Plant Prod., 42(4) (2020) 441-454
DOI: 10.22055/ppd.2019.24937.1570

ISSN (P): 2588-543X
ISSN (E): 2588-5979

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

Ziba Balapour[1], Hossein Hosseini Moghaddam[2]*, Mehdi Zarei[3] and Mehdi Mollashahi[4]

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.

© 2019 The Author(s). Published by Shahid Chamran University of Ahvaz. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

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

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

زیبا بالاپور[۱]، حسین حسینی مقدم[۲]*، مهدی زارعی[۳] و مهدی ملاشاهی[۴]

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

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۰۳/۲۴ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۰۸/۰۸

چکیده

پژوهشی به منظور بررسی ریزازدیادی پایه پنتا (*Prunus domestica*) در دو محیط کشت MS و B5 انجام گرفت. این آزمایش به‌صورت 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 ریشه زایی و نیز غلظت‌های مختلف ۶-بنزیل آمینو پورین (۰، ۰/۴، ۰/۸ و ۱/۲ میلی‌گرم در لیتر) برای شاخه زایی 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، ریزازدیادی، سازگاری

مقدمه

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. به‌طورکلی پایه‌های درختان میوه به دو روش جنسی و غیرجنسی تکثیر می‌شوند، ولی با توجه به این‌که در تکثیر جنسی تفرق صفات حاصل‌شده و 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 براین باغ‌های احداث‌شده با پایه‌های رویشی در مقایسه با پایه‌های بذری، محاسنی همچون یکنواختی

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 گلسرخیان (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 به‌عنوان 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 میلی‌گرم در لیتر۶-بنزیل آمینو پیورین (Benzyl amino piurine) و بیش‌ترین ارتفاع شاخساره در محیط دارای ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP حاصل شد. Ambrozic *et al.* (1992) بیان کردند، بیش‌ترین پرآوری آلوی Biristica در محیط کشت موراشیگ و اسکوگ (Murashige and Skoog) با ۰/۲۵ میلی‌گرم در لیتر BAP و ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر ایندول بوتیریک اسید (IBA) حاصل شد، همچنین افزودن ۰/۱ و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر جیبرلین (GA3) افزایشی در پرآوری و طول شاخساره ایجاد نکرد. Daneshvar Hossini *et al.* (2010) در مطالعات خود روی پایه رویشی گزیلا۶ گزارش نمودند که بیش‌ترین میزان پرآوری در محیط کشت MS حاوی ۱ میلی‌گرم در لیتر BAP و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر IBA مشاهده شده است. در بیشتر تحقیقات روی GF677 برای تکثیر جوانه از هورمون‌های BAP با غلظت بین ۰/۱ تا ۳ میلی‌گرم در لیتر به‌عنوان مهم‌ترین 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 هسته‌دارها تأثیر دارد، به‌طوری‌که پس از انجام ۹ بازکشت در محیط کشت (Quoirin and QLLepoivre, 1977) در مقایسه با محیط کشت MS و WPM میزان پرآوری به‌طور معنی‌داری کاهش یافت. در کشت درون‌شیشه‌ای، ترکیب محیط کشت روی رشد گیاهچه مؤثر است و این تأثیر در اثر ترکیب نمک های 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 درون‌شیشه‌ای 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 درون‌شیشه‌ای گزارش

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 وصنعت 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 به‌ترتیب با الکل ۹۶ درصد به مدت ۴-۳ ثانیه، کلرید جیوه ۰۰۵/۰ درصد (W/V) به مدت ۳ تا ۴ دقیقه، ضدعفونی شدند. درنهایت ۳ نوبت با آب مقطر استریل شستشو و در دو محیط کشت ((Murashige and Skoog, 1969 (MS و (Gamborg et al., 1968 (B5) 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 مدت سه‌ماه 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 = ۵/۸ کشت شدند و در شرایط محیطی یادشده قرار داده شدند.

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

بدین منظور، تأثیردو 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 خارج‌شده 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

پوشش‌های پلاستیکی سوراخ کوچکی برای تبادل هوا ایجاد شد و با گذشت زمان برای کاهش تدریجی رطوبت و نبودن تنش در گیاهچه‌ها تعداد این سوراخ‌ها اضافه شد. در این مدت، برای جلوگیری از فعالیت قارچ‌ها نیز از هفته دوم به بعد روزانه پوشش‌های پلاستیکی به مدت ۲۰ تا ۳۰ دقیقه و در هفته‌های بعد از یک تا چند ساعت برداشته شدند. آبیاری گیاهچه‌ها در ابتدا با آب‌مقطر 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 آن‌که گیاهچه‌ها سازگار شدند، به زمین اصلی منتقل شدند.

