

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

نجمه محمدزاده مقدم^{۱*} و حسن حمیدی^۲

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

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

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۵/۱۰/۱۵

تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۱۲/۱۸

چکیده

توسعه پایه‌های رویشی به منظور افزایش عملکرد در باغ‌های سیب ضروری است و این امر به در دسترس بودن یک روش ساده و آسان تکثیر پایه‌ها بستگی دارد. در این تحقیق اثر شرایط گندزدایی، محیط کشت و تیمارهای مختلف هورمونی روی میزان آلودگی، تعداد شاخه جانبی، طول شاخه، کالوس‌زایی، میزان شاخه‌زایی و تعداد برگ سه پایه رویشی MM106، MM111 و B9 با استفاده از آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار مطالعه شد. ریز نمونه‌ها پس از شستشوی سطحی با غلظت‌های مختلف کلرید جیوه و هیپوکلریت سدیم گندزدایی شده و سپس در محیط‌های کشت MS تغییر یافته، WPM و DKW کشت شدند. نتایج نشان داد که با استفاده از کلرید جیوه ۰/۱ درصد و اتانول ۷۰ درصد به ترتیب به مدت ۳ دقیقه و ۳۰ ثانیه کمترین آلودگی حاصل شد. علاوه بر این تفاوت معنی‌داری بین تیمارها و پایه‌ها برای صفات مورد مطالعه مشاهده شد. در این آزمایش، محیط کشت MS تغییر یافته همراه با ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر هورمون بنزیل آدنین با بیشترین درصد رشد، استقرار موفق تری داشت. مقایسه میانگین‌ها نشان داد که پایه رویشی MM106 از نظر کلیه صفات مورد مطالعه، نسبت به سایر پایه‌های رویشی، برتری داشت. به طوری که بالاترین طول شاخه، کالوس‌زایی و تعداد برگ در این پایه مشاهده شد. به منظور بررسی تأثیر هورمون روی شاخه‌زایی، سطوح مختلف دو هورمون بنزیل آمینو پورین و ایندول بوتریک اسید استفاده شد. بهترین شاخه‌زایی از تیمار هورمونی ۲ میلی‌گرم در لیتر BAP و ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر IBA حاصل شد. نتایج نشان داد که عکس‌العمل ژنوتیپ‌ها نسبت به شرایط *in vitro* متفاوت بود. به طوری که پایه رویشی B9 پاسخ بهتری نسبت به سایر ژنوتیپ‌ها در صفت شاخه‌زایی نشان داد.

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

مقدمه

سیب به وسیله مهاجرین اولیه در طی قرون ۱۶ و ۱۷ میلادی به آمریکا برده شده است. گیاه سیب (*Malus domestica*) متعلق به تیره گل‌سرخیان (Rosaceae) زیر تیره سیبیا (Pomoideae) می‌باشد و با نام علمی *Malus domestica* Brokh. مشهور است. درخت سیب از جمله درختان در مناطق معتدله سردسیری است. میوه سیب خوش عطر و طعم و حاوی مقدار زیادی

سیب از گونه‌های وحشی موجود در آسیا و اروپا بوده و قدمت کشت و پرورش آن به ما قبل تاریخ می‌رسد. از زمان تنویراست^۱ دانشمند گیاه‌شناس روم قدیم (حدود ۲۲۵ سال قبل از میلاد مسیح) ارقام متعددی از سیب در روم مورد ازدیاد قرار می‌گرفته است. اولین بوته‌ها یا دانه‌های

1- Theophrastus

درصد به مدت ۲ دقیقه و یک بار با هیپوکلریت سدیم ۱۵ درصد به مدت ۱۵ دقیقه و نیز شستشو با آب مقطر استریل بعد از هر مرتبه غوطه‌وری در ماده شیمیایی، ضد عفونی کردند.

