نشریه پژوهش‌های تولید گیاهی
جلد بیست و پنجم، شماره دوم، ۱۳۹۷
http://jopp.gau.ac.ir
DOI: 10.22069/jopp.2018.13456.2213

بهینه‌سازی شرایط کشت بافت جهت ریزازدیادی پایه نیمه‌پاکوتاه سیب M_7

*عاطفه مشاری نصیرکندی[1]، بهمن حسینی[2]، علیرضا فرخزاد[3] و لطفعلی ناصری[2]

[1]دانش‌آموخته کارشناسی‌ارشد بیوتکنولوژی و ژنتیک ملکولی محصولات باغبانی، دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه ارومیه،
[2]دانشیار گروه علوم باغبانی، دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه ارومیه، [3]استادیار گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه

تاریخ دریافت: ۹۶/۰۳/۲۱ ؛ تاریخ پذیرش: ۹۶/۰۹/۲۵

چکیده

سابقه و هدف: فن‌آوری کشت بافت گیاهی بیش‌تر برای تکثیر گیاهان در سطح وسیع استفاده می‌شود. این فن‌آوری تجاری بر پایه ریزازدیادی است. ریزازدیادی، باززایی درون‌شیشه‌ای گیاهان از اندام‌ها، بافت‌ها، سلول‌ها و تکثیر شبیه به اصل یک ژنوتیپ انتخابی یا استفاده از روش کشت درون‌شیشه‌ای می‌باشد. گیاهان اصلاحی تولید شده به روش کشت بافت، قوی‌تر از گیاهان به‌دست آمده از روش بذری می‌باشند. بنابراین ازدیاد پایه سیب M_7 به روش کشت بافت، اغلب تولید گیاهان قوی با رشد سریع می‌کند. این پژوهش با هدف بهینه‌سازی شرایط ازدیاد درون‌شیشه‌ای پایه سیب M_7 و بررسی اثر محیط‌های کشت پایه، تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی مختلف بر پرآوری و ریشه‌زایی پایه‌ها انجام گردید.

مواد و روش‌ها: پژوهش حاضر با هدف بهینه‌سازی شرایط ازدیاد درون‌شیشه‌ای پایه نیمه‌پاکوتاه کننده سیب M_7 در قالب سه آزمایش جداگانه انجام شد. در آزمایش اول، اثر پنج نوع محیط کشت پایه، شامل محیط کشت پایه MS، 1/5MS، 2MS، WPM و B_5، بر تعداد ریزشاخه و طول ریزشاخه بررسی گردید. در آزمایش دوم اثر دو نوع تنظیم‌کننده رشد گیاهی BAP و TDZ در غلظت‌های صفر (شاهد)، ۲/۲، ٤/٤ و ۸/۸ میکرومولار بر صفات رویشی تعداد ریزشاخه، طول ریزشاخه، تعداد گره و طول میانگره بررسی گردید. در آزمایش سوم، اثر دو نوع محیط کشت پایه MS و ½MS تکمیل شده با دو نوع تنظیم‌کننده رشد گیاهی IBA و NAA در غلظت‌های صفر (شاهد)، ۱/۵، ۳ و ٤/٥ میلی‌گرم در لیتر بر صفات تعداد و طول ریشه در سه و چهار روز نگهداری در تاریکی بررسی گردید. سازگاری پایه‌ها در بسترهای کشت پرلیت درشت، پرلیت ریز، پرلیت همراه با پیت‌ماس و پیت‌ماس بررسی گردید.

یافته‌ها: بر اساس نتایج به‌دست آمده از آزمایش اول، حداکثر میزان پرآوری (۱۵/٦٦ ریزشاخه در هر ریزنمونه) در محیط B_5 مشاهده گردید. در آزمایش دوم، BAP در افزایش صفات میزان پرآوری، تعداد گره و کاهش طول میانگره مؤثرتر از TDZ بود. حداکثر میزان پرآوری (۱٦/٥٥ ریزشاخه به‌ازای هر ریزنمونه) در غلظت ۲/۲ میکرومولار BAP مشاهده گردید. در آزمایش سوم، بیش‌ترین تعداد ریشه (با میانگین ۱۱/۱۰ ریشه به‌ازای هر ریزنمونه) در محیط کشت ½MS تکمیل شده با ۳ میلی‌گرم بر لیتر NAA مشاهده گردید. نتایج مربوط به بررسی اثر نوع بستر کشت بر سازگاری پایه سیب M_7 نشان داد که بستر کشت پیت‌ماس، مطلوب‌ترین نتیجه را در مقایسه با سایر تیمارها در مرحله سازگاری نشان داد.