روش‌های آماری مورداستفاده

این آزمایش با دو فاکتور انجام گرفت فاکتور اول شامل محیط کشت در دو سطح و فاکتور دوم ترکیب غلظت‌های مختلف دو نوع هورمون (جدول ۱) در ۱۳ سطح انجام گرفت. برای تجزیه و تحلیل داده‌ها از نرم‌افزارهای آماری SAS 9.1 و از روش حداقل اختلاف معنی‌دار (LSD) برای مقایسه میانگین‌ها استفاده شد.

نتایج و بحث

نتایج نشان داد اثر نوع محیط کشت و تنظیم‌کننده‌های رشد بر روی تمام صفات مورد مطالعه در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار می باشد (جدول ۲).

بیشترین تعداد شاخه ۱۳/۶۵ عدد در محیط کشت MS حاوی ۰/۴ میلی‌گرم در لیتر BAP تشکیل شد و کمترین تعداد شاخه ۱/۵۳ عدد در محیط کشت MS که حاوی غلظت ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر IBA بود، به دست آمد (شکل ۱). Karamad *et al.* (2014) در بررسی اثر محیط کشت و تنظیم‌کننده‌های رشد بر ریزازدیادی پایه گزیلا ۶ گزارش کردند که بیشترین تعداد شاخه در محیط کشت WPM حاوی ۲ میلی‌گرم در لیتر BAP تشکیل شد. نتایج ایشان با نتایج این تحقیق که بیشترین تعداد شاخه در محیط کشت MS حاوی ۰/۴ میلی‌گرم در لیتر BAP تشکیل شد، مطابقت ندارد. در توجیه آن می‌توان به تفاوت در نوع محیط کشت اشاره کرد. درکشت درون‌شیشه‌ای، ترکیب محیط کشت روی رشد گیاهچه مؤثر است و این تأثیر بر اثر ترکیب نمک‌های موجود در محیط کشت ایجاد می‌شود (Reski and Abel, 1985). در بررسی تکثیر درون‌شیشه‌ای گزیلا ۵، محیط MS بهترین محیط شناخته شد. در این محیط جذب فسفر و نیتروژن توسط شاخساره‌ها بیشتر بوده به‌طوری‌که افزایش پرآوری و کیفیت بهتر را به دنبال داشت (Ruzic *et al.*, 2000).

جدول ۱- ترکیبات هورمونی محیط کشت‌ها در مرحله شاخه‌زایی و ریشه‌زایی

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

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

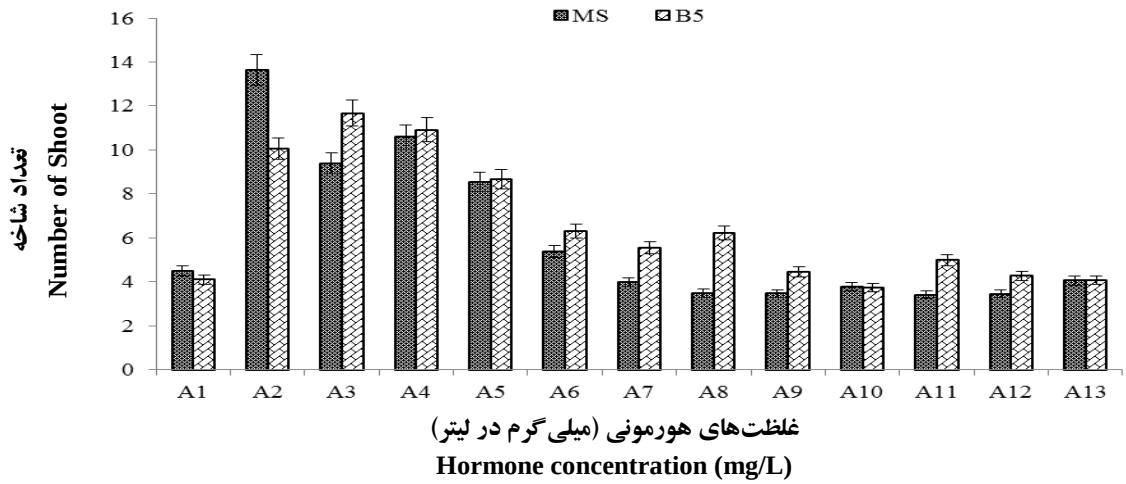
جدول ۲- نتایج تجزیه واریانس اثرات محیط کشت و هورمون بر روی صفات مورد مطالعه در پایه رویشی پنتا