Lane و همکاران (۱۹۸۲) به منظور بررسی رشد درختان جهش یافته سیب پاکوتاه در شرایط *in vitro*، مرستم سه رقم سیب مکینتاش را که عادت رشدی مشابه گونه والدین پاکوتاه داشتند، استفاده کردند. در این مطالعه از محیط کشت موراشینگ^۲ و اسکوگ^۳ حاوی غلظت‌هایی از بنزیل آدنین جهت باززایی استفاده شد. همه ارقام در یک حد مطلوبی از غلظت بنزیل آدنین یعنی ۳-۶ میکرو مول دارای حداکثر شاخه‌زایی و افزایش رشد طولی بودند. گرچه تحمل به غلظت بالای سیتوکینین وابسته به عادت رشد بود. برای نمونه، در غلظت ۱۰ میکرومول از بنزیل آدنین، میزان شاخه‌زایی بر حسب درصد به ترتیب ۹۰، ۲۰ و ۰ درصد برای ارقام کاملاً پاکوتاه، نیمه پاکوتاه و استاندارد بود.

Mohammadinejad و همکاران (۲۰۱۴) اثر دو نوع محیط کشت^۳ DKW و^۴ WPM و سه غلظت صفر، ۰/۵ و ۱ میکرو مولار از هورمون بنزیل آدنین (BA) بر ریزازدیادی گردوی ایرانی ژنوتیپ Z60 را مورد بررسی قرار دادند. نتایج نشان داد از نظر شاخص‌های رشد، محیط کشت DKW مؤثرتر از WPM بوده است. هم‌چنین آن‌ها با بررسی اثر دو هورمون BA و کینتین در سه غلظت ۴/۴، ۶/۶ و ۸/۸ میکرو مولار در محیط کشت DKW بر پرآوری^۵ این ژنوتیپ نشان دادند که هورمون بنزیل آدنین مؤثرتر از کینتین عمل نموده است و در تمامی تیمارها با افزایش غلظت سیتوکینین‌ها صفات مورد بررسی افزایش یافت.

Tatari Vernosefaderani و همکاران (۲۰۱۲)

جهت ازدیاد سه پایه رویشی درختان میوه هسته‌دار شامل

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

برای ازدیاد گیاهان از دو روش جنسی و غیر جنسی استفاده می‌گردد. در روش ازدیاد جنسی از بذر گیاهان استفاده می‌شود. تکثیر از طریق بذر، موجب می‌شود که نهال‌های حاصل با یکدیگر یکسان نبوده و تفاوت‌های بسیار زیادی را دارا هستند که در نهایت در انجام عملیات کشاورزی به صورت مکانیزه مشکل ایجاد می‌کنند. از میان روش‌های تکثیر غیر جنسی، روش کشت بافت از چند دهه است که بسیار مورد توجه قرار گرفته است زیرا که سرعت تولید و دقت در این روش بسیار بالا است. از طرف دیگر از هر گیاه مادری می‌توان اقدام به تولید میلیون‌ها گیاه در کمترین زمان نمود. علاوه بر این با توجه به شناخت و معرفی محیط‌های کشت متنوع در سال‌های اخیر پیشرفت این علم بسیار افزایش یافته و با کاربرد هورمون‌ها در محیط کشت می‌توان به اهداف مختلفی از قبیل القاء کالوس، رویان‌زایی^۱، شاخه‌زایی، ریشه‌زایی و در نهایت تولید گیاه عاری از بیماری دست یافت (Razdan, 1994).

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

Gurel and Gulsen (۱۹۹۸) در گندزدایی ریز

نمونه‌های بادام از هیپوکلریت سدیم ۲ درصد به مدت ۱۰ دقیقه و به دنبال آن چهار مرتبه شستشو با آب مقطر استریل استفاده کردند. Canan و همکاران (۲۰۰۶) ریز نمونه‌های برگرفته از درختان پسته را ۲ بار با اتانل ۷۰

2- Murashige and Skoog

3- Driver and Kuniyuki Walnut

4- Woody Plant Medium

5- Proliferation

1- Embryogenesis

یک به طول ۰/۳ تا ۰/۸ سانتی متر بودند و در هر قطعه برش خورده حداقل یک جوانه وجود داشت.

