Research Article

Plant Prod., 2020, 43(3), 337-348
DOI: 10.22055/ppd.2019.26409.1649

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

Optimizing Micro Propagation of Red Flesh Apple Genotype

Nooshin Kazami[1]*, Mohammad Esmaiil Amiri[2], Maryam Jaffarkhani Kermani[3] and Zahra Sadat Hosseini[4]

1- ***Corresponding Author:** M.Sc. Student of Horticultural Sciences, Faculty of Agriculture, University of Zanjan, Zanjan, Iran (n.kazemi@tabrizu.ac.ir)
2- Associate Professor, Department of Horticultural Sciences, Faculty of Agriculture, University of Zanjan, Zanjan, Iran
3- Associate Professor, Agriculture Biotechnology Research Institute of Iran (ABRII), Karaj, Iran
4- Agriculture Biotechnology Research Institute of Iran (ABRII), Karaj, Iran

Received: 7 October, 2018 Accepted: 1 May, 2019

Abstract

Background and Objectives
Red flesh apple belongs to *Malus niedzwetzkyana* of *Rosaceae* family. It has high levels of important phytochemicals like antioxidants, flavonoids and anthocyanins in its cortex, which, in addition to attractiveness, is a source of benefit compound. The aim of the present investigation was to optimize efficient protocols for micro propagation of red flesh apple in order to use the results in future breeding strategies.

Materials and Methods
During the early spring, stem cuttings of growing red flesh apple trees were surface-sterilized in 70% ethanol and 50% sodium hypochlorite. Then, sterilized samples were placed in the test tubes containing MS medium supplemented with 2 µM BAP. At the proliferation stage, interactive effects of BAP (0, 2, 4, 6 µM) and GA_3 (0, 3, 6 µM) on various aspects of proliferation (multiplication rate and vegetative growth characteristics such as number of produced shoots per explant, shoots length, leaf numbers, and the fresh and dry weight of explants) were investigated. At rooting stage, the effect of different concentrations of IBA or NAA (0, 1, 2, 3,4 µM) on the percentage of rooting, number of roots per explant and length of roots were compared. At acclimatization stage, the plantlets were transferred into pots with a volume of 200 ml containing sterile compound at the greenhouse condition.

Results
The results showed that there was a significant difference between the effects of various concentrations of BAP and GA_3 on micro propagation of red flesh apple. The best result in proliferation (7.9 of axillary shoots after 8 months) was obtained from explants that were cultured in the medium containing 4 µM BAP and 3 µM GA_3. At rooting stage, the maximum rooting percentage (85.2%) was obtained in the medium containing 3 µM IBA. In addition, rooted explants from IBA treatments were successfully acclimatized (100%) in the greenhouse, but rooted explants in NAA treatments were weak in acclimatized stage (40%).

Discussion
Measuring the growth rate is the major economic parameter for successful plant production at *in vitro* conditions, which is usually characterized by the number of axillary

© 2020 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.

shoots, number of regenerated leaves and increase in the length of shoots and fresh and dry weight. We obtained the highest growth rate of red flesh apple in the culture medium containing 4 μM of BAP. The efficiency of BAP as an important cytokinin in apple proliferation has been reported in other studies as well. The results of the present investigation showed that highest rooting percentage was obtained from culture medium containing 3 μM of IBA. In addition, morphology of roots varied in callus formation and longitudinal growth and the samples rooted in IBA treatments had stronger roots than the rooted samples in NAA treatments. It seems that exposure to NAA instead of IBA stimulates indirect organogenesis and produced undesirable side effects on roots, such as callus formation, which can cause plantlets weakness during the period of acclimatization.

Keywords: Compatibility, Multiplication, Plant growth regulator, Rooting

مقاله پژوهشی

Plant Prod., 2020, 43(3), 337-348
DOI: 10.22055/ppd.2019.26409.1649
ISSN (P): 2588-543X
ISSN (E): 2588-5979

بهینه‌سازی محیط کشت جهت ریزازدیادی سیب گوشت سرخ

نوشین کاظمی[1]*، محمداسماعیل امیری[2]، مریم جعفرخانی کرمانی[3] و زهرا سادات حسینی[4]

۱-*نویسنده مسئول: دانشجوی کارشناسی ارشد علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زنجان، زنجان، ایران (n.kazemi@tabrizu.ac.ir)
۲- دانشیار، گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زنجان، زنجان، ایران
۳- دانشیار، پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی ایران، کرج، ایران
۴- کارشناس پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی ایران، کرج، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۰۷/۱۵ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۰۲/۱۱

چکیده

این پژوهش در سال ۱۳۹۱ در آزمایشگاه کشت بافت دانشگاه زنجان و با هدف بهینه‌سازی ریزازدیادی یکی از ژنوتیپ‌های ارزشمند و بومی سیب گوشت سرخ انجام شد. آزمایش‌ها شامل بررسی اثر ترکیبات متفاوت تنظیم‌کننده‌های رشد GA_3 (در سه سطح صفر، ۳ و ۶ میکرومولار) و BAP (در چهار سطح صفر، ۲، ۴ و ۶ میکرومولار) بر جنبه‌های مختلف پرآوری شامل تعداد برگ و ریزشاخه تولیدشده در هر ریزنمونه، میزان رشد طولی ریزشاخه‌ها و وزن تر و خشک ریزنمونه‌ها بود. آزمایش‌ها به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار صورت گرفتند. همچنین، تأثیر غلظت‌های مختلف تنظیم‌کننده‌های رشدی IBA (در پنج سطح صفر، ۱، ۲، ۳ و ۴ میکرومولار) و NAA (در پنج سطح صفر، ۱، ۲، ۳ و ۴ میکرومولار) بر ریشه‌زایی ریزنمونه‌ها بررسی شد. بهترین نتیجه برای پرآوری (۷/۹ تعداد ریزشاخه/ ریزنمونه/ ۸ هفته) در محیط کشت حاوی چهار میکرومولار BAP و سه میکرومولار GA_3 به‌دست‌آمد. به‌علاوه، گیاهان تکثیرشده در این تیمار نسبت به تیمارهای دیگر پژوهش، نتایج مطلوب‌تری در کلیه صفات مورد بررسی شامل تعداد برگ، میزان رشد طولی ریزشاخه‌ها و وزن تر و خشک ریزنمونه‌ها نشان دادند. نتایج نشان داد، محیط کشت MS ۱/۲ حاوی سه میکرومولار IBA با ۸۵/۲ درصد ریشه‌زایی طی هشت هفته بهترین ترکیب برای ریشه‌زایی بود. نتایج سازگاری نشان داد گیاهان ریشه‌دارشده در تیمارهای حاوی IBA بسیار موفق‌تر (۱۰۰ درصد) از گیاهچه‌های ریشه‌دارشده در تیمارهای حاوی NAA (۴۰ درصد) بودند، لذا محیط کشت حاوی سه میکرومولار IBA کاراترین ترکیب جهت ریشه‌دار شدن و بقای سیب گوشت سرخ در مرحله سازگاری بود.