Table 2. The results of variance analysis of culture media and hormone treatments on studied traits of Penta rootstock

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

ns و **: به‌ترتیب عدم وجود اختلاف معنی‌دار، اختلاف معنی‌دار 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

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 میلی‌گرم 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 تأثیری نداشت و بیشترین تعداد شاخه در این محیط کشت از غلظت ۰/۴ میلی‌گرم در لیتر BAP حاصل شد (شکل ۲، سمت راست)؛ درحالی‌که با افزایش غلظت BAP در محیط کشت B5 تعداد شاخساره به‌طور قابل‌توجهی افزایش یافت. بالاترین میانگین تعداد شاخساره در محیط کشت B5، در غلظت ۰/۸ و ۱/۲ میلی‌گرم در لیتر BAP به‌دست آمد (شکل ۱). همچنین با افزایش تعداد شاخساره، طول شاخساره در محیط کشت MS کاهش یافت.

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

محیط کشت MS با غلظت ۰/۸ میلی‌گرم در لیتر BAP ایجاد شد (شکل ۲، سمت چپ) و کمترین طول شاخه (۰/۷۴ سانتی‌متر) در محیط کشت B5 با ترکیبی از هورمون ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر IBA و ۱/۲ میلی‌گرم در لیتر BAP به دست آمد (شکل ۳). در تحقیق حاضر نمونه‌های موجود در محیط کشت B5 طول شاخه بلندتری نسبت به نمونه‌های کشت‌شده در محیط کشت MS داشتند (شکل ۳). بررسی ریزازدیادی زردآلوی رقم کانینو 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 میلی‌گرم در لیتر BAP در محیط کشت MS گزارش کردند. نتایج این تحقیق با نتایج به‌دست 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 میلی‌گرم 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 میلی‌گرم در لیتر IBA به همراه یک میلی‌گرم در لیتر BAP بهترین نتیجه را در برداشت (Mohamadzadeh Moghadam and Hamidi, 2017).

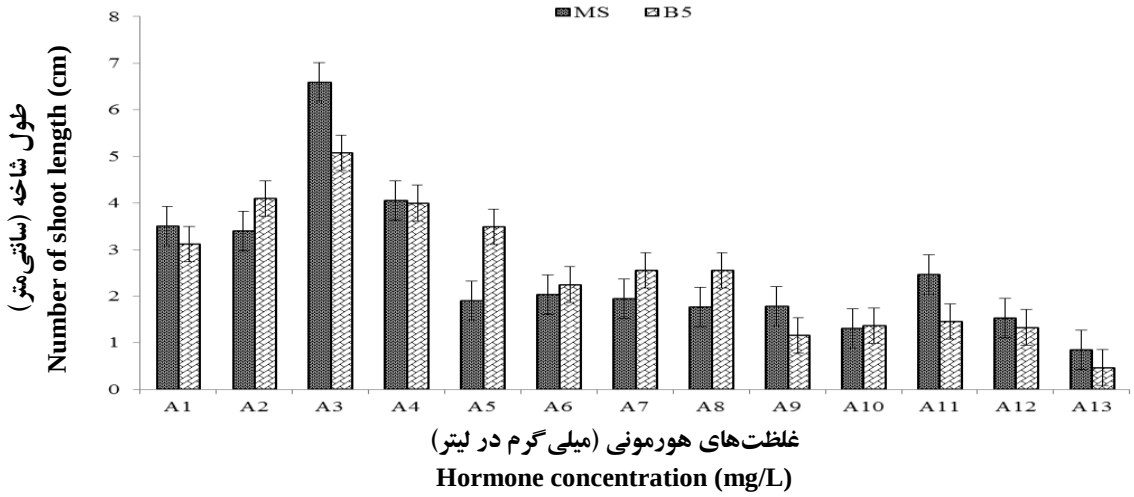
در این تحقیق بیشترین (۲۸/۴۵ عدد) و کمترین (۷/۵۵ عدد) تعداد برگ به‌ترتیب از ریزنمونه‌های تیمارشده با غلظت‌های ۰/۴ میلی‌گرم در لیتر BAP و ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر IBA در محیط کشت MS به دست آمد (شکل ۴). ترکیب هر مقدار از هورمون IBA و BAP تأثیر چندانی در کاهش یا افزایش تعداد برگ نداشت، به‌طوری‌که کمترین تعداد برگ در هر دو محیط کشت از غلظت ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر IBA حاصل شد. Bolandi *et al.* (2016) که تأثیر محیط کشت و هورمون بر تکثیر پایه رویشی GF677 را بررسی کردند بیشترین تعداد برگ از ریزنمونه‌های تیمارشده با غلظت یک و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP در محیط کشت WPM به‌دست 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 مستقرشده روی محیط کشت B5 دارای رشد کندی بودند؛ درحالی‌که نمونه‌های کشت‌شده در محیط کشت MS از وضعیت رشدی مناسبی برخوردار بودند. رنگ برگ‌ها در محیط کشت B5 به‌صورت سبز روشن و در محیط MS سبز تیره بود، به گونه‌ای که رنگ‌پریدگی و نهایتاً نکروزه شدن در محیط B5 در صورت تأخیر در واکشت نسبت به محیط MS زودتر ایجاد می‌شد. در بررسی ریزازدیادی پایه‌های مختلف درختان میوه، محیط کشت‌های مختلف به کار گرفته‌شده 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 میلی‌گرم در لیتر IBA به‌دست آمد (شکل ۵، سمت چپ). نمونه‌های کشت‌شده 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 به‌عنوان 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، به‌ویژه ریشه‌زایی گیاهان چوبی که اغلب به سختی صورت می‌گیرد (Erbenova *et al.*, 2001). توانایی اکسین درتوسعه و تشکیل ریشه شناخته شده است. بالاترین میزان ریشه‌زایی در محیط کشت B5 و MS در غلظت ۰/۹ میلی‌گرم در لیتر IBA به‌دست 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 میلی‌گرم در لیتر IBA گزارش کردند. نتایج این پژوهشگران با نتایج این تحقیق بسیار نزدیک می‌باشد.

