه، ایران (mgerdakaneh@gmail.com)

۲- استادیار، گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه کردستان، سنندج، ایران

۳- دانش‌آموخته کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه کردستان، سنندج، ایران

۴- دانشیار، گروه تولید و ژنتیک گیاهی، دانشکده علوم و مهندسی کشاورزی، دانشگاه رازی، کرمانشاه، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۰۸/۰۹ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۱۰/۲۶

چکیده

پایه GF۶۷۷، یک پایه مناسب برای بادام و هلو است، که به‌طور گسترده در سراسر دنیا استفاده می‌شود. در این تحقیق به‌منظور بهبود روش ریزازدیادی پایه GF۶۷۷، ریزنمونه‌های گره بر روی محیط‌های کشت MS، B_5 و WPM در حاوی تنظیم‌کننده‌های رشد بنزیل آدنین (BA)، در شش غلظت صفر، ۰/۲۵، ۰/۵، ۱، ۲ و ٤ میلی‌گرم بر لیتر و ایندول-۳- بوتیریک اسید (IBA) در چهار غلظت صفر، ۰/۱، ۰/۲۵ و ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر در مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع‌طبیعی کرمانشاه در سال ۱۳۹۵ اجرا شد. آنالیز داده‌های صفات مختلف بر اساس مدل آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی تجزیه و تحلیل گردید و مقایسات میانگین داده‌ها به روش آزمون LSD در سطح احتمال پنج درصد انجام شد. نتایج نشان داد که محیط کشت MS، همراه با ۱ میلی‌گرم در لیتر BA و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر IBA با تولید بیشترین تعداد شاخساره، بلندترین طول ساقه، بیشترین قطر ساقه، تعداد گره و فواصل میان‌گره، تعداد برگ و درصد ریزنمونه‌های باززایی‌شده، مناسب‌ترین محیط کشت در بین سایر محیط‌های کشت مورد استفاده بود. جهت ریشه‌زایی، شاخساره‌ها را به محیط کشت MS جامد همراه با IBA، در چهار غلظت ۰/۲۵، ۰/۵، ۱ و ۲ میلی‌گرم در لیتر و BA، در چهار غلظت صفر، ۰/۱، ۰/۲ و ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر منتقل شدند. بهترین ریشه‌زایی در محیط کشت MS حاوی ۱ میلی‌گرم در لیتر IBA و ۰/۵ BA حاصل شد. گیاهچه‌های ریشه‌دارشده در محیط شامل پرلیت، ماسه و خاک به نسبت ۱:۲:۱ قرار گرفتند. ۹۰ درصد نمونه‌های انتقال‌یافته به محیط خاکی زنده مانده و رشد طبیعی داشتند.

کلیدواژه‌ها: اکسین، باززایی، ریزنمونه، سیتوکینین

مقدمه

پایه رویشی دورگ هلو و بادام GF۶۷۷ به خشکی مقاوم است (Hudina et al., 2010) و بر خلاف هلو مقاومت زیادی نسبت به خاک‌های آهکی دارد از این‌رو پایه بسیار مناسبی برای درختان هلو و بادام بوده که در دنیا به‌طور گسترده‌ای مورد استفاده قرار می‌گیرد (Antonopoulou et al., 2005).

روش ازدیاد در شرایط درون شیشه‌ای برای تولید سریع پایه‌های رویشی عاری از بیماری که تکثیر آن‌ها با روش‌های سنتی مشکل است، مورد استفاده قرار می‌گیرد (Hartmann et al., 2007). با وجود مزایای فراوان کشت بافت، انتخاب محیط کشت، نوع و غلظت تنظیم‌کننده‌های رشد برای گونه‌ها و ارقام مختلف از جمله مشکلات این روش محسوب می‌شود (Bakhtiari et al., 2017) زیرا

باززایی گیاهچه از یک گونه به گونه دیگر و از رقمی به رقم دیگر متفاوت است (Gerdakaneh et al., 2011). استفاده از سیتوکنین به تنهایی یا همراه با اکسین در ریزازدیادی میوه‌های خشک (Choudhary et al., 2015)، دورگ هلو × بادام (Arab et al., 2014; Bagheri et al., 2017) گیلاس (Durkovic, 2006) پایه رویشی گلابی (Khodaei Chegini et al., 2011) با نتایج رضایت‌بخشی همراه بوده است. Iskalan et al. (2008) اثر غلظت‌های مختلف سیتوکنین‌های بنزیل آمینوپورین (BAP) به تنهایی و همراه با غلظت‌های مختلف اکسین اسید بوتیریک ایندول (IBA) در محیط کشت MS بر باززایی بادام رقم نون‌پاریل در شرایط درون شیشه‌ای مورد بررسی قرار دادند. نتایج آن‌ها نشان داد که بیشترین باززایی در محیط کشت MS حاوی ۱ میلی‌گرم در لیتر BAP همراه با ۰/۲ و ۰/۴ میلی‌گرم در لیتر IBA به‌دست‌آمد. Sharifmoghaddam et al. (2011) در پژوهشی، بهینه سازی محیط کشت پایه‌های GF۶۷۷ را مورد بررسی قرار دادند. نتایج نشان داد که بهترین غلظت تنظیم‌کننده‌های رشدی برای شروع ساقه‌زایی محیط کشت MS همراه با ۲ میلی‌گرم در لیتر BA + ۰/۰۱ میلی‌گرم در لیتر IBA + بود و بهترین محیط برای القای ریشه MS ۰/۵میلی‌گرم در لیتر IBA گزارش شد. Akbarpour et al. (2017) گیاهچه‌های پنج رقم تجاری بادام (سوپرنوا، تونو، سهند، فراگنس و شاهرود ۲۱) برای باززایی در محیط MS حاوی ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر BAP و سپس در محیط کشت MS شامل ۱ میلی‌گرم در هر لیتر BAP زیرکشت کردند.

نوع محیط کشت نقش به سزایی در تکثیر درون شیشه‌ای پایه درختان میوه دارد (Bolandi et al., 2016; Khodaei Chegini et al., 2011). ترکیب محیط کشت روی میزان پرآوری و ازدیاد پایه‌های هسته‌دارها مؤثر است، این تأثیر ناشی از ترکیب نمک‌های موجود در محیط کشت می‌باشد. به نظر می‌رسد غلظت بالای عناصر غذایی به کاررفته در محیط کشت MS مزیت این محیط کشت می‌باشد (Shehata and Al-Khayri, 2013; Kose and Canli, 2015).

ریشه‌زایی شاخساره‌ها یک مرحله اجباری و تعیین‌کننده موفقیت تکثیر گیاهان در شرایط درون شیشه‌ای محسوب می‌شود (Eugene et al., 2007). عدم القاء ریشه‌های نابجا یک عامل محدودکننده در قلمه‌های معمولی و شاخساره‌های حاصل از کشت بافت است (Ali et al., 2009). مدت مدیدی است که نقش اکسین در ریشه زایی شناخته‌شده و نقش مثبت این تنظیم‌کننده رشد بر القاء و توسعه پریموردیای ریشه به خوبی مستند است. در میان اکسین‌های مختلف، استفاده IBA برای تحریک ریشه‌زایی ریزقلمه‌ها به علت سمیت ضعیف و ثبات زیاد بسیارمعمول است (Hartmann et al., 2007). در پژوهشی، بهترین محیط برای القای ریشه‌زایی پایه GF۶۷۷ محیط MS همراه با ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر IBA تعیین شد (Sharifmoghaddam et al., 2011).