کلیدواژه‌ها: پرآوری، ریشه‌زایی، سازگاری تنظیم‌کننده‌های رشد گیاه

مقدمه

درخت سیب (*Mauls*) از مهم‌ترین گیاهان دانه‌دار خانواده Rosaceae در مناطق سردسیری و معتدله جهان است (Cornille et al., 2012). گسترش کشت و تجارت جهانی سیب باعث توجه ویژه به این محصول و افزایش روزافزون سطح زیرکشت، در اقصی نقاط جهان شده است (Brown, 2012). سیب گوشت سرخ گیاهی منحصربه‌فرد از جنس Malus و گونه *pumila* است که به دلیل میزان بالای آنتی‌اکسیدان و آنتوسیانین در کورتکس، علاوه بر ایجاد جذابیت ظاهری، خواص درمانی ویژه‌ای نیز یافته

است (Mazza and Velioglu, 1992; Etherton, 2002).

ریزازدیادی موفق سیب به عوامل زیادی مانند نوع ریزنمونه، سطح هورمون‌های داخلی، نوع محیط کشت و ترکیبات تنظیم‌کننده رشدی آن، شرایط محیطی و ... وابسته است (Tang et al., 2008; George et al., 2008; Dobranszki and Da Silva, 2010; Jamshidi et al., 2016). کمیت و کیفت پرآوری ریزشاخه‌های سیب تحت تأثیر فعالیت مریستم‌های جانبی است و این امر نیز به نوبه خود از غلظت و تناسب هورمون‌های سایتوکنین، اکسین و جیبرلین تأثیر می‌پذیرد (Jafarkhani Kermani et al., 2008; Soni et al., 2011).

استفاده از محیط کشت پایه MS (Murashige and Skoog, 1962) برای ریزازدیادی اغلب ژنوتیپ‌های سیب مناسب بوده است (Soni et al., 2011; Mohamadzadeh Moghadam and Hamidi, 2017).

سایتوکنین‌ها مهم‌ترین ترکیبات تنظیم‌کننده رشدی در ریزازدیادی سیب هستند که به همراه غلظت‌های کم اکسین‌ها و در برخی موارد نیز جیبرلین‌ها در محیط کشت ریزازدیادی استفاده شده‌اند (Jafarkhani Kermani et al., 2008; Soni et al., 2011). در تحقیقات آمده است که استفاده از بنزیل آمینو پورین (BAP) با غلظت‌های ۰/۵ تا ۲ میلی‌گرم در لیتر، نتایج مطلوبی در ریزازدیادی طیف وسیعی از ارقام و پایه‌های سیب داشته است، برای مثال به کار بردن ۲ میکرومولار BAP بیشترین تعداد ریزشاخه (۴/۸ ریزشاخه/ریزنمونه) را در MM111 ایجاد کرد، و تیمار ۴ میکرومولار این تنظیم‌کننده رشدی، محرک بیشترین پرآوری (۶ ریزشاخه/ریزنمونه) در MM106 بود (Jafarkhani kermani et al., 2008; Ciccoti et al., 2009). حضور جیبرلیک اسید (GA_3) در ترکیب محیط کشت یکی از مهم‌ترین فاکتورهای مؤثر بر رشد طولی ریزشاخه‌ها است و برقراری نسبت مناسب بین غلظت BAP و GA_3 نقش مؤثری در پرآوری و رشد طولی ریزنمونه‌ها نشان داده است (Jafarkhani Kermani et al., 2008; Soni et al., 2011).

موفقیت ریشه‌زایی نیز به مواردی مانند ژنوتیپ هر رقم، تنظیم‌کننده‌های رشدی و سایر عوامل بستگی دارد (Xu et al., 2008; Ballester et al., 2009). اکسین‌ها در القاء ریشه‌زایی در ریزقلمه‌های اغلب ارقام سیب تأثیر دارند (Ballester et al. 2009; Hunt et al., 2011). پرکاربردترین اکسین‌ها در ریشه‌زایی ریزنمونه‌های سیب، شامل ایندول ۳ بوتریک استیک اسید (IBA)، ایندول استیک اسید (IAA) و نفتالین استیک اسید (NAA) هستند که به‌صورت ترکیبی و یا به تنهایی و با غلظت‌های متنوع از ۰/۱ تا ۳ میلی‌گرم در لیتر، در محیط کشت استفاده شده‌اند (Magyar-Tabori et De Klerk, 2002; al., 2002; Modgil et al., 2009).

این پژوهش با هدف بهینه‌سازی ریزازدیادی سیب گوشت سرخ انجام شد تا ضمن حفظ این ژنوتیپ ارزشمند به‌عنوان ژرم پلاسم بومی، امکان مطالعه و بررسی راحت‌تر، دقیق‌تر و کم هزینه‌تر در کارهای اصلاحی و آزمایش‌های آتی در خصوص مطالعات فیزیولوژیکی، بیوشیمیایی و مولکولی فراهم شود.