ابتدا جهت استقرار جوانه‌ها از محیط کشت‌های WPM (Lloyd and McCown, 1980) و DKW (Driver, and Kuniyuki, 1984) و MS (Murashige and Skoog, 1962) تغییر یافته استفاده شد. شرایط اتاق رشد شامل ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی و شدت نور ۵۰۰۰ لوکس و درجه حرارت 25 ± 1 درجه سانتی گراد می‌باشد.

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

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

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

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

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

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

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

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

مواد و روش‌ها

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

ریز نمونه‌های مورد آزمایش از خزانه ژنوتیپ‌های پاکوتاه گزینش شده سیب واقع در مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی خراسان رضوی در فصول مختلف (از تابستان ۱۳۹۰ تا بهار ۱۳۹۱) تهیه شد. ریز نمونه‌های مورد استفاده شامل جوانه‌های انتهایی و جوانه‌های جانبی بودند. شاخه‌های تهیه شده به طول ۲۰-۱۵ سانتی متر به آزمایشگاه منتقل، برگ‌های آن حذف گردید و شاخه‌ها به قطعات کوچک تقسیم شدند که هر

مقایسه میانگین‌ها نیز با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال پنج درصد انجام شد.

نتایج و بحث

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

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

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

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

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

۱- شاهد بدون هورمون

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

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

۴- ۱ میلی‌گرم در لیتر IBA

۵- ۲ میلی‌گرم در لیتر IBA

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

تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها و رسم نمودارها به ترتیب با استفاده از نرم‌افزارهای SAS و Excel انجام و

جدول ۱- اثر زمان نمونه‌برداری بر فعال شدن ریز نمونه‌ها

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

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

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

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

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

ns, * و ** به ترتیب غیرمعنی‌دار، معنی‌دار در سطوح احتمال ۵ و ۱ درصد.

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

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

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

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

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

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

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

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

جدول ۴- میانگین اثر متقابل پایه × محیط کشت × شرایط ضدعفونی برای صفات مختلف

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

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

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

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

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

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

IBA + ۱ میلی گرم در لیتر BAP و بیشترین درصد کالوس زایی مربوط به تیمار هورمونی ۱ میلی گرم در لیتر IBA و بدون هورمون BAP بود. نتایج نشان داد تیمار هورمونی ۰/۱ میلی گرم در لیتر IBA + ۱ میلی گرم در لیتر BAP کمترین درصد کالوس زایی را داشته است.

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

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

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

نتایج مقایسه میانگین اثرات پایه و تیمارهای هورمونی در کشت درون شیشه‌ای سه پایه رویشی سیب (جدول ۶) نشان داد پایه B9 بیشترین تعداد شاخه و بیشترین تعداد برگ را داشته است اما بیشترین طول شاخه و درصد کالوس زایی مربوط به پایه MM106 بوده است. بیشترین تعداد شاخه و بیشترین تعداد برگ از تیمار هورمونی ۰/۱ میلی گرم در لیتر IBA + ۲ میلی گرم در لیتر BAP به دست آمد. در حالی که بیشترین طول شاخساره مربوط به تیمار هورمونی ۰/۱ میلی گرم در لیتر

جدول ۵- تجزیه واریانس برای صفات مورد مطالعه در تیمارهای مختلف هورمونی و پایه‌های رویشی سیب در مرحله شاخه‌زایی
Table 5. Variance analysis for studied traits in different treatments of hormone and rootstocks of apple in shooting stage

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

ns, * و ** به ترتیب غیرمعنی‌دار، معنی‌دار در سطوح احتمال ۵ و ۱ درصد.