با توجه به این‌که کارایی ازدیاد پایه رویشی GF۶۷۷ در شرایط درون شیشه‌ای تحت تأثیر نوع محیط کشت و تنظیم‌کننده‌های رشد قرار می‌گیرد. بنابراین هدف از این مطالعه، استفاده تنظیم‌کننده‌های رشد و محیط‌های کشت MS، WPM و B_5 برای بهینه‌سازی ریزازدیادی پایه GF۶۷۷ در شرایط درون شیشه‌ای بود.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری نمونه

شاخه‌های سال جاری پایه GF۶۷۷ در ۱۵ اردیبهشت از باغ شهری مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع‌طبیعی استان کرمانشاه واقع در شهرستان کرمانشاه تهیه و به آزمایشگاه منتقل شدند. برای تهیه ریزنمونه، شاخه‌های جانبی جوان به طول ۱/۵ تا ۲ سانتی‌متر از شاخه‌ها جدا شد و به منظور حذف آلودگی‌های سطحی به مدت ۱۵ دقیقه در زیر جریان آب شسته شدند، سپس به‌مدت ۱۰ دقیقه نمونه‌ها را در محلول ۱/۵ درهزار قارچ‌کش بنومیل قرار داده و بعد آن‌ها را در زیر هود لامینار به مدت ۳۰ ثانیه در الکل اتیلیک ۷۰ درصد قرار داده و توسط

هیپوکلرید سدیم به‌مدت ۱۵ دقیقه ضدعفونی شدند. جهت حذف بقایای ماده ضدعفونی‌کننده از سطح ریزنمونه‌ها، سه بار با آب دوبار تقطیر استریل شسته شدند.

تهیه محیط کشت

محیط‌های کشت MS، B5 و WPM حاوی ۳ درصد ساکارز و ۰/۸ درصد آگار، همراه با تنظیم‌کننده‌های رشد BA در شش غلظت صفر، ۰/۲۵، ۰/۵، ۱، ۲ و ۴ میلی‌گرم در لیتر همراه با چهار غلظت صفر، ۰/۱، ۰/۲۵ و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر IBA، تهیه شد. pH محیط کشت قبل از افزودن آگار به محیط‌های، توسط NaOH ۰/۱ مولار بر روی ۵/۸ تنظیم گردید.

محیط‌های کشت را به مقدار ۲۵ میلی‌لیتر در ظروف شیشه‌ای توزیع کرده و به‌مدت ۲۰ دقیقه اتوکلاو شدند. پس از سرد شدن محیط‌های کشت در هود لامینار، جوانه‌های استریل، بر روی آن‌ها کشت شدند. آزمایش با سه تکرار انجام شد و در هر ظرف سه ریزنمونه کشت شد و بلافاصله پس از بستن درب شیشه‌ها، توسط پارافیلم درب آن‌ها کاملاً مسدود گردید تا در اتاقک رشد دچار آلودگی نشوند. سپس کشت‌ها در اتاقک رشد تحت شرایط ۱۶ساعت نور فلورسنت سرد و ۸ ساعت تاریکی در دمای ۲±۲۵ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. درنهایت، تعداد روز موردنیاز جهت شروع باززایی ثبت گردید و پس از شش هفته بعد از کشت، سرعت باززایی، درصد ریزنمونه‌های باززایی‌شده، تعداد شاخساره‌های تولیدشده، طول ساقه، قطر ساقه و تعداد برگ ریزنمونه‌های باززایی‌شده اندازه‌گیری و ثبت شد.

انتقال شاخساره‌ها به محیط ریشه‌زایی

محیط کشت MS حاوی ۳ درصد ساکارز، ۰/۸ درصد آگار همراه با تنظیم‌کننده‌های رشد IBA در چهار غلظت ۰/۲۵، ۰/۵، ۱ و ۲ میلی‌گرم در لیتر همراه با چهار غلظت صفر، ۰/۱، ۰/۲ و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BA تهیه شد. pH محیط کشت ۵/۸ تنظیم گردید. محیط‌های کشت را به مقدار ۳۰ میلی‌لیتر در ظروف شیشه‌ای توزیع کرده و به‌مدت ۲۰ دقیقه اتوکلاو شدند. پس از سرد شدن محیط‌های کشت در هود لامینار، شاخساره‌های حاصل از آزمایش اول را جدا کرده و روی این محیط قرار داده شد. سپس طول ریشه، قطر ریشه، تعداد ریشه تولیدشده و درصد ریشه‌زایی ثبت شد.

انتقال گیاهچه‌های ریشه‌دارشده به محیط سازگاری

گیاهچه‌های ریشه‌دارشده را به‌دقت از محیط کشت جدا سازی نموده و به‌تدریج با آب ملایم جهت حذف بقایای محیط کشت چسبیده به ریشه‌ها شسته شدند و در محلول ۱ درهزار قارچ‌کش به‌مدت ۱۵-۱۰ دقیقه قبل از انتقال، ضدعفونی‌شده و به گلدان با ترکیب پرلیت، ماسه و خاک‌به نسبت ۱:۲:۱ انتقال داده شدند و این گیاهان به مدت ۲ هفته در اتاقک رشد در دمای ۱ ± ۲۰ درجه سانتی‌گراد، با شدت نور ۲۰۰۰ لوکس و دوره نوری ۱۶ ساعت روشنایی، با رطوبت ۸۰ درصد نگهداری گردیدند و برای جلوگیری از از دست دادن سریع رطوبت، گیاهان کشت‌شده در گلدان با لیوان‌های شفاف پوشانده شدند بعد از دو هفته لیوان‌ها برداشته‌شده و رطوبت نسبی کاهش یافت وگیاهان به تدریج در معرض شرایط محیطی بیرون قرار گفتند.

تجزیه‌های آماری

در این تحقیق داده‌های حاصل از یادداشت‌برداری صفات مختلف براساس مدل آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی، تجزیه و تحلیل گردید. مقایسات میانگین داده‌ها به روش آزمون LSD در سطح احتمال پنج درصد انجام شد. برای انجام تجزیه‌های آماری از نرم‌افزارهای MSTAT-C استفاده گردید.

نتایج و بحث

جدول تجزیه واریانس (جدول ۱) نشان می‌دهد که، اثر سطوح محتلف فاکتورهای محیط کشت، تنظیم‌کننده‌های رشد سیتوکنین (BA) و اکسین (IBA) و اثرات متقابل دوگانه میان این فاکتورها و اثر متقابل سه‌گانه محیط × IBA × BA بر روی همه صفات مورد بررسی، معنی‌دار شد.