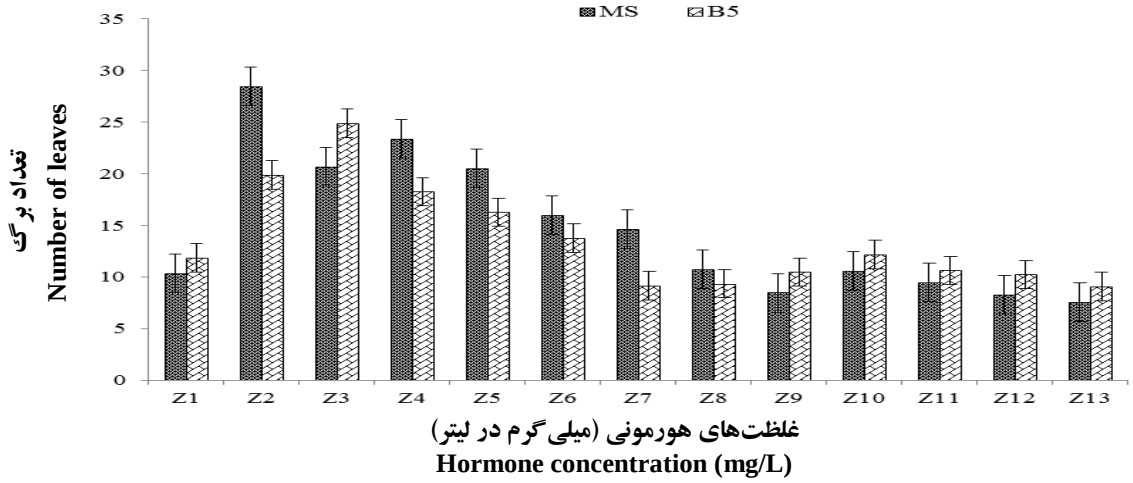
شکل ۲- سمت راست و چپ به‌ترتیب نشان‌دهنده بیشترین تعداد و طول شاخه؛ در محیط کشت حاوی ۰/۴ و ۰/۸ میلی‌گرم در لیتر BAP