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

جدول ۶- میانگین صفات مورد مطالعه برای پایه‌های مختلف سیب و تیمارهای هورمونی در مرحله شاخه‌زایی

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

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

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

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

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

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

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

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

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

پایین است ولی جوانه‌ها فعال نمی‌باشند و به دلیل ترشح ترکیبات فنلی محیط کشت قهوه‌ای رنگ می‌شود. در

نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که با وجود این که در ماه‌های آبان الی اردیبهشت درصد آلودگی

معنی داری با هم ندارند. در مورد صفات طول شاخه و تعداد برگ، محیط کشت WPM نسبت به DKW برتری نشان داد. این نتیجه را Markafshy و همکاران (۲۰۰۹) نیز گزارش نمودند.

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

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

صورتی که نمونه های گرفته شده از ژنوتیپ های منتخب در اواخر خرداد ماه به خوبی فعال می شوند. نتایج به دست آمده از این پژوهش با نتایج Emam (۲۰۰۴) مطابقت دارد. اما با نتایج Ozzambak and Hepaksoy (۱۹۹۷) متفاوت است که علت آن می تواند به شرایط جغرافیایی، محیطی و ژنوتیپ وابسته باشد. بنابراین می توان با توجه به نتایج این آزمایش زمان نمونه برداری برای ریز ازدیادی پایه های گزینش شده سبب را در اواخر خرداد ماه توصیه نمود.

با توجه به نتایج به دست آمده از آزمایش استقرار جوانه در رابطه با مقایسه سه پایه MM111، MM106 و B9 در همه صفات به جز درصد آلودگی، پایه MM106 برتری معنی داری نسبت به دیگر پایه های مورد مطالعه داشت. گروه بندی نتایج با آزمون دانکن نیز نشان داد که پایه MM106 در مورد صفات تعداد شاخه جانبی، طول شاخه، درصد کالوس زایی و تعداد برگ در گروه a و پایه MM111 در مورد کلیه صفات در گروه b و پایه B9 در مورد صفات تعداد شاخه جانبی، طول شاخه و تعداد برگ در گروه b قرار دارد. در مورد صفت درصد کالوس زایی در گروه C قرار دارد. بنابراین می توان بیان نمود که پایه MM106 پاسخ بهتری به کشت نشان داده است.

نتایج نشان داد سه محیط کشت MS، WPM، DKW تغییر یافته و برای اکثر صفات مورد مطالعه اختلاف معنی داری ندارند. مقایسه میانگین نیز نشان داد که دو محیط کشت MS و WPM تغییر یافته در گروه a و محیط کشت DKW در گروه b قرار می گیرد. نکته قابل توجه در نتایج این بود که محیط کشت MS تغییر یافته در تمامی صفات نسبت به دو محیط دیگر برتری نشان داد. در دو محیط کشت WPM و DKW در هیچ کدام از صفات محیط کشت DKW برتری نشان نداد ولی نتایج در مورد صفات درصد آلودگی، تعداد شاخه جانبی و درصد کالوس زایی تفاوت

کشت بافت مرتبط دانست. هم چنین با توجه به نتایج مقایسه میانگین اثرات تیمارهای هورمونی در کشت درون شیشه‌ای سه پایه رویشی سیب، پایه B9 در مورد صفت تعداد شاخه با میانگین ۲/۶۵ در گروه a قرار دارد که نسبت به پایه‌های دیگر برتری معنی‌داری نشان داد. هم چنین پایه B9 در مورد صفت تعداد برگ با میانگین ۱۶/۴۷ در گروه a قرار گرفت و در مورد این صفت تفاوت معنی‌دار با دو پایه دیگر نداشت. پایه MM111 در مورد صفت تعداد برگ با میانگین ۱۴/۳۲ برگ در گروه a قرار و در مورد سایر صفات در گروه b قرار گرفت. بنابراین می‌توان اینگونه بیان نمود که پایه B9 بهترین پاسخ را نسبت به تیمارهای هورمونی جهت شاخه‌زایی داشته است. این نتایج با نتایج Dradi و همکاران (۱۹۹۶) مطابقت دارد. آن‌ها امکان تکثیر درون شیشه‌ای ۱۱ ژنوتیپ محلب را به‌عنوان پایه برای دو رقم گیلاس مطالعه کردند. در این تحقیق نشان داده شد که میزان پر آوری شاخه در روی محیط کشت مشابه برای پایه‌های مختلف متغیر بود و این گونه نتیجه گرفتند که میزان پر آوری تا حد زیادی به ژنوتیپ وابسته است.