Table 1. Analysis of variance of the effect of culture medium and growth regulators on diffrent traits of shoot in GF677 rootstock

S.O.V.	df	Mean squares					
		Regeneration rate	Percentage of regeneration	Shoot number	Shoot length	Shoot diameter	Leaf number
Culture medium (A)	2	745.09**	3035.71**	0.65**	588.92**	31.47*	299.10**
B (IBA)	3	13.58**	81.19**	1.93**	120.84**	1.67*	126.11**
B × A	6	13.67**	3116.79**	1.40**	116.52**	1.90*	119.75**
C (BA)	4	10.05**	1559.67**	0.79**	20.21**	0.30**	22.32**
C × A	8	9.74**	838.16**	0.79**	22.84**	0.35*	22.42**
C × B	12	8.89**	1192.89**	0.83**	54.52**	0.70*	65.52**
C × B × A	24	7.97**	1078.47**	0.81**	38.34**	0.75*	42.06**
Error	120	0.45	107.61	0.07	0.79	0.09	0.51
C.V. (%)		5.36	12.36	12.14	13.02	14.60	8.40

** and *: Significant at 1% and 5% level respectively ns: non significant.

سرعت باززایی ریزنمونه‌ها

نتایج مقایسه میانگین‌ها نشان داد که سرعت باززایی ریزنمونه‌ها با توجه به نوع محیط کشت، نوع و غلظت تنظیم‌کننده‌های رشد مختلف متفاوت بود و تشکیل شاخساره در ریزنمونه‌ها بین ۷/۳۳ تا ۱۷/۳۲ روز بعد از انتقال به محیط کشت باززایی آغاز شد. ریزنمونه‌ها در محیط کشت MS حاوی ۴ میلی‌گرم در لیتر BA همراه با ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر IBA، در مقایسه با سایر تیمارها سریع‌تر شروع به باززایی نمودند ولی محیط B5 با غلظت ۰/۲۵ میلی‌گرم در لیتر BA و IBA صفر، نسبت به سایر غلظت‌های هورمونی نیاز به زمان بیشتری برای آغاز باززایی ریزنمونه‌ها داشت (جدول ۲). سیتوکینین و اکسین در تقسیم و طویل شدن سلول تأثیرگذار است ولی تحریک یا بازدارندگی این تنظیم‌کننده‌های رشد به اندام مربوطه، نوع و غلظت آن‌ها بستگی دارد (Campbell et al, 2008). در برخی از گیاهان افزایش نسبت سیتوکینین به اکسین سبب پیدایش جوانه و در نتیجه شاخه‌های برگ‌دار می‌شود (Kieber, 2002). کاربرد غلظت بالای سیتوکینین‌ها موجب حذف غالبیت انتهایی و تحریک تولید شاخه‌های نابجا می‌گردد و نیز مقادیر خیلی زیاد آن سبب مشاهده ناهنجاری‌های ژنتیکی می‌شود (Sharifmoghaddam et al 2011). Tatarivernosafadarani et al. (2012) ازدیاد پایه رویشی GF۶۷۷ با استفاده از روش درون شیشه‌ای در محیط‌های کشت MS تغییریافته، WPM و Knop مورد ارزیابی قرار دادند. نتایج آن‌ها نشان داد که نوع محیط کشت می‌تواند بر سرعت باززایی ریزنمونه‌ها مؤثر باشد. به نظر می‌رسد غلظت بالای عناصر غذایی به کار رفته در محیط کشت MS مزیت این محیط کشت می‌باشد (Kose and Canli, 2015) که با نتایج این تحقیق همسو می‌باشد.

درصد باززایی ریزنمونه‌ها

نتایج مقایسه میانگین‌ها نشان‌داد که ریزنمونه‌ها؛ در محیط کشت B5 بیشترین درصد باززایی (۱۰۰ درصد) در غلظت‌های مختلف BA، همراه با غلظت کم ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر IBA حاصل شد اما در محیط کشت WPM در غلظت‌های مختلف سیتوکنین BA بدون اکسین IBA بیشترین درصد باززایی (۱۰۰ درصد) ثبت شد و در محیط WPM با ۰/۲۵ میلی‌گرم در لیتر BA و ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر IBA کمترین درصد باززایی را داشتند. نتایج مقایسه میانگین‌ها نشان داد، تعداد زیادی از ریزنمونه‌ها، در غلظت‌های مختلف تنظیم‌کننده‌های رشد، می‌توانند به‌صورت صددرصد باززایی نمایند، اما در کیفیت و زمان باززایی بین آن‌ها تفاوت‌های معنی‌داری وجود دارد، نتایج کلی نشان داد، نمونه‌هایی که در محیط MS و در غلظت ۱ میلی‌گرم در لیتر BA و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر IBA قرار گرفتند با سرعت و کیفیت بیشتری ۱۰۰ درصد باززایی را داشتند (جدول ۲). محیط کشت می‌تواند در باززایی گیاهان بسیار مؤثر باشد (Pilar and Marin, 2005). تحقیق انجام‌شده توسط Andreu and Marin (2005) نشان دادند که ترکیب محیط

کشت روی میزان پرآوری و ازدیاد پایه‌های هسته‌دارها تأثیر دارد. به گزارش Ruzic et al. (2003) ترکیب محیط کشت و غلظت نمک‌ها نقش مهمی را در ریزازدیادی پایه گیلاس بازی می‌کند. Zia ul Hasan et al. (2010) تأثیر دو محیط کشت MS و Lp را با غلظت‌های مختلف تنظیم‌کننده‌های رشد BAP و NAA بر روی پایه GF677 مورد بررسی قرار دادند، بیشترین باززایی با استفاده از محیط MS حاصل شد. بر اساس نتایج به‌دست‌آمده، می‌توان نتیجه گرفت که تفاوت تأثیر هورمون‌های مختلف سیتوکنین مربوط به جذب سیتوکنین، توسط سلول‌ها و یا مکانیسم عملکرد ترکیبات سیتوکنین باشد (Ruzic and Vujovic, 2008).

تعداد شاخساره تولیدشده

نتایج مقایسه میانگین‌ها نشان‌داد که حداکثر تعداد شاخساره در محیط کشت MS در ترکیب با ۱ میلی‌گرم در لیتر BA و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر IBA تولید شد (شکل ۱a) و کمترین تعداد شاخساره در محیط کشت MS همراه با ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BA و بدون استفاده از IBA حاصل شد (جدول ۳). این مطالعه نشان داد تعداد شاخساره با افزایش غلظت BA تا غلظت مشخصی افزایش یافت. نتایج نشان داد که تعداد شاخساره در غلظت تا ۱ میلی‌گرم BA در لیتر به میزان ۴/۹۹ شاخساره در هر ریزنمونه افزایش یافت. به نظر می‌رسد که بین غلظت BA و تعداد شاخساره تا یک غلظت خاصی از BA، رابطه مثبت وجود دارد به‌طوری‌که تعداد شاخساره در غلظت ۱ میلی‌گرم لیتر BA به اوج خود می‌رسد. در غلظت‌های بالاتر از ۱ میلی‌گرم در لیتر BA، تعداد شاخساره‌ها کاهش می‌یابد. یکی از احتمالاتی که می‌تواند باعث کاهش تعداد شاخساره‌ها در غلظت بالاتر BA شود ظاهراً مقدار مشخصی از BA برای به دست آوردن بهترین اثر موردنیاز است. غلظت‌های بالاتر BA سبب ایجاد مقدار زیادی کالوس می‌شود که در کشت بافت برای تولید شاخساره مناسب نیست. ترکیب محیط کشت و غلظت نمک‌ها نقش مهمی را در ریزازدیادی بازی می‌کند (Ruzic et al., 2003). Nazarymoghaddam and Yadollahi (2012) نیز برای به‌دست آوردن بیشترین تعداد شاخساره از محیط MS استفاده نمود که با نتایج این تحقیق همسو بود.