مواد و روش‌ها

تهیه مواد گیاهی و استقرار

مواد گیاهی مورد استفاده در این پژوهش از سرشاخه‌های جوان و در حال رشد درختان بالغ سیب ژنوتیپ گوشت سرخ شهرستان شاهرود تهیه شدند. نمونه‌ها پس از ضدعفونی شامل شستشو با الکل اتیلیک ۷۰ درصد و هیپوکلریت سدیم ۵۰ درصد و حدود ۲۰ میکرولیتر Tween20 و درنهایت شستشو با آب‌مقطر استریل، در محیط کشت پایه MS، با افزودن دو میکرومولار BAP به همراه ۳۰ گرم در لیتر ساکاروز به‌عنوان منبع کربوهیدرات و ۶/۸ گرم در لیتر آگار مستقر و به اتاق رشد با دمای ۱±۲۴ درجه سانتی‌گراد و دوره نوری ۱۶ ساعت روشنایی با شدت ۲۰۰۰ لوکس و هشت ساعت تاریکی منتقل گردیدند. پس از شش هفته ریزنمونه‌ها به محیط کشت جدیدی با همان ترکیب جهت تکثیر منتقل گردیدند.

آزمایش‌های بخش بهینه‌سازی پرآوری بر اساس آزمون فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی انجام شد،

فاکتورها شامل بررسی اثر غلظت و ترکیبات متفاوت مواد تنظیم‌کننده رشد شامل GA_3 در سه سطح (صفر، ۳ و۶ میکرومولار) و BAP در چهار سطح (صفر، ۲، ۴ و ۶ میکرومولار) در ترکیب با یکدیگر بود. در هر ظرف آزمایش پنج ریزنمونه کشت شده بود و هر تیمار دارای سه تکرار بود. آزمایش‌های بخش ریشه زایی در قالب طرح کاملاً تصادفی به‌صورت بررسی مستقل تأثیر غلظت‌های مختلف IBA در پنج سطح (صفر، ۱، ۲، ۳ و ۴ میکرومولار) و NAA در پنج سطح (صفر، ۱، ۲، ۳ و ۴ میکرومولار) بود. در هر ظرف آزمایش، پنج ریزنمونه کشت شد و اثر هر یک از تیمارها در سه تکرار مورد بررسی قرار گرفت.

بهینه‌سازی مرحله پرآوری

پس از تکثیر اولیه، پرآوری ریزنمونه‌ها در ۱۲ تیمار از تنظیم‌کننده‌های رشدی با غلظت‌های مختلف BAP و اسید جیبرلیک (GA_3) در محیط کشت پایه MS مورد بررسی و مقایسه قرار گرفت (جدول ۱).

در هر ظرف کشت (شیشه‌های مربا به ارتفاع ده سانتی‌متر و قطر داخلی هفت سانتی‌متر) پنج ریزنمونه قرار داده شد. ظروف حاوی ریزنمونه‌ها به اتاق رشد با دمای ۱±۲۴ درجه سانتی‌گراد و دوره نوری ۱۶ ساعت روشنایی با شدت ۲۰۰۰ لوکس و هشت ساعت تاریکی منتقل گردیدند. صفات مورد بررسی شامل تعداد ریزشاخه تشکیل‌شده در هر ریزنمونه، میانگین طول ریزنمونه‌ها، میانگین تعداد برگ در هر ریزنمونه و وزن تر و خشک ریزنمونه‌ها در انتهای هفته هشتم از شروع آزمایش بود.

هشت هفته پس از کشت، وزن برگ‌ها و ساقه‌های هر ریزنمونه در تمام تیمارها به‌صورت مستقل اندازه‌گیری شد. جهت اندازه‌گیری وزن خشک، ابتدا ریزنمونه‌های بسته‌بندی‌شده در پاکت‌های کاغذی، به مدت ۴۸ ساعت در آون با دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند و سپس توزین شدند.

بهینه‌سازی مرحله ریشه‌زایی

آزمایش‌های این بخش شامل بررسی اثر دو نوع اکسین (به‌صورت مستقل) در محیط کشت حاوی نمک‌های MS ۱/۲ و فاقد ویتامین بر ریشه‌زایی ریزنمونه‌ها بود. تنظیم‌کننده‌های رشدی شامل IBA و NAA هر یک در پنج سطح: صفر، یک، دو، سه و چهار میکرومولار بودند. در هر ظرف آزمایش پنج ریزنمونه قرار گرفت و ظروف کشت حاوی ریزنمونه‌ها به مدت یک هفته در تاریکی قرار گرفتند. سپس ریزنمونه‌ها به محیط کشت MS فاقد هورمون در اتاق رشدی با دوره نوری ۱۶ ساعت روشنایی و هشت ساعت تاریکی منتقل شدند. هفت هفته بعد، درصد ریشه‌زایی ریزنمونه‌های هر تیمار، تعداد و میانگین طول ریشه‌های تولیدشده در هر ریزنمونه مورد بررسی قرار گرفت.

مرحله سازگاری

ریزنمونه‌های ریشه‌دارشده به گلدان‌هایی با ارتفاع ۱۲ سانتی‌متر و قطر داخلی هفت سانتی‌متر، حاوی پرلایت و ماسه و پیت ماس استریل‌شده به نسبت ۱:۱:۱ منتقل شدند و به مدت چهار تا پنج روز در رطوبت نسبی حدود ۹۰ درصد در گلخانه با دمای بین ۲۲ تا ۲۶ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند، سپس سطح رطوبت نسبی به حدود ۶۰ درصد کاهش داده شد و گیاهان برای حدود چهار هفته در این شرایط قرار گرفتند، سپس به گلدان‌های بزرگ‌تر جهت خروج از گلخانه منتقل شدند.