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

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

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

با توجه به نتایج به دست آمده از این آزمایش برای کشت پایه‌های رویشی سیب می‌توان روش گندزدایی با کلرید جیوه ۰/۱ درصد به مدت ۳ دقیقه را توصیه نمود. مقایسه بین سه پایه رویشی MM106، MM111 و B9 هم در آزمایش اول و هم در آزمایش دوم در این طرح مورد بررسی قرار گرفت و نتایج قابل توجهی به دست آمد. در آزمایش اول در خصوص استقرار جوانه، پایه MM106 برتری نشان داد اما در آزمایش دوم بررسی تیمارهای هورمونی در مورد صفت شاخه‌زایی و تعداد برگ، پایه B9 برتری داشت. در مورد صفت طول شاخه و در صد کالوس‌زایی همچنان پایه MM106 برتری داشت، این موضوع را می‌توان به تأثیر هورمون و استفاده از تیمارهای هورمونی مختلف در

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

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

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

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

در بین تیمارهای هورمونی زمانی که هورمون بنزیل آدنین با غلظت ۲ میلی‌گرم در لیتر و IBA با غلظت ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر استفاده شد بهترین نتیجه در تعداد برگ مشاهده گردید. در مورد اثرات متقابل پایه و هورمون بر خلاف اثر جداگانه پایه‌ها، که پایه MM106 نسبت به B9 برتری داشت، پایه B9 با غلظت هورمونی IBA

۰/۱ BAP + ۲ بهترین نتیجه را برای صفت تعداد برگ و تعداد شاخه جانبی از خود نشان داد (در جدول ۷) با میانگین ۶ برای صفت تعداد شاخه جانبی و ۳۸/۸۶ برای صفت تعداد برگ در گروه a قرار گرفته است.

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

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

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

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

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

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

در بین تیمارهای هورمونی زمانی که هورمون بنزیل آدنین با غلظت ۲ میلی‌گرم در لیتر و IBA با غلظت ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر استفاده شد بهترین نتیجه در تعداد برگ مشاهده گردید. در مورد اثرات متقابل پایه و هورمون بر خلاف اثر جداگانه پایه‌ها، که پایه MM106 نسبت به B9 برتری داشت، پایه B9 با غلظت هورمونی IBA

شاخه و ریشه است، مطابقت دارد.

نتیجه گیری

به طور کلی نتایج نشان داد که محیط کشت MS تغییر یافته همراه با ۰/۱ میلی گرم در لیتر هورمون بنزیل آدنین با بیشترین درصد رشد، استقرار موفق تری داشت. هم چنین پایه رویشی MM106 از نظر کلیه صفات مورد مطالعه، نسبت به سایر پایه های رویشی، برتری نشان داد. در این آزمایش، بیشترین شاخه زایی از تیمار هورمونی ۲ میلی گرم در لیتر BAP و ۰/۱ میلی گرم در لیتر IBA حاصل شد. علاوه بر این پایه رویشی B9 پاسخ بهتری نسبت به سایر ژنوتیپ ها در صفت شاخه زایی نشان داد.