Table 2. Mean comparison of the effect of culture medium and growth regulators on regeneration rate and percentage in GF677 rootstock

Growth Regulators (mg/L)		Regeneration rate (days)			Percentage of regeneration		
		Type of culture medium			Type of culture medium		
Auxin (IBA)	Cytokinin(BA)	B5	MS	WPM	B5	MS	WPM
0	0.25	17.33^{a}	9.33^{ijk}	14.67^{ef}	66.66^{de}	66.66^{de}	100.00^{a}
	0.5	17.00^{ab}	9.00^{jkl}	15.33^{c-f}	44.44^{fg}	77.77^{bcd}	100.00^{a}
	1	8.00^{klm}	8.00^{klm}	15.33^{c-f}	81.11^{a-d}	100.00^{a}	100.00^{a}
	2	14.67^{ef}	7.66^{lm}	14.33^{f}	55.55^{ef}	77.77^{bcd}	100.00^{a}
	4	14.33^{f}	9.66^{hij}	14.67^{ef}	100.00^{a}	96.67^{ab}	100.00^{a}
0.1	0.25	9.00^{jkl}	8.66^{j-m}	14.33^{f}	100.00^{a}	77.77^{bcd}	33.33^{g}
	0.5	11.00^{h}	9.33^{ijk}	15.33^{c-f}	100.00^{a}	69.99^{cde}	100.00^{a}
	1	8.00^{klm}	9.00^{jkl}	14.67^{ef}	100.00^{a}	100.00^{a}	55.55^{ef}
	2	16.67^{abc}	8.00^{klm}	15.33^{cdef}	100.00^{a}	100.00^{a}	77.77^{bcd}
	4	15.33^{c-f}	8.66^{j-m}	14.33^{f}	77.77^{bcd}	100.00^{a}	88.89^{abc}
0.25	0.25	16.33^{a-d}	9.00^{jkl}	14.33^{f}	100.00^{a}	88.89^{abc}	100.00^{a}
	0.5	16.33^{a-d}	8.33^{j-m}	14.33^{f}	100.00^{a}	100.00^{a}	44.44^{fg}
	1	15.00^{def}	8.66^{j-m}	15.00^{def}	77.77^{bcd}	88.89^{abc}	44.44^{fg}
	2	15.67^{b-f}	8.66^{j-m}	15.67^{b-f}	44.44^{fg}	100.00^{a}	44.44^{fg}
	4	15.67^{b-f}	8.66^{j-m}	16.00^{a-e}	100.00^{a}	100.00^{a}	100.00^{a}
0.5	0.25	16.33^{a-d}	8.33^{j-m}	15.67^{b-f}	77.77^{bcd}	88.89^{abc}	33.33^{g}
	0.5	10.67^{hi}	8.00^{klm}	15.67^{b-f}	100.00^{a}	100.00^{a}	44.44^{fg}
	1	15.00^{def}	7.33^{m}	15.33^{c-f}	100.00^{a}	100.00^{a}	55.55^{ef}
	2	15.00^{def}	8.33^{j-m}	15.00^{def}	100.00^{a}	77.77^{bcd}	100.00^{a}
	4	12.67^{g}	7.33^{m}	16.00^{a-e}	88.89^{abc}	88.89^{abc}	100.00^{a}

In columns of each trait, means with the same letters are not significantly different among treatments at the levels of 5%.

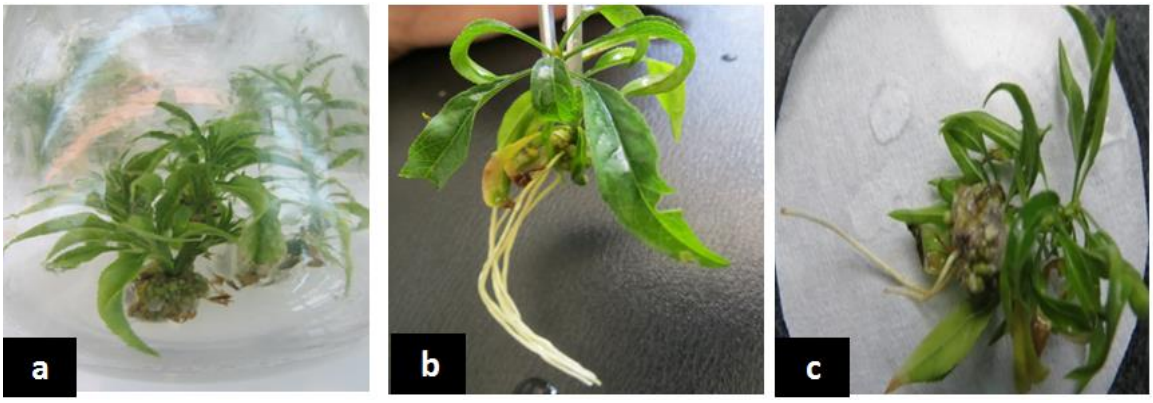

Figure 1. Effect of MS medium and growth regulators on shoot and rooting in GF677; a) MS medium containing 1 mg/L BA and 0.5 mg/L IBA on the number of shoot in GF677. b) MS medium with 1 mg/L BA and 0.5 mg/L IBA. on rooting B) MS medium in combination with 1 mg/L IBA on rooting

Table 3. Mean comparison of the effect of culture medium and growth regulators on shoot number and shoot length in GF677

Growth Regulators (mg/L)		Shoot number			Shoot length (mm)		
		Type of culture medium			Type of culture medium		
Auxin (IBA)	Cytokinin(BA)	B5	MS	WPM	B5	MS	WPM
	0.25	1.00^{ef}	1.00^{ef}	1.00^{ef}	2.93^{u-z}	10.00^{fgh}	1.87^{z}
	0.5	1.00^{ef}	0.33^{g}	1.33^{c-f}	2.53^{w-z}	4.41^{w-n}	10.33^{efg}
0	1	1.00^{ef}	1.00^{ef}	1.00^{ef}	1.43^{z}	6.00^{k-o}	7.200^{jkl}
	2	1.00^{ef}	1.11^{def}	1.22^{def}	2.33^{xyz}	13.67^{cd}	12.00^{de}
	4	1.33^{c-f}	1.00^{ef}	1.33^{c-f}	2.80^{v-z}	14.83^{c}	10.07^{fgh}
	0.25	1.00^{ef}	1.00^{ef}	1.22^{def}	4.10^{p-x}	4.30^{o-w}	8.67^{ghij}
	0.5	1.22^{def}	1.00^{ef}	2.00^{b}	2.73^{v-z}	4.40^{n-w}	5.43^{l-r}
0.1	1	1.00^{ef}	1.00^{ef}	1.00^{ef}	3.33^{t-z}	4.00^{q-y}	1.17^{z}
	2	1.11^{def}	1.11^{def}	1.11^{def}	3.77^{r-y}	5.40^{l-r}	8.40^{hij}
	4	1.11^{def}	1.11^{def}	1.11^{def}	5.27^{m-s}	7.40^{jk}	4.90^{m-t}
	0.25	0.89^{fg}	1.00^{ef}	1.11^{def}	2.77^{v-z}	5.10^{m-t}	9.60^{f-i}
	0.5	1.33^{c-f}	1.00^{ef}	1.00^{ef}	3.80^{r-y}	5.93^{k-p}	4.53^{m-v}
0.25	1	1.22^{def}	1.00^{ef}	1.55^{b-e}	4.27^{o-w}	10.93^{ef}	6.40^{klm}
	2	1.00^{ef}	1.11^{def}	1.22^{def}	4.10^{p-x}	7.33^{jk}	6.20^{k-n}
	4	1.00^{ef}	1.33^{c-f}	1.22^{def}	5.13^{m-t}	13.33^{cd}	11.27^{ef}
	0.25	1.00^{ef}	1.33^{c-f}	1.00^{ef}	4.13^{o-x}	19.33^{b}	3.00^{u-z}
	0.5	1.00^{ef}	1.89^{bc}	1.67^{bcd}	7.33^{jk}	19.33^{b}	5.87^{k-q}
0.5	1	1.11^{def}	4.99^{a}	1.22^{def}	3.50^{s-z}	26.83^{a}	7.73^{ijk}
	2	1.00^{ef}	1.00^{ef}	1.11^{def}	4.23^{o-w}	4.73^{m-u}	5.10^{m-t}
	4	1.44^{b-f}	1.33^{c-f}	1.55^{b-f}	2.20^{yz}	10.67^{ef}	9.40^{f-i}