Table 1. The plant growth regulators treatments of proliferation stage

Treatments	BAP (µm)	GA3 (µm)	Treatments	BAP (µm)	GA3 (µm)
T1	0	0	T7	4	0
T2	0	3	T8	4	3
T3	0	6	T9	4	6
T4	2	0	T10	6	0
T5	2	3	T11	6	3
T6	2	6	T12	6	6

تجزیه و تحلیل آماری

محاسبات آماری داده‌های به‌دست‌آمده توسط نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۰ انجام شد و نمودارهای مربوطه توسط نرم‌افزار Excel رسم گردید. در مورد تمامی شاخص‌های رشد در همه مراحل، میانگین تیمارها به روش آزمون چنددامنه‌ای دانکن و الاس‌دی (LSD) در سطح احتمال پنج درصد و یک درصد مورد مقایسه قرار گرفتند.

نتایج و بحث

بهینه‌سازی مرحله پرآوری

نتایج نشان داد، تعداد ریزشاخه تولیدشده در ریزنمونه‌های سیب گوشت سرخ، به‌طور معنی‌داری ($P < ۰/۰۱$) تحت تأثیر سطوح مختلف غلظت تنظیم‌کننده‌های رشد BAP، GA_3 و اثر متقابل آن‌ها قرار داشت. مقایسه میانگین سطوح مختلف تنظیم‌کننده‌های رشدی موردمطالعه نشان داد، بیشترین تعداد ریزشاخه (۷/۹۹۷ ریزشاخه/ ریزنمونه/ ۸ هفته) از ریزنمونه‌های تیمار T8 (BAP 4µm, GA_3 0µm) و کمترین تعداد نیز در ریزنمونه‌های تیمارهای فاقد BAP (T1, T2, T3) به‌دست‌آمد (جدول ۲). بر اساس پژوهش‌های گذشته نیز BAP به‌عنوان مؤثرترین سایتوکنین در پرآوری سیب شناخته شده است و عنوان‌شده که رابطه مستقیمی بین غلظت این سایتوکنین در محیط کشت و تعداد و اندازه ریزشاخه‌های تولیدشده از ریزنمونه‌ها مشاهده شده است (Soni et al., 2011). به‌علاوه در گزارشات آمده است که غلظت مؤثر و بهینه BAP بر پرآوری سیب، با توجه به رقم و ژنوتیپ متفاوت است اما محدوده دو تا هشت میکرومولار BAP نتیجه مطلوبی در پرآوری اغلب ارقام داشته است (Dobranszki and da Silva, 2010). با توجه به نتایج حاصل از این پژوهش چهار میکرومولار BAP مؤثرترین غلظت این ساینوکنین در پرآوری بهینه سیب گوشت سرخ بود.

در این پژوهش جهت تشویق شاخساره‌ها به رشد طولی و غلبه بر ممانعت از تأثیر BAP در طویل شدن شاخساره‌ها، در محیط کشت پرآوری، از GA_3 استفاده شد. نتایج نشان داد طول ریزشاخه‌های تولیدشده در پایان آزمایش، به‌صورت معنی‌داری ($P < ۰/۰۱$)، تحت تأثیر سطوح مختلف BAP و اثر متقابل BAP و GA_3 قرار گرفته است. سطوح مختلف غلظت GA_3 نیز دارای تأثیر معنی‌داری ($P < ۰/۰۵$) بر رشد طولی ریزشاخه‌ها بود. مقایسه میانگین سطوح مختلف تنظیم‌کننده‌های رشدی مورد مطالعه نشان داد، بیشترین میانگین طول ریزشاخه (۵۶/۳۳mm) در تیمار T12 (BAP 6µm, GA_3 6µm) به‌دست‌آمده است (جدول ۲). در راستای نتایج حاصل از این پژوهش، محققین دیگر نیز گزارش داده‌اند که برقراری نسبت مناسب بین غلظت BAP و GA_3 نقش مؤثری در پرآوری و رشد طولی ریزنمونه‌ها دارد (Jafarkhani Kermani et al., 2008; Soni et al., 2011).

افزایش وزن تر ریزنمونه‌های سیب گوشت سرخ، به‌طور معنی‌داری ($P <۰/۰۱$) تحت تأثیر سطوح مختلف غلظت BAP قرار گرفت. حداکثر وزن تر ریزنمونه‌ها (۱۴۴۸ میلی‌گرم)، در تیمار T11 (BAP 6µm, GA_3 3µm) مشاهده شد (جدول ۲). لازم به ذکر است، سطوح مختلف GA_3 و اثر متقابل BAP و GA_3 فاقد تأثیر معنی‌دار بر وزن تر ریزنمونه‌ها بودند. وزن خشک ریزنمونه‌های گیاه سیب گوشت سرخ نیز به‌طور معنی‌دار ($P <۰/۰۱$) تحت تأثیر سطوح مختلف غلظت BAP قرار گرفت، حداکثر وزن خشک ریزنمونه (۱۲۵ میلی‌گرم)، از تیمار T11 (BAP 6µm, GA_3 6µm) به‌دست‌آمد (جدول ۲). سطوح مختلف GA_3 و اثر متقابل BAP و GA_3، مانند وزن تر، تأثیر معنی‌داری بر وزن خشک ریزنمونه‌ها نداشتند. به‌طورکلی افزایش غلظت BAP در محیط کشت پرآوری، با افزایش تقسیم سلولی و تولید و باززایی ریزشاخه‌های جدید در ریزنمونه‌های تحت تیمار، باعث افزایش حجم توده گیاهی و وزن تر و خشک ریزنمونه‌ها شد.