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 پنتا

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

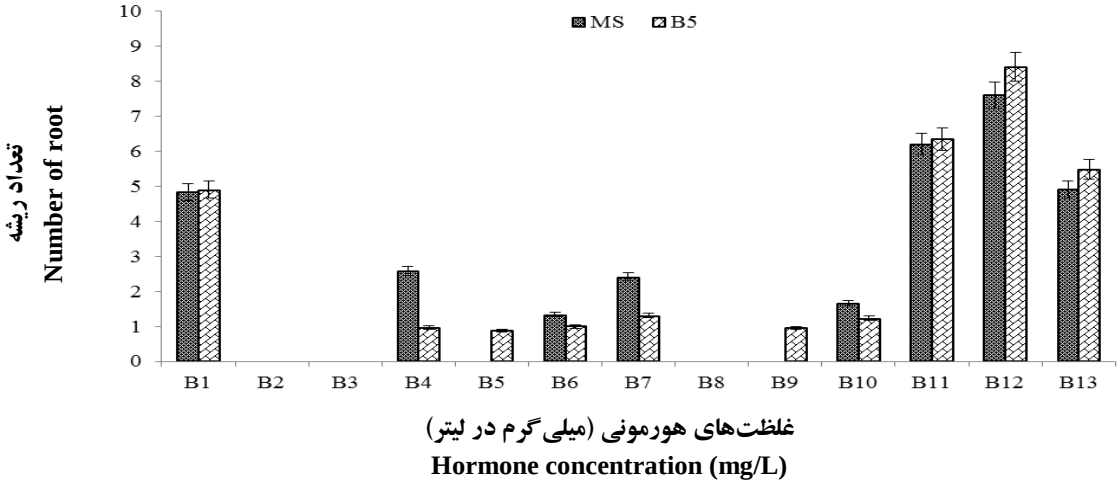


شکل ۴- اثرغلظت‌های مختلف هورمونی روی تعداد برگ تولیدشده

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 میلی‌گرم در لیتر IBA و بیشترین تعداد ریشه در محیط کشت B5 با هورمون ۰/۹ میلی‌گرم در لیتر IBA

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



شکل ۶- اثر غلظت‌های مختلف هورمونی روی ریشه‌زایی پایه پنتا

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

Tatari Vernosefadrani *et al.* (2012) جهت ازدیاد سه پایه رویشی درختان میوه هسته‌دار شامل Vpk1 (P.Cerasiferae)، سنت جولین A (P.insititia) و GF677 (هیبرید هلو -بادام) در شرایط درون‌شیشه‌ای از محیط‌های کشت MS تغییریافته، WPM و Knop استفاده کردند و به این نتیجه رسیدند که در محیط کشت MS حاوی یک میلی‌گرم در لیتر IBA کمترین تعداد ریشه و در محیط کشت MS حاوی یک میلی‌گرم در لیتر NAA بیش‌ترین تعداد ریشه را تولید کردند.

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

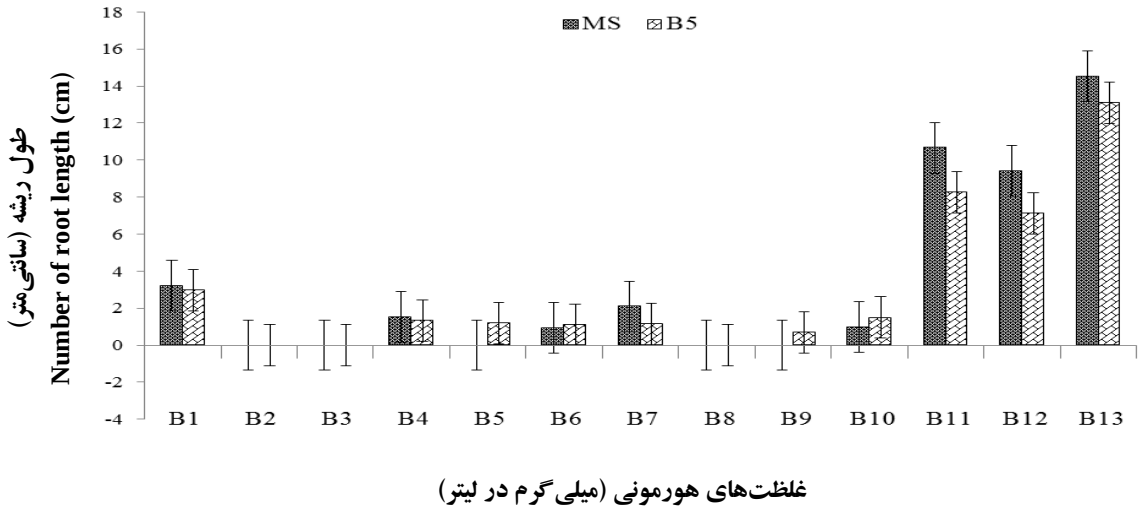
بر این اساس بیشترین طول ریشه ۱۴/۷۵ سانتی‌متر و ۱۳/۰۸ سانتی‌متر به ترتیب در محیط کشت‌های MS و B5 دارای ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر IBA به دست آمد (شکل ۷). Bolandi *et al.* (2016) در تحقیق تأثیر محیط کشت و هورمون بر تکثیر پایه رویشی GF677 بیان کردند بالاترین میانگین طول ریشه در محیط WPM از کاربرد NAA با غلظت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