In columns of each trait, means with the same letters are not significantly different among treatments at the levels of 5%.

طول شاخساره

نتایج مقایسه میانگین نشان داد که بیشترین طول شاخساره‌ها در محیط کشت MS در ترکیب با ۱ میلی‌گرم در لیتر BA و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر IBA ثبت شد ولی در محیط کشت WPM، با غلظت ۰/۲۵ میلی‌گرم در لیتر BA و در محیط کشت B5 با ۱ میلی‌گرم در لیتر BA ، کمترین طول شاخساره حاصل شد (جدول ۳) که با نتایج Balapour et al. (2019) همسو بود. Mohamadzadeh Moghadam and Hamidi (2017) نیز بیشترین طول شاخساره‌ها در محیط کشت MS در

ترکیب با ۱ میلی‌گرم در لیتر BA و ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر IBA گزارش کردند. با توجه به این‌که BA باعث افزایش تقسیم سلولی می‌شود می‌توان گفت نسبت بالای BA به IBA در طویل شدن گیاهچه‌ها مؤثرتر از نسبت‌های کمتر این دو نوع تنظیم‌کننده رشد است. محیط کشت می‌تواند در رشد درون شیشه‌ای گیاهان بسیار مؤثر باشد (Pilar and Marin, 2005). نوع و مقدار بعضی از عناصر غذایی پرمصرف در محیط‌های کشت WPM، MS و B5 متفاوت است. عناصر کم مصرفی همچون ید و کبالت و نیز نوع ویتامین‌ها نیز بین این محیط‌ها متفاوت است. این تفاوت‌ها در زرد شدن گیاهچه‌ها مؤثر بوده است. به نظر می‌رسد پایه مورد مطالعه مورد مطالعه نیاز غذایی خاصی دارد، به‌طوری‌که به کمبود عناصر غذایی و نوع و مقدار آن‌ها حساس است. Nazarymoghaddam and Yadollahi (2012) نیز برای به‌دست آوردن بیشترین طول ساقه از محیط MS استفاده کردند. Tatarivernosafadarani et al. (2012) ازدیاد پایه رویشی درختان هسته دار GF۶۷۷ با استفاده از روش درون شیشه‌ای در محیط‌های کشت MS تغییریافته، WPM و Knop مورد ارزیابی قرار دادند. نتایج حاصل از نوع محیط کشت نشان داد که پایه رویشی GF۶۷۷ بیشترین تعداد و طول گیاهچه را در محیط کشت MS تغییریافته تولید کردند.

قطر شاخساره

نتایج مقایسه میانگین‌ها نشان‌داد که شاخساره‌ها در محیط کشت MS همراه با ۱ میلی‌گرم در لیتر BA و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر IBA بیشترین قطر را داشتند و شاخساره‌ها در محیط WPM با ترکیب هورمونی، BA با غلظت ۱ میلی‌گرم در لیتر و IBA با غلظت ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر کمترین قطر شاخساره را به خود اختصاص دادند (جدول ۴). نتایج نشان داد، نوع محیط کشت و ترکیبات هورمونی، بر افزایش قطر شاخساره‌های تولیدشده مؤثر می‌باشند. به نظر می‌رسد با تغییر غلظت عناصر در محیط‌های کشت، نتایج بهتری حاصل می‌شود. محیط کشت WPM دارای سطح بالاتری از کلرید است که به علت مهار جذب مواد غذایی، انتقال و استفاده از مواد مغذی منجر به رشد ضعیف گیاه می‌شود (Karimi et al., 2005). علاوه بر این، کمبود منیزیم مشاهده‌شده در شاخساره‌ها به علت مقدارکلرید بالاتر و در اثر پتانسیل اسمزی پایین محیط کشت WPM است. تحقیقاتی که به منظور تعیین پروتکل تکثیر درون شیشه‌ای دو پایه همگروه گلابی روی صفات رویشی ساقه چه‌های درون شیشه‌ای انجام شد که نتیجه آن برتری محیط کشت QL تغییریافته با بیشترین پرآوری و کیفیت شاخه به‌عنوان محیط کشت پایه بوده است (Khodaei Chegini et al., 2011).

تعداد برگ در شاخساره

نتایج مقایسه میانگین‌ها نشان داد که بیشترین تعداد برگ در محیط کشت MS با ۱ میلی‌گرم در لیتر BA و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر IBA و کمترین تعداد برگ در محیط کشت WPM با ۱ میلی‌گرم در لیتر BA و ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر IBA به‌دست‌آمد (جدول۴). Channuntapipat et al. (2003) در ریزازدیادی دورگه هلو- بادام بیشترین تعداد برگ را در محیط کشت MS گزارش کردند. استفاده بیش از یک میلی‌گرم در لیتر BA باعث افزایش تعداد برگ می‌شود اما شیشه‌ای شدن را به‌دنبال دارد (Kamali et al., 2006). Iskalan (2008) et al. اثر غلظت‌های مختلف BA به تنهایی و ترکیبی از IAA + BA برای تکثیر شاخساره بادام رقم ناون پاریل مورد بررسی قرار دادند. بیشترین تعداد شاخساره از محیط کشت MS با ۲ میلی‌گرم در لیتر BA به‌دست‌آمد ولی بیشترین تعداد گره و تعداد برگ از محیط کشت MS با ۱ میلی‌گرم در لیتر BA حاصل شد که همسو با نتایج این تحقیق می‌باشد.

درصد ریشه‌زایی

جدول تجزیه واریانس (جدول ۵) نشان می‌دهد که اثر فاکتورهای اصلی، تنظیم‌کننده‌های رشد، اکسین (IBA) و سیتوکنین (BA) و اثر متقابل بین آن‌ها روی همه صفات ریشه‌زایی در سطح یک درصد معنی‌داری شد.