Table 2. The effect of plant growth regulators treatments on proliferation of shoots and growth factors of red flesh apple after the eighth weeks

PGRs Treatments	Fresh weight (mg)	Dry weight (mg)	Shoots number /explant	Length of explants (mm)	Leaves number /explant
T1: BAP 0 µM, $GA_3$0 µM	142^{d}	31.06^{e}	1.41^{c}	21.33^{d}	3.55^{d}
T2: BAP0 µm, $GA_3$3 µM	172^{d}	23.30^{ef}	1.85^{c}	41^{bc}	7.44^{cd}
T3: BAP0 µm, $GA_3$6 µM	116^{d}	22.17^{ef}	2.30^{c}	36.33^{bc}	6.11^{cd}
T4: BAP2 µm, GA_3 0µM	651^{c}	85.43^{c}	1.21^{c}	42.66^{b}	9.88^{c}
T5: BAP2 µm, GA_3 3µM	436^{cd}	66.63^{d}	5.55^{b}	32^{c}	9.33^{c}
T6: BAP2 µm, $GA_3$6 µM	662^{c}	88.63^{c}	5.88^{bc}	34^{c}	12.22^{c}
T7: BAP4 µm, GA_3 0µM	872^{b}	107.53^{b}	4.55^{bc}	35^{c}	13.33^{c}
T8: BAP4 µm, $GA_3$3 µM	844^{b}	113.20^{ab}	7.99^{a}	38^{bc}	41.11^{a}
T9: BAP4 µm, $GA_3$6 µM	1145^{ab}	117.33^{ab}	7.88^{a}	40.33^{bc}	37.77^{a}
T10: BAP6 µm, $GA_3$0 µM	996^{b}	119.33^{a}	2.88^{c}	46^{b}	13.33^{c}
T11: BAP6 µm, GA_3 3µM	1448^{a}	125^{a}	5.66^{b}	28.33^{cd}	27.22^{b}
T12: BAP6 µm, $GA_3$6 µM	561^{cd}	76.33^{c}	4.11b^{c}	56.33^{a}	18.88^{bc}
LSD	214	18.86	0.45	2.22	1.82

* Different letters show significant differences.

ارزیابی صفات اندازه‌گیری‌شده در مرحله پرآوری، نشان داد بیشترین میزان پرآوری در محیط کشت‌های حاوی ۴ میکرومولار BAP بوده است. این نتایج در پژوهش‌های دیگری نیز به‌دست‌آمده است (Saito and Suzuki, 1999; Dobranszki and Da Silva, 2010). همچنین ریزنمونه‌های تکثیرشده در این تیمار، علاوه بر دارا بودن بیشترین میانگین تولید ریزشاخه، دارای میانگین بالایی از نظر تعداد برگ و وزن تر و وزن خشک نیز بودند. این امر نشان می‌دهد، تیمارهایی که توانایی بیشتری در تولید ریزشاخه جدید دارند، در کل دارای رشد رویشی بیشتری نسبت به تیمارهایی هستند که امکان طویل شدن بیشتر را برای گیاهچه‌ها فراهم می‌کنند.

درنهایت با درنظر گرفتن نتایج حاصل از ۱۲ تیمار تنظیم‌کننده رشدی این پژوهش در زمینه صفات مهم رشد رویشی و پرآوری ریزنمونه‌ها، محیط کشت MS حاوی ۴ میکرومولار BAP و ۳ میکرومولار GA_3 (T8) بهترین ترکیب برای پرآوری سیب گوشت سرخ را دارا بود. ریزنمونه‌های کشت‌شده در این تیمار به‌طور میانگین بالاترین نرخ تولید ریزشاخه، تعداد برگ و وزن تر و خشک را نشان دادند (جدول ۲).

بهینه‌سازی مرحله ریشه‌زایی

نتایج نشان داد، تعداد ریشه‌های تولیدشده در ریزنمونه‌های تیمارهای حاوی NAA به‌صورت معنی‌دار ($P<$۰/۰۱) تحت تأثیر غلظت‌های مختلف این تنظیم‌کننده رشدی قرارگرفته است. علاوه بر این غلظت‌های مختلف NAA در محیط کشت ریشه‌زایی به‌صورت معنی‌داری ($P<$۰/۰۵) طول ریشه‌های تولیدشده در هر ریزنمونه را تحت تأثیر قرار داده بود. در تیمارهای حاوی غلظت‌های مختلف IBA نیز درصد ریشه‌زایی، تعداد و طول ریشه‌های تولیدشده در هر ریزنمونه، به‌صورت معنی‌داری ($P<$۰/۰۱) تحت تأثیر تیمارهای IBA قرار داشت. مقایسه میانگین فاکتورهای مورد بررسی نشان داد بیشترین درصد ریشه‌زایی (۸۵/۲ درصد) در ریزنمونه‌های تیمارهای حاوی سه میکرو مولار IBA مشاهده شده‌است. بیشترین تعداد ریشه تشکیل‌شده در هر ریزنمونه، از تیمارهای دو میکرومولار NAA (۴/۹ تعداد ریشه/ ریزنمونه) به‌دست‌آمد و درنهایت بیشترین طول ریشه‌ها (۳۵/۷ mm) در تیمارهای حاوی یک میکرو مولار IBA حاصل شد (شکل ۱). در بین دو نوع اکسین مورد آزمایش، IBA برای القای ریشه مناسب‌تر از NAA بود و در غلظت‌های مشابه از IBA و NAA، درصد ریشه‌زایی بیشتری در تیمارهای IBA حاصل شد. علاوه‌بر این، مورفولوژی ریشه‌ها ازلحاظ میزان تشکیل کالوس و رشد طولی در این دو تیمار با یکدیگر متفاوت بودند و گیاهانی که در تیمارهای حاوی IBA ریشه‌دار شده بودند، ریشه‌های فشرده‌تر و قوی‌تری داشتند درحالی‌که ریشه‌های تولیدشده در تیمارهای NAA حاوی کالوس زیاد و ترد و شکننده بودند (شکل ۲).