Tatari Vernosefadrani *et al.* (2012) جهت ازدیاد سه پایه رویشی درختان میوه هسته‌دار شامل Vpk1، سنت جولین A و GF677 در شرایط درون‌شیشه‌ای از محیط‌های کشت MS تغییریافته، WPM و Knop استفاده کردند و به

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 ضدعفونی‌شده کوکویت و پرلیت سازگاری بالایی داشتند، ایشان بیان کردند گیاهچه‌هایی که در محیط کشت مایع با غلظت دو میلی‌گرم بر لیتر IBA ریشه‌دارشده بودند، ازنظر کیفیت و کمیت، ریشه‌زایی بهتری داشتند و نسبت به تنش‌های محیطی سازگارتر بودند. اگرچه در سازگاری ارقام بادام بدون اشاره به نسبت ترکیب پیت‌خزه 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 وسازگار کردن موفق آن‌ها به شرایط محیط بیرون بستگی دارد. گیاهچه‌های پنتا در مرحله انتقال، در گلدان‌های کوچک و سرپوش‌دار دارای بستر ضدعفونی‌شده پیت‌خزه و پرلیت به نسبت ۱:۱ سازگاری خوبی با شرایط محیط بیرون از خود نشان دادند (شکل ۸).



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

نتیجه‌گیری

بـه‌طـورکلی، در مقایسـه اثـر انـواع محـیط کشـت و تنظیم‌کننده‌های رشد بر ریزازدیادی پایه رویشی پنتـا و بـا در نظر گرفتن تمامی عوامـل مـی‌تـوان بیـان کـرد کـه بیشـترین شاخه‌زایی پایـه پنتـا در محـیط کشـت MSحاصـل شـد کـه مـی‌توانـد بـه دلیـل وجـود مقـادیر بـالای نیتـروژن (نیتـرات آمونیـوم) در ترکیـب آن باشـد. گیاهچـه‌هـا در محـیط MS شـاداب‌تـر، دارای رشـد طبیعـی‌تـر و بـیش‌تـری نسـبت بـه گیاهچـه‌هـای رشـد یافتـه در محـیط کشـت B5 بودنـد. به‌طورکلی می‌توان گفت ریزنمونه‌ها در نمـک MS از رشـد کیفی مطلـوب‌تـر و نرمـال‌تـری برخـوردار بودنـد. در مقابـل گیاهچـه‌هـایی کـه در نمـک B5 رشـدیافتـه بودنـد، حالـت بدشکل و شیشه‌ای شـده داشـته و سـاقه‌هـا آبـدار، بـرگ‌هـا باریـک و لولـه‌ای و دارای رشـد غیرطبیعـی بودنـد. محـیط کشت B5 از نظر ترکیبات بـا محـیط کشـت MS در مقـادیر مواد مـورد اسـتفاده تفـاوت دارد، فاقـد گلیسـین اسـت ولـی دارای تیـامین بیشـتری از محـیط کشـت MS اسـت. در ایـن تحقیق بیشترین ریشه‌زایی در محیط کشت B5 به‌دست آمد. برای شاخه‌زایی تیمار هورمونی ۰/۴ میلی‌گـرم در لیتـر BAP در محیط کشـت MS و ۰/۸ و ۱/۲ میلـی‌گـرم در لیتـر BAP در محیط کشـت B5 مناسـب مـی‌باشـد و بـرای ریشـه‌زایـی تیمارهورمونی ۰/۹ میلی‌گرم در لیتـر IBA در هـر دو محـیط کشت مناسب مـی‌باشـد. بـا توجـه بـه نتـایج بـه‌دسـت آمـده پایه پنتا توانـایی ازدیـاد از طریـق کشـت بافـت را بـه خـوبی دارد.

سپاسگزاری

مؤلفـان بـر خـود لازم مـی داننـد از خـانم مهنـدس سراوانی و مامی‌زاده مسولین محتـرم آزمایشـگاه دانشـگاه گنبـد کـاووس کـه در اجـرای ایـن تحقیـق همکـاری صمیمانه‌ای داشتند سپاسگزاری و قدردانی نمایند.

تضاد منافع

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

سهم نویسندگان

نویسندگان به‌ترتیب طبق آنچه در لیست نویسـندگان 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]