Table 4. Mean comparison of the effect of culture medium and growth regulators on shoot diameter and leaf number in GF677

Growth Regulators (mg/L)		Shoot diameter (mm)			Leaf number per shoot		
		Type of culture medium			Type of culture medium		
Auxin (IBA)	Cytokinin(BA)	B5	MS	WPM	B5	MS	WPM
	0.25	1.56^{n-w}	3.10^{cd}	1.30^{t-x}	4.72^{v-z}	9.66^{ijk}	3.66^{z}
	0.5	1.40^{r-x}	1.77^{k-v}	2.23^{g-m}	4.66^{w-z}	5.33^{t-z}	11.66^{g}
0	1	1.03^{wx}	2.80^{c-g}	1.67^{k-w}	2.44^{z}	6.00^{r-w}	8.11^{l-o}
	2	1.27^{u-x}	3.43^{c}	2.03^{i-r}	5.00^{v-z}	15.11^{cd}	13.89^{de}
	4	1.40^{r-x}	3.30^{cd}	2.10^{h-p}	5.11^{u-z}	15.88^{c}	12.11^{fg}
	0.25	1.17^{g-o}	2.13^{h-o}	1.87^{j-v}	7.33^{n-r}	3.10^{z}	10.89^{ghi}
	0.5	1.33^{t-x}	2.30^{f-k}	1.53^{o-x}	4.89^{v-z}	4.22^{yz}	7.44^{n-r}
0.1	1	1.70^{k-v}	2.20^{g-n}	0.90^{x}	5.77^{s-x}	3.67^{z}	2.53^{z}
	2	1.63^{l-w}	2.43^{e-j}	1.77^{k-v}	6.55^{p-u}	7.66^{m-q}	10.11^{hij}
	4	1.90^{j-u}	2.70^{d-h}	1.27^{u-x}	8.22^{k-n}	7.66^{m-q}	7.66^{m-q}
	0.25	1.60^{m-w}	2.27^{f-l}	2.00^{j-s}	5.55^{t-y}	5.78^{s-x}	11.00^{ghi}
	0.5	1.73^{k-v}	2.43^{e-j}	1.23^{vwx}	6.22^{q-v}	7.22^{n-s}	7.22^{n-s}
0.25	1	1.56^{n-w}	2.97^{cde}	1.70^{k-v}	6.55^{p-u}	11.33gh	8.33^{k-n}
	2	1.93^{j-t}	2.67^{d-i}	1.43^{q-x}	6.22^{q-v}	8.33^{k-n}	9.22^{jkl}
	4	2.03^{i-r}	3.30^{cd}	2.00^{J-s}	7.89^{l-p}	13.55^{ef}	14.55^{cde}
	0.25	1.70^{k-v}	4.17^{b}	1.37^{s-x}	6.66^{o-t}	20.00^{b}	4.78^{v-z}
	0.5	2.10^{h-p}	4.10^{b}	1.43^{q-x}	9.89^{hij}	21.33^{b}	7.10^{l-p}
0.5	1	1.47^{p-x}	4.83^{a}	1.83^{j-v}	6.11^{r-w}	27.55^{a}	9.22^{jkl}
	2	1.73^{k-v}	2.23^{g-m}	1.47^{p-x}	7.22^{n-s}	5.44^{t-z}	8.11^{l-o}
	4	1.43^{q-x}	2.90^{cdef}	2.07^{h-q}	4.33^{xyz}	9.11^{j-m}	12.00^{g}

In columns of each trait, means with the same letters are not significantly different among treatments at the levels of 5%.

Table 5. Analysis of variance the effect of growth regulator on diffrent traits of rooting in GF677 rootstock

S.O.V.	df	Mean squares			
		Root number	Root length	Root diameter	Rooting percentage
(IBA) A	3	0.76^{**}	1.88^{**}	0.62^{**}	325.18^{**}
(BA) B	3	1.41^{**}	0.86^{**}	1.02^{**}	325.18^{**}
B × A	9	0.62^{**}	0.68^{**}	2.14^{**}	184.02^{**}
Error	32	0.006	0.001	0.092	0.063
C.V. (%)		19.97	9.86	22.54	4.04

** and *: Significant at 1% and 5% level respectively ns: non significant.

نتایج مقایسه میانگین‌ها نشان‌داد، در محیط کشت با ترکیب هورمونی ۱ میلی‌گرم در لیتر IBA و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BA بیشترین درصد ریشه‌زایی مشاهده شد (جدول ۶). تشکیل ریشه‌های نابجا در شاخساره‌هائی که از طریق ریزازدیادی تکثیر شده‌اند یک مرحله اجباری در باززایی و تعیین‌کننده اثربخشی سیستم‌های تولید گیاه در شرایط *In vitro* است. تیمار اکسین یکی از عوامل مهمی است که توجه پژوهشگران را برای ریشه‌زایی شاخسارها به خود جلب نموده است (Lambardi and Rugini, 2003) و مدت مدیدی است که نقش آن در ریشه‌زایی شناخته شده است و نقش مثبت اکسین‌ها بر القاء و توسعه پریموردیای ریشه به خوبی مستند است (Frett et al., 2001). در میان اکسین‌های مختلف، استفاده IBA برای تحریک ریشه‌زایی ریزقلمه‌ها به علت سمیت ضعیف و ثبات زیاد بسیارمعمول است (Hartmann et al., 2007). سیتوکینین با غلظت خیلی کم به تشکیل ریشه کمک کرده ولیکن در غلظت زیاد از تشکیل آن جلوگیری می‌کند (Campbell et al., 2008).

Table 6. Mean comparison the effect of growth regulators on rooting characteristics in GF677 rootstock

Growth regulators (mg/L)		Rooting characteristics			
Cytokinin (BA)	Auxin (IBA)	Rooting percentage	Root number	Root length (cm)	Root diameter (mm)
0	0.25	0^{c}	0^{e}	0^{f}	0^{d}
	0.5	0^{c}	0^{e}	0^{f}	0^{d}
	1	11^{b}	0.57^{d}	1.33^{b}	0.44^{bc}
	2	0^{c}	0^{e}	0^{f}	0^{d}
0.1	0.25	0^{c}	0^{e}	0^{f}	0^{d}
	0.5	0^{c}	0^{e}	0^{f}	0^{d}
	1	11^{b}	0.57^{d}	1.50^{d}	0.41^{c}
	2	0^{c}	0^{e}	0^{f}	0^{d}
0.2	0.25	0^{c}	0^{e}	0^{f}	0^{d}
	0.5	11^{b}	0.83^{c}	0.34^{e}	0.54^{b}
	1	0^{c}	0^{e}	0^{f}	0^{d}
	2	11^{b}	0.57^{d}	0.70^{c}	0.57^{b}
0.5	0.25	11^{b}	0.57^{d}	0.50^{d}	0.54^{b}
	0.5	0^{c}	0^{e}	0^{f}	0^{d}
	1	33^{a}	1.62^{a}	1.93^{a}	0.78^{a}
	2	11^{b}	1.27^{b}	0.55^{d}	0.49^{bc}

In each column, means with the same letters are not significantly different among treatments at the levels of 5%.