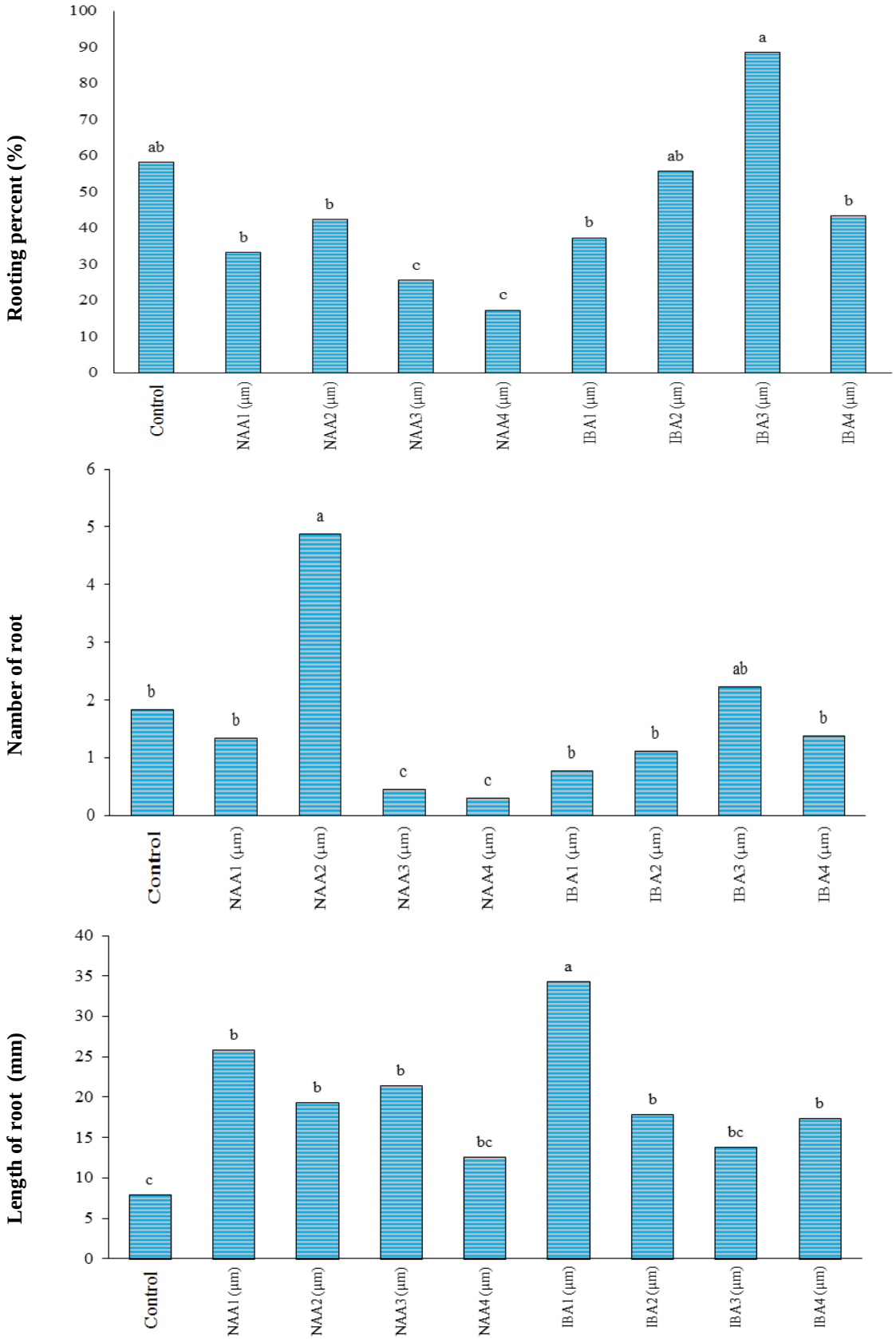

Figure 1. Effects of PGRs treatments on rooting aspects of red flesh apple at the end of eighth weeks. (a): Rooted explants percentage per treatment, (b): The average number of roots produced per explant, (c): The average of roots length per explants (different letters show significant differences)

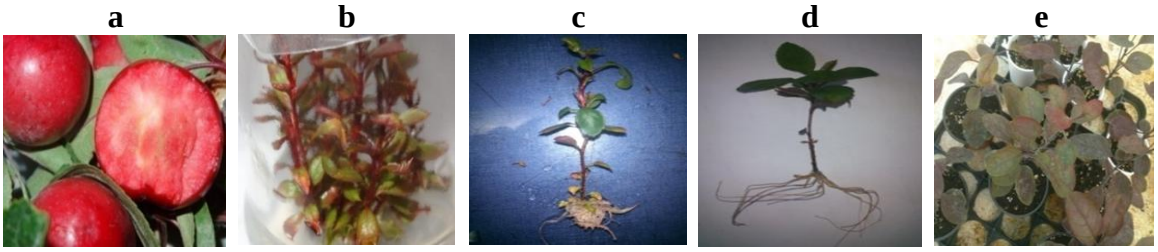

Figure 2. fruit of red flesh apple, Figure (a), Proliferation stage of explants (b), A rooted explant in NAA treatments (c), A rooted explant in IBA treatments (d), Some adapted examples in the greenhouse (e)

در راستای نتایج حاصل از این پژوهش، در پژوهشی عنوان‌شده که IBA یک ترکیب اکسینی مؤثر در ریشه‌زایی سیب بوده و در مقایسه با NAA می‌تواند ریشه‌های قوی‌تر و طویل‌تری در ریزنمونه‌ها تولید کند (Boudabous et al., 2010). به‌طورکلی در پژوهش‌های گذشته، نوع اکسین به‌کار رفته در محیط کشت به‌عنوان یک عامل مؤثر بر تعداد و طول ریشه‌های تولیدشده در نمونه‌های هر رقم و ژنوتیپ اشاره شده است (De Klerk, 2002; Luckman and Naija et al., 2008; Menary, 2002; Hanet al., 2009).