* مسئول مکاتبه: ati.moshari@yahoo.com

نتیجه‌گیری: محیط کشت B_5 حاوی ۱ میلی‌گرم بر لیتر بنزیل‌آدنین مطلوب‌ترین و بهترین محیط برای پرآوری سیب M_7 تعیین گردید. BAP تأثیر بیش‌تری نسبت به TDZ بر صفات باززایی نشان داد. تیمار سه روز تاریکی نسبت به چهار روز تاریکی نتایج بهتری نشان داد. بر اساس نتایج آزمایش سوم، بهترین دوره تاریکی، نوع محیط کشت، نوع تنظیم‌کننده رشد گیاهی و غلظت تنظیم‌کننده رشد گیاهی به‌ترتیب شامل سه روز تاریکی، محیط کشت ½MS، تنظیم‌کننده رشد NAA (۳ میلی‌گرم بر لیتر) به‌دست آمد.

واژه‌های کلیدی: ازدیاد درون‌شیشه‌ای، بهینه‌سازی، پایه رویشی، سازگاری

مقدمه

سیب یکی از میوه‌های دانه‌دار و متعلق به تیره گل‌سرخیان[1] و زیر تیره پوموئیده[2] است. پایه‌های پاکوتاه از طریق کاهش رشد شاخه‌ها و در نتیجه، ایجاد یک درخت کوچک‌تر، هزینه تنک‌کردن، تربیت، برداشت و هرس را در مقایسه با درختان بزرگ کم‌تر می‌نمایند. کنترل قدرت رشد رویشی به کمک روش‌های هرس و تربیت، به‌ویژه در قسمت‌های فوقانی درختان امکان‌پذیر بوده و این عمل در درختان پیوند شده روی پایه‌های پاکوتاه‌کننده خیلی آسان‌تر از درختان بزرگ‌تر پیوندشده بر روی پایه‌های قوی می‌باشد. پایه سیب M_7 درختانی با اندازه ۵۵ تا ٦٥ درصد درختان بذری سیب تولید می‌کند. در ایالات متحده طی ۵۰ سال اخیر معرفی پایه‌ها، پشتیبان صنعت میوه‌کاری بوده است. پایه M_7 هنوز هم معمول‌ترین پایه مورد استفاده بوده و متحمل به اکثر بیماری‌ها (مقاوم به آتشک، مقاوم به پوسیدگی طوقه و نیمه‌مقاوم به شته مومی) و سازگارترین پایه به انواع وسیعی از خاک‌ها و اقلیم‌ها می‌باشد. عدم نیاز به قیم و حساسیت کم به حاصلخیزی خاک سبب شده این نوع پایه انتخاب بهتری برای اغلب مناطق کشور با خاک‌های نسبتاً آهکی و نه‌چندان حاصلخیز تلقی شود. پایه سیب M_7 به رطوبت زیاد مقاوم است و در دامنه وسیعی از دمای خاک رشد می‌کند. این پایه در زمین‌های دارای بافت سنگین یا رسی و زهکش پایین رشد می‌کند. ازدیاد این پایه در محیط بیرون دشوار می‌باشد. پایه M_7 به روش کشت بافت به سهولت ازدیاد می‌شود. از این‌رو، یک پایه مناسب برای خزانه‌کاران و باغ‌داران محسوب می‌شود. از مهم‌ترین عیب پایه M_7 می‌توان به تمایل آن برای تولید پاجوش اشاره نمود (۲۸).

ریزازدیادی[3]، روشی سریع برای تولید انبوه گیاهان در دوره‌های زمانی کوتاه‌مدت و صرف‌نظر از نوع فصل می‌باشد (۲۳). اهمیت به‌دست آوردن گیاهان سالم و عاری از ویروس، نیاز بازار به داشتن گیاهان یکنواخت، صرفه‌جویی در وقت و هزینه، از جمله مواردی است که سبب گسترش استفاده از روش کشت بافت در تکثیر گیاهان شده است (۲۱). برای ازدیاد موفق و نگهداری درون‌شیشه، انتخاب محیط کشت صحیح یکی از مهم‌ترین گام‌ها در توسعه یک دستورالعمل موفق است. توسعه یک محیط کشت مناسب برای یک محصول ویژه می‌تواند کاملاً پیچیده باشد زیرا پاسخ به محیط کشت، اغلب وابسته به ژنوتیپ می‌باشد (۱۰ و ۲۷). شاخه‌زایی پایه سیب M_7 با کشت نوک ریزشاخه به‌عنوان ریزنمونه اولیه روی محیط کشت MS تغییریافته (محیط کشت نیم غلظت MS که به آن ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BA اضافه شده بود) تسریع و تحریک گردید (۳۰).