تعداد ریشه

نتایج مقایسه میانگین‌ها نشان داد که بیشترین تعداد ریشه در ترکیب هورمونی ۱ میلی‌گرم در لیتر IBA و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BA به‌دست‌آمد (شکل ۱b) ولی در بیشتر تیمارها ریشه‌زایی رخ نداد (جدول ۶). اکسین‌ها باعث رشد طولی سلول، تشکیل کالوس و تشکیل ریشه‌های نابجا می‌شوند و اثر تنظیم‌کننده‌های رشد بر تعداد و طول ریشه مؤثر است. اکسین خارجی تنها در مراحل اولیه برای ظهور ریشه نقش تحریک‌کننده دارد (Hartmann et al., 2007; Dobranszki and Teixeira da Silva 2010).

طول ریشه گیاهچه

نتایج مقایسه میانگین‌ها نشان داد، در محیط کشت MS همراه با ۱ میلی‌گرم در لیتر IBA و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BA بیشترین طول ریشه حاصل شد (جدول ۶). Ali et al. (2009) ناتوانی جهت القاء ریشه‌های نابجا اغلب یک عامل محدودکننده در قلمه‌های معمولی و کشت بافت است. ریشه‌های تولیدشده در IBA بلندتر با شاخساره‌های با کیفیت بهتر درحالی‌که در NAA پاسخ ضعیف بود و تولید برگ‌های نکروزه و ریزش برگ صورت می‌گرفت. Nazarymoghaddam and Yadollahi (2012) گزارش کردند که اثر غلظت تنظیم‌کننده رشد IBA بر ریشه‌زایی پایه‌GF۶۷۷ متفاوت است به نحوی که بیشترین تعداد ریشه در غلظت ۲ میلی‌گرم در لیتر IBA مشاهده شد. ولی بیشترین طول ریشه در محیط کشت حاوی ۱ میلی‌گرم در لیتر IBA حاصل شد.

قطر ریشه نمونه‌های تولیدشده

نتایج مقایسه میانگین‌ها نشان داد که بیشترین قطر ریشه در محیط کشت با ترکیب هورمونی ۱ میلی‌گرم در لیتر IBA و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BA ثبت شد (جدول ۶). پژوهش‌ها نشانگر این است که ریشه‌دهی پایه GF۶۷۷ در شرایط درون شیشه‌ای به نوع محیط کشت بستگی دارد (Kamali et al., 2006). Sharifmoghaddam et al. (2011) گزارش کردند، بهترین محیط برای القای ریشه‌زایی پایه‌های GF۶۷۷ محیط MS همراه با ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر IBA می‌باشد.

انتقال گیاهچه‌های ریشه‌دارشده به محیط سازگاری

پس از انتقال گیاهچه‌های ریشه‌دارشده به گلدان با ترکیب پرلیت، ماسه و خاک به نسبت ۱:۲:۱، ۹۰ درصد گیاهچه‌ها زنده ماندند و به‌صورت طبیعی رشد نمودند. یکی از مهم‌ترین مشکلات میزان زنده‌ماندن گیاهچه در

هنگام انتقال به شرایط برون‌شیشه، در مدت سازگار کردن گیاه به آب و هوای جدید در گلخانه و یا مزرعه می‌باشد (Haghgou Tabalvandani et al., 2014). این مشکل به‌دلیل ظرفیت فتوسنتز پایین در شرایط آزمایشگاهی ناشی از حضور قند در محیط، نور کم و میزان CO2 ناکافی و رطوبت نسبی بالا در درون‌شیشه می‌باشد. این شرایط درنهایت بر عملکرد فتوسنتز گیاه مؤثر است (Hazarika, 2003). جهت جلوگیری از بین رفتن ریز قلمه‌ها، هنگام انتقال از شرایط کشت درون شیشه‌ای باید آن‌ها را به تدریج با شرایط محیط سازگار کرد و نباید تغییر ناگهانی در رطوبت نسبی، درجه حرارت و یا تابش نور رخ دهد (Haghgou Tabalvandani et al., 2014).

نتیجه‌گیری

به منظور ریزازدیادی در پایه GF۶۷۷، محیط کشت‌های MS، B5 و WPM با غلظت‌های تنظیم‌کننده‌های رشد مختلف مورد مطالعه قرارگرفتند. نتایج نشان داد که گیاهچه‌های تولیدشده تحت تأثیر محیط و تنظیم‌کننده‌های رشد قرار می‌گیرند. محیط کشت MS جامد، با تولید، بیشترین تعداد شاخساره، بلندترین طول ساقه، بیشترین قطر ساقه، تعداد گره و فواصل میان گره، تعداد برگ و سطح برگ و درصد ریزنمونه‌های باززایی‌شده، مناسب‌ترین محیط‌کشت در بین سایر محیط‌های کشت مورد استفاده می‌باشد. ترکیبات تنظیم‌کننده‌های رشد اثرات معنی‌داری بر روی صفات مختلف می گذارند و این تغییرات به صفت، نوع و غلظت تنظیم‌کننده‌های رشد بستگی دارد. هر دو تنظیم‌کننده‌های رشد اکسین و سیتوکنین در اندام‌زایی مهم هستند و به‌عنوان تسهیل‌کننده این فرایند عمل می‌کنند. مطابق نتایج، بهترین ترکیب تنظیم‌کننده‌های رشد به منظور باززایی شاخساره GF۶۷۷، یک میلی‌گرم در لیتر BA و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر IBA بود. در محیط ریشه‌زایی نیز بهترین نتیجه در غلظت ۱ میلی‌گرم در لیتر IBA و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BA به‌دست‌آمد. با این حال، نتایج این تحقیق با نتایج تحقیقات قبلی کمی متفاوت است و این اختلاف ممکن است به تفاوت وضعیت فیزیولوژیکی ریزنمونه‌ها نسبت داده شود.

سپاس‌گزاری

مؤلفان بر خود لازم می‌دانند از آقای مهندس چشمه‌سفید مسئول محترم آزمایشگاه کشت بافت مرکز تحقیقات کشاورزی کرمانشاه که در اجرای این تحقیق همکاری صمیمانه‌ای داشتند قدردانی و سپاس‌گزاری نمایند.

References

Akbarpour, E., Imani, A. and Ferdowskhah Yeganeh, S. (2017). Physiological and morphological responses of almond cultivars under in vitro drought stress. *Journal of Nuts*, 8(1), 61-72.

Ali, A., Ahamad T., Abbasi, N. A., Hafez, I. and Ahmad, H. I. (2009). Effect of different concentrations of auxin on in vitro rooting of olive cultivar moraiolo. *Pakistan Journal Botany*, 41(3), 1223-1231.

Andreu, P. and Marin, J. A. (2005). *In vitro* culture establishment and multiplication of the prunus rootstock Adesoto 101 (*P. insititia* L.) as affected by the type of propagation of the donor plant and by the culture medium composition. *Scientia Horticulturae*, 106(2), 258-267.

Antonopoulou, C., Dimassi, K., Therios, I., Chatzissavvidis, C. and Tsirakoglou, V. (2005). Inhibitory effects of riboflavin (Vitamin B2) on the in vitro rooting and nutrient concentration of explants of peach rootstock GF-677. *Scientia Horticulturae*, 106(2), 268-272.