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

References

- Bagheri, A.R. and Vesal, C.R. (2003). Tissue cultures operations of plant. Publication of Imam Reza University. 200 P. [In Farsi]
- Canan, C., Ozalsan, M., Toremeh, H., Sarpkaya, K., and Iskender, E. (2006). *In vitro* micrografting of pistachio, *Pistacia vera* L. Var. siirt, on wild pistachio rootstocks. Journal Cell and Molecular Biology, 5: 25-31
- Ciccotti, A.M., Bisognin, C., Battocletti, I., Salvadori, A., Herdemetens, M., and Jarasch, W. (2008). Micropropagation of apple proliferation-resistant apomictic malus sieboldii genotypes. Agricultural Research, 6(2): 445-458.
- Dradi, G., Vito, G., and Standardi, A. (1996). *In vitro* Mass propagation of eleven *Prunus mahaleb* ecotypes. Acta Horticulturae, 410: 477-483.
- Driver, J.A. and Kuniyuki, A.H. (1984). *In vitro* propagation of Paradox walnut rootstock. Horticultural Science, 19: 507-509.
- Emam, M. (2004). Asexual regeneration of mature Juglans regia by shoot tip culture. Pajouhesh and Sazandegi, 63(2):10-15. [In Farsi]
- Ghavidel Masole, A. (2003). Micropropagation base maling 26 (M26) and diamond confusion by in vitro method. M.Sc. Thesis, Islamic Azad University, Science and Research Branch. [In Farsi]
- Godarzi, R. (1995). Study on the cherry rootstock propagation through tissue culture. M.Sc. Thesis, Tarbiat Modares University. 108 P. [In Farsi]
- Gurel, S. and Gulsen, Y. (1998). The effects of IBA and BAP on *in vitro* shoot production

- of Almond (*Amygdalus communis* L.). Turkish Journal of Botany, 22: 375-379.
- Isikalan, C., Akbas, F.A., Namli, S., Tikat, E., and Basaran, D. (2008). *In vitro* micropropagation of almond (*Amygdalus communis* L.cv. Nonpareil). African Journal Biotechnology, 7(12): 1875-1880.
- Kamali, K. (1995). Determination of the most suitable culture medium and growth conditions for micropropagation of Gf677 (hybrid of almond × peach) rootstocks. M.Sc. Thesis, Tarbiat Modares University. 101 P. [In Farsi]
- Khaje aldeini, M. (2001). Study on the micropropagation of apple base of MM106 (Maling merton 106) by using tissue culture technique. M.Sc. Thesis, Islamic Azad University, Science and Research Branch. [In Farsi]
- Lane, W.D., Looney, N.E., and Mage, F. (1982). A selective tissue culture medium for growth of compact (dwarf) mutants of apple. Theoretical and Applied Genetics, 61(3): 219-223.
- Lloyd, G. and McCown, B. (1980). Commercially feasible micropropagation of mountain laurel *Kalmia latifolia*, by use of shoot tip culture. International Plant Propagators' Society, 30: 421-427.
- Manee, A. 1993. Introduction of wild fruit trees in the service parks. Third Issue. Department of Parks and Green Spaces in Tehran. [In Farsi]
- Markafshy, A.C., Motlabiazar, R., Hajiloo, G., and Dezhampour, G. (2009). *In vitro* plant production GF677 rootstock. The sixth Iranian Horticultural Science Conference. Guilan University, Rasht, Iran. pp:163-65. [In Farsi]
- Mohammadinejad, Sh., Gholami, M., and Asnaashari, M. (2014). The effect of culture media and cytokinin on the primary steps of walnut micro propagation, selected genotype 305. Journal of Plant Production, 37(3): 83-92. [In Farsi]
- Murashige, T. and Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. Physiologia Plantarum, 15: 473-497.
- Ozzambak, E. and Hepaksoy, S. (1997). Investigations on *in vitro* proliferation of sour cherry cv. Heimanns Rubinweichsel. Acta Horticulturae, 447: 155-156.
- Razdan, M.K. (1994). An introduction to plant tissue culture. Oxford and IBH publishing co. PVT. LTD. New Dehli, India. 398 P.
- Sanei Shariat Panahi, M. (1987). Botany.Tehran University Press. 314 P. [In Farsi]
- Sansavinis, S. and Lougi, S. (1996). Performance of sweet cherry cultivar on new clonal rootstocks. Acta Horticulturae, 410: 363-371.
- Tatari Vernosefaderani, M., Mosavi, C.A., and Bozari, N. (2012). Micropropagation of

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

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