درنهایت، فارغ از تفاوت‌های کیفی ریشه‌های تولیدشده در ریزنمونه‌ها، در بین تیمارهای مورد بررسی، تیمار سه میکرومولار IBA و تیمار دو میکرومولار NAA موثرترین تیمارهای این آزمایش در زمینه میانگین طول و تعداد ریشه‌های تولیدشده در ریزنمونه‌های سیب گوشت سرخ بودند.

سازگاری

از تعداد ۲۰ گیاهچه منتقل‌شده به گلدان جهت سازگاری، ده نمونه در تیمارهای NAA ریشه‌دارشده بودند و ده نمونه دیگر حاصل از ریشه‌زایی ریزنمونه‌ها در تیمارهای IBA بودند. در پایان این مرحله، شش گیاهچه از بین رفت و ۱۴ گیاهچه در سازگاری موفق بودند و تطابق حاصل کردند (شکل ۲). شش نمونه از دست‌رفته مربوط به گیاهچه‌های ریشه‌دارشده در تیمارهای مختلف NAA بودند. به عبارتی، بر اساس نتایج به‌دست‌آمده تنها ۴۰ درصد از نمونه‌های ریشه‌دارشده در تیمارهای حاوی NAA توانایی زنده‌مانی و تطابق با محیط جدید را داشتند و ۶۰ درصد دیگر از بین رفتند، اما تمامی (۱۰۰ درصد) نمونه‌های ریشه‌دارشده در تیمارهای حاوی IBA در سازگاری و تطابق با محیط خارج از گلخانه موفق بودند. همان‌طور که ذکر شد، در ریزنمونه‌های ریشه‌دارشده در تیمارهای حاوی NAA، میزان بالایی از کالوس مشاهده شد و به نظر می‌رسد NAA ریشه‌زایی غیرمستقیم را در گیاه القا می‌کند که نتیجه این عمل تولید ریشه‌هایی ضعیف‌تر و کوتاه‌تر در مقایسه با تیمارهای IBA بود. بنابراین بدیهی است که ریزنمونه‌های ریشه‌دارشده تحت تیمارهای IBA در سازگاری و تطابق با شرایط گلخانه و هوای آزاد موفقیت بیشتری نشان دادند.

در آزمایش‌های قبلی نیز عنوان‌شده که فقدان اتصال آوندی مناسب و کارا در ریشه‌های تولیدشده از تیمارهای حاوی NAA عامل عدم موفقیت و زنده‌مانی این ریزنمونه‌ها در بخش سازگاری بوده است، در مقابل تولید ریشه‌های قوی و طویل در گیاهچه‌های ریشه‌دارشده تحت تیمارهای IBA، عامل میزان زنده‌مانی بالا بعد از انتقال به خاک بوده است (Yepes and Aldwinckle, 1994; Boudabous et al., 2010; Gerdakaneh et al., 2019).

نتیجه‌گیری

تعداد و طول ریزشاخه تولیدشده در پرآوری ریزنمونه‌های سیب گوشت سرخ، به‌طور معنی‌داری تحت تأثیر سطوح مختلف غلظت تنظیم‌کننده‌های رشد BAP، GA3 و اثر متقابل آن‌ها قرار داشت، اما وزن تر و وزن خشک ریزنمونه‌ها فقط به‌طور معنی‌داری ($P < ۰/۰۱$) تحت تأثیر سطوح مختلف غلظت BAP قرار گرفت و

سطوح مختلف GA3 و اثر متقابل BAP و GA3 فاقد تأثیر معنی‌دار بر این صفات بود. بیشترین تعداد ریزشاخه (۷/۹۹۷ ریزشاخه/ ریزنمونه/ ۸ هفته) از ریزنمونه‌های تیمار T8 (BAP 4µm, GA3 0µm) به‌دست‌آمد و به‌طورکلی این تیمار با ایجاد بالاترین نرخ تولید ریزشاخه، تعداد برگ و وزن تر و خشک در ریزنمونه‌های مورد بررسی، بهترین ترکیب تنظیم‌کننده رشدی برای پرآوری سیب گوشت سرخ بود. تعداد و طول ریشه‌های تولیدشده در ریزنمونه‌ها نیز به‌صورت معنی‌داری تحت تأثیر غلظت‌های مختلف تنظیم‌کننده‌های رشد IBA و NAA قرار داشت. مقایسه میانگین فاکتورهای مورد بررسی نشان داد بیشترین درصد ریشه‌زایی (۸۵/۲ درصد) در ریزنمونه‌های تیمار حاوی سه میکرو مولار IBA مشاهده شده‌است، به‌علاوه ریزنمونه‌های ریشه‌دارشده در این تیمار با توجه به داشتن ریشه‌های قوی و طویل، در بخش سازگاری هم موفقیت بیشتری (۱۰۰ درصد) نسبت به ریزنمونه‌های ریشه‌دارشده در محیط کشت‌های حاوی NAA (۴۰ درصد) داشتند.

بنابراین به‌طورکلی بر اساس نتایج این پژوهش، تکثیر سیب گوشت سرخ در محیط کشت MS حاوی چهار میکرومولار BAP و ریشه‌دارکردن ریزنمونه‌ها در محیط کشت MS ۱/۲ و فاقد ویتامین، حاوی ۳ میکرومولار IBA، مسیر مناسبی جهت ریزازدیادی موفق سیب گوشت سرخ است.

سپاس‌گزاری

مؤلفان بر خود لازم می‌دانند از زحمات بی‌شائبه جناب مهندس شهریار حسامی که در مراحل اجرای این تحقیق ما را صمیمانه یاری نمودند، کمال تشکر و قدردانی را داشته باشند.