Arab, M. M., Yadollahi, A., Shojaeiyan, A., Shokri, S. and Ghojah, S. M. (2014). Effects of nutrient media, different cytokinin types and their concentrations on in vitro multiplication of G × N15 (hybrid of almond × peach) vegetative rootstock. *Journal of Genetic Engineering And Biotechnology*, 12(2), 81-87.

Bagheri, S., Davoodi, D., Amiri, M. E., Bayanati, M. and Entesari, M. (2017). Effect of different culture media on the micropropagation of GF677. *Journal of Horticulture Science (Agricultural Sciences and Technology)*, 30(4), 616-623.

Bakhtiari, F., Mozafari, J. and Abdollahi, H. (2017). A study on growth, propagation and rooting of Iranian native pears for developing *in vitro* conservation system. *Journal of Agricultural Biotechnology*, 8(4), 17-34.

Balapour, Z., Hosseini Moghaddam, H., Zarei, M. and Mollashahi, M. (2019). Micro propagation of penta rootstock (*Prunus domestica*) inthe two culture media (MS and B5). *Plant Productions*, 42(4), 441-454.[In Farsi]

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 conditions. *Journal of Plant Research (Iranian Journal of Biology)*, 29(1), 1-14. [In Farsi]

Campbell, N. A., Reece, J. B., Urry, L. A., Cain M. L. and Robert, B. (2008). *Biology* (8th ed.). SanFrancisco: Pearson, Benjamin Cummings.

Channuntapipat, C., Sedgley, M. and Collins, G. (2003). Micropropagation of almond cultivars Nonpariel and NePlus Ultra and the hybrid rootstocks Titan × Nemaguard. *Scientia Horticulturae*, 98(4), 473-484.

Choudhary, R., Chaudhury, R., Malik, S. K. and Sharma K. C. (2015). An efficient regeneration and rapid micropropagation protocol for Almond using dormant axillary buds as explants. *Indian Journal of Experimental Biology*, 53(7), 462-467.

Dobranszki, J. and Teixeira da Silva, J. A. (2010). Micropropagation of apple a review. *Biotechnology Advances*, 28(4), 462-488.

Durkovic, J. (2006). Rapid micropropagation of mature wild cherry. *Biologia Plantarum*, 50(3), 733-736.

Eugene, K. K., Justin, Y. and Flori, A. (2007). Evidence for an interaction effect during *in vitro* rooting of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) somatic embryo-derived plantlets. *In Vitro Cellular Developmental Biology Plant*, 43(7), 456-466.

Frett, N. A. G., Gett, A. G., Goulart, L. W. V., Pasquali, R. R., Termignoni, R. R. and Ferreira, A. G. (2001). Distinct effect of auxin and light on adventitious root development in Eucalyptus saligna and Eucalyptus globules. *Tree Physiology*, 21(7), 457-464.

Gerdakaneh, M., Mozafari, A. A., Sioseh-Mardah, A. and Sarabi B. (2011). Effects of different amino acids on somatic embryogenesis of strawberry (*Fragaria ananassa* Duch.) *Acta Physiologiae Plantarum*, 33(5), 1847-1852.

Haghgou Tabalvandani, M., Yadollahi, A., Atashkar, D., Kalatejari, S. and Eftekhari, M. (2014). Optimized root production during micropropagation of new Iranian apple hybrid rootstock (AZ X M9): Effects of Fe-EDDHA and thiamine. *International Journal of Advanced Biological and Biomedical Research*, 2(10), 2659-2662.

Hartmann, H.T., Kester, D.E., Davies, F.T. and Geneve, R. L. (2007). *Plant propagation: Principle and practices*. New Delhi: Prentice-Hall.

Hasan, S. Z. U., Ahmad, T., Hafizi, I. A. and Hussain, A. (2010). Direct plant regeneration from leaves of prunus rootstock GF677 (*Prunus amygdalus* × *P. persica*). *Pakistan Journal Botany*, 42(6), 3817-3830.

Hazarika, B. N. (2003). Acclimatization of tissue-cultured plants. *Current Science*, 85(12), 1704-1712.

Iskalan, C., Adıyaman Akba, F., Namlı, S., Tilkat, E. and Basaran, D. (2008). In vitro micropropagation of almond (*Amygdalus communis* L. cv. Nonpareil). *African Journal of Biotechnology*, 7(12), 1875-1880.

Kamali, K., Majidi, E. and Zarghami, R. (2006). Micropropagation of GF677 rootstocks (*Prunus amygdalus* × *P. persica*). *Plant Genetics and Breeding*, 56(1), 175-177.

Karimi, G., Ghorbanli, M., Heidari, H., Khavari-Nejad, R. A. and Assareh, M. H. (2005). The effects of NaCl on growth, water relations, osmolytes and ion content in *Kochia prostrata*. *Biologia Plantarum*, 49(2), 301-304.

Khodaei Chegini, F., Abdollahi, H., Ershadi, A. and Aasni ashari, M. (2011). Determination of Micro-propagation Protocol for OH × F333 and OH × F69 Pear Clonal Rootstocks. *Seed and Plant Production Journal*, 27(3), 312-297.

Kieber, J. J. (2002). Tribute to folke skoog: Recent advances in our understanding of cytokinin biology. *Journalof Plant Growth Regulation*, 21(1), 1-2.

Kose, S. and Canli, F. A. (2015). In vitro propagation and rooting of 'Garnem' (*P. persica* × *P. dulcis*) rootstock. *Plant Molecular Biology and Biotechnology*, 5(1), 25-30

Lambardi, M. and Rugini, E. (2003). Micropropagation of olive *(Olea europaea L.)*. In: S. M. Jain and K. Ishii (Eds.), *Micropropagation of woody trees and fruits* (PP. 621-646). Dordrecht: Kluwer Academic Publishers.

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]

Nazarymoghaddam, R. and Yadollahi, A. (2012). Micropropagation of GF 677 rootstock. *Journal of Agricultural Science*, 4(5), 131-138.

Pilar, A. and Marin, J.A. (2005). *In vitro* culture establishment and multiplication of the prunus rootstock 'Adesoto 101' (*P. insititia* L.) as affected by the type of propagation of the donor plant and by the culture medium composition. *Scientia Horticulturae*, 106(2), 258-267.

Ruzic, D. J. V. and Vujovic, T. I. (2008). The effect of cytokinin types and their concentration on *in vitro*, multiplication of sweet cherry cv. *Horticultural Science*, 35(1), 12-21.

Ruzic, D., Saric, M., Cerovic, R. and Culafic, L. (2003). Contents of macroelements and growth of sweet cherry rootstock *in vitro*. *Biology of Plants*, 47(3), 463-465.

Sharifmoghaddam, N., Safarnejad, A. and Tabatabaei, S. M. (2011). The effect of plant growth regulators on callus induction and regeneration of GF677 rootstock. *International Journal of Science and Nature*, 2(4), 805-808.

Shehata, W. F. and Al-Khayri, J. M. (2013). Conservation of endangered hassawi peach (*Prunus persica* L.) through micropropagation. *Journal of Biological Sciences*, 13(2), 75-81.

Tatarivernosafadarani, M., Mousavi, S. A. and Buzarim, N. (2012). Micropropagation of some clonal root stocks of stone fruits. *Seed and Plant Improvement Journal*, 28(1), 53-66. [In Farsi]

© 2020 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/)