1- Rosaceae
2- Pomoideae
3- Micropropagation

در پایه‌های سیب (M_9، M_{27} و MM_{106})، سرعت رشد، اساساً بستگی به نوع تنظیم‌کننده رشد گیاهی به‌ویژه بنزیل‌آدنین (BA)، غلظت نمک‌ها و ژنوتیپ دارد (۲). در یک بررسی که برای تعیین محیط کشت مناسب جهت رشد سیب‌های پاکوتاه انجام شد، سه نژاد از سیب McIntosh با عادت‌های رشد از نوع استاندارد تا خیلی پاکوتاه انتخاب شده و از نوک مریستم آن‌ها به‌عنوان ریزنمونه استفاده شد که در محیط کشت MS تکمیل‌شده با غلظت‌های مختلف BA کشت شدند و همه نژادها در غلظت ٦-۳ میکرومول BA بیش‌ترین میزان پرآوری ریزشاخه و افزایش در وزن را نشان دادند، با این‌حال تحمل غلظت‌های بیش از حد مطلوب این BA، بستگی به عادت رشد داشت. برای مثال در غلظت ۱۰ میکرومول در لیتر میزان تولید ریزشاخه برای انواع پاکوتاه، متوسط و استاندارد به‌ترتیب ۹۰ درصد، ۲۰ درصد و ۰ بود (۱۸). در پژوهشی توسط دئونوفری و مورینی (۲۰۰۵)، با هدف باززایی ریزنمونه‌های به (*Cydonia oblonga*) با استفاده از سیتوکینین‌های مختلف، BAP کارایی کم‌تری در مقایسه با TDZ به‌منظور تحریک تولید جوانه‌های نابجا نشان داد (٦). افزایش میزان پرآوری ریزشاخه به‌ازای هر واحد افزایش در غلظت BAP را می‌توان از طریق نقش سیتوکینین‌ها در تحریک تقسیم سلولی و رشد جوانه‌های جانبی توجیه کرد. همچنین پرآوری ریزشاخه‌ها در محیط کشت غنی از سیتوکینین‌ها، اغلب نتیجه رهایی جوانه‌های جانبی از تأثیر غالبیت انتهایی است (۳۲).

پژوهشگران گزارش کردند که در شرایط درون‌شیشه‌ای، افزایش غلظت سیتوکینین، باعث افزایش شاخه‌زایی در ارقام مختلف گلابی می‌شود (۱۵). در اکثر پژوهش‌های انجام شده، بیش‌ترین میزان پرآوری شاخه در پایه‌های گلابی در غلظت‌های ۱ و ۲ میلی‌گرم در لیتر بنزیل‌آدنین یا بنزیل‌آمینوپورین گزارش شده است (۱۷). بیش‌ترین میزان پرآوری برای پایه گلابی پیرودوآرف، در محیط QL تغییر یافته به‌میزان ۳/۳ شاخه‌چه به‌ازای ریزنمونه و برای پایه OH×F87 در محیط QL به‌میزان ۵/۳ شاخه‌چه به‌ازای ریزنمونه گزارش گردید و پس از آن محیط‌های MS، DKW و MS تغییریافته در رتبه‌های بعدی قرار گرفتند (۲۵). افزودن ترکیبات $CaCl_2$، $MgSO_4$ و KH_2PO_4 به محیط کشت موراشیگ و اسکوگ (MS) باعث بهبود رشد شاخه‌ها گردید و بهترین کیفیت در گلابی پیرودوآرف در بیش‌ترین غلظت ترکیبات $CaCl_2$، $MgSO_4$ و KH_2PO_4 (۲/۵MS) مشاهده گردید. ترکیبات $CaCl_2$، $MgSO_4$ و KH_2PO_4 (۲/۵MS) بر بیش‌تر پاسخ‌های رشدی گیاهان اثر مثبت می‌گذارند (۲۹).

خدایی‌چگنی و همکاران (۲۰۱۱)، در آزمایشی گزارش نمودند بهترین شرایط ریشه‌زایی دورگه گلابی به دو نحو تیمار طولانی‌مدت و کوتاه‌مدت غلظت‌های IBA ارزیابی شد که نتایج نشان‌دهنده برتری تیمار کوتاه‌مدت نسبت به تیمار بلندمدت بود و بیش‌ترین درصد ریشه‌زایی در غلظت ۲ میلی‌گرم در لیتر IBA ایجاد شد (۱۷).

تکثیر، پرآوری و ریشه‌زایی ریزشاخه در کشت درون‌شیشه‌ای تحت‌تأثیر عوامل زیادی از جمله گونه، ژنوتیپ، رقم، محیط کشت، نمک‌های معدنی، مواد آلی، کربوهیدرات‌ها، تنظیم‌کننده‌های رشد و شرایط محیطی قرار می‌گیرد (۹). وجود ریشه فرعی در گیاهان حاصل از کشت بافت می‌تواند به‌طور چشمگیری به استقرار و سازگاری آن‌ها کمک کند

همچنین ریشه‌زایی توسط عوامل مختلفی مانند وجود تنظیم‌کننده‌های رشد در محیط کشت، ترکیب نمک‌های پایه، ژنوتیپ و شرایط کشت کنترل می‌شود (۲٤). اکثر گیاهان برای باززایی مؤثر