References

Ballester, A., Vidal, N., Vieitez, A. M., Niemi, K. and Scagel, C. (2009). Developmental stages during *in vitro* rooting of hardwood trees from material with juvenile and mature characteristics: Adventitious root formation of forest trees and horticultural plants from genes to applications. *Research Singpost, Kerala, 1*, 277-299.

Boudabous, M., Mars, M., Marzougui, N. and Ferchichi, A. (2010). Micropropagation of apple (*Malus domestica* L. cultivar Douce de Djerba) through in vitro culture of axillary buds. *Acta Botanica Gallica, 157*(3), 513-524.

Brown, S. (2012). Fruit breeding, handbook of plant breeding. In M. L. Badenes and D. H. Byrne, (Eds), *Fruit breeding* (pp. 329-367). Berlin, Germany: Springer Science & Business Media.

Ciccotti, A. M., Bisognin, C., Battocletti, I., Salvadori, A., Herdemertens, M., Wallbraun, M. and Jarausch, W. (2009). Micropropagation of malus sieboldii hybrids resistant to apple proliferation disease. *Acta Horticulturae, 839*(1), 35-41.

Cornille, A., Gladieux, P., Smulders, M. J., Roldan-Ruiz, I., Laurens, F., Le Cam, B., Nersesyan, A., Clavel, J., Olonova, M., Feugey, L. and Gabrielyan, I. (2012). New insight into the history of domesticated apple: Secondary contribution of the European wild apple to the genome of cultivated varieties. *PLoS genetics, 8*(5), e1002703.

De Klerk, G. J. (2002). Rooting of microcuttings: Theory and practice. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant, 38*(5), 415-422.

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

Etherton, P. M., Hecker, K. D., Bonanome, A., Coval, S. M., Binkoski, A. E., Hilpert, K. F., Griel, A. E. and Etherton, T. D. (2002). Bioactive compounds in foods: Their role in the prevention of

cardiovascular disease and cancer. *The American Journal of Medicine, 113*(9), 71-88.

George, E. F., Hall, M. A. and De Klerk, G. J. (Eds.) (2008). *Plant propagation by tissue culture.* Dordrecht: Springer.

Gerdakaneh, M., Badakhshan, H., Mohamadi, M., and Arji, I. (2019). Effect of Different Media and Growth Regulators on Micropropagation of GF677. *Plant Productions, 43*(2), 241-254. [In Farsi]

Han, H., Zhang, S. and Sun, X. (2009). A review on the molecular mechanism of plants rooting modulated by auxin. *African Journal of Biotechnology, 8*(3), 348-353.

Hunt, M. A., Trueman, S. J. and Rasmussen, A. (2011). Indole-3-butyric acid accelerates adventitious root formation and impedes shoot growth of *Pinus elliottii* var. elliottii × *P. caribaea* var. hondurensis cuttings. *New Forests, 41*(3), 349-360.

Jafarkhani Kermani, M., Hosseini, Z. S. and Habashi, A. A. (2008). A refined tissue culture medium for in vitro proliferation of apple rootstocks. *Acta Horticulturae, 829*, 313-318.

Jamshidi, S., Yadollahi, A., Ahmadi, H., Arab, M. M. and Eftekhari, M. (2016). Predicting *in vitro* culture medium macro-nutrients composition for pear rootstocks using regression analysis and neural network models. *Frontiers in Plant Science, 7*, 1-12.

Luckman, G. A. and Menary, R. C. (2002). Increased root initiation in cuttings of Eucalyptus nitens by delayed auxin application. *Plant Growth Regulation, 38*(1), 31-35.

Magyar-Tabori, K., Dobranszky, J., Jambor-Benczur, E., Lazanyi, J., Szalai, J. and Ferenczy, A. (2002). Effects of indole-3-butyric acid levels and activated charcoal on rooting of *in vitro* shoots of apple rootstocks. *International Journal of Horticultural Science, 8*(3-4), 25-28.

Mazza, G. and Velioglu, Y. S. (1992). Anthocyanins and other phenolic compounds in fruits of red-flesh apples. *Food Chemistry, 43*(2), 113-117.

Modgil, M., Sharma, D. R. and Thakur, M. (2009). Commercially feasible protocol for rooting and acclimatization of micropropagated apple rootstocks. *Acta Horticulturae, 839*(1), 209-215.

Mohamadzadeh Moghadam, N. and Hamidi, H. (2017). Investigating the effects of medium, sterilization and hormonal treatment on micropropagation of some apple (*Mallus Domestic*a Borkh.) rootstocks. *Plant Productions, 40*(1), 41-54. [In Farsi]

Murashige, T. and Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum, 15*(3), 473-497.

Naija, S., Elloumi, N., Jbir, N., Ammar, S. and Kevers, C. (2008). Anatomical and biochemical changes during adventitious rooting of apple rootstocks MM 106 cultured *in vitro*. *Comptes Rendus Biologies, 331*(7), 518-525.

Saito, A. and Suzuki, M. (1999). Plant regeneration from meristem-derived callus protoplasts of apple (*Malus domestica* cv. Fuji'). *Plant Cell Reports, 18*(7-8), 549-553.

Soni, M., Thakur, M. and Modgil, M. (2011). *In vitro* multiplication of Merton I. 793-An apple rootstock suitable for replantation. *Indian Journal of Biotechnology, 10*(3), 362-368.

Tang, H., Luo, Y. and Liu, C. (2008). Plant regeneration from *in vitro* leaves of four commercial *Pyrus* species. *Plant Soil and Environment, 54*(4), 140-148.

Xu, J., Wang, Y., Zhang, Y. and Chai, T. (2008). Rapid *in vitro* multiplication and ex vitro rooting of *Malus zumi* (Matsumura) rehd. *Acta Physiologiae Plantarum, 30*(1), 129-132.

Yepes, L. M. and Aldwinckle, H. S. (1994). Micropropagation of thirteen *Malus* cultivars and rootstocks, and effect of antibiotics on proliferation. *Plant Growth Regulation, 15*(1), 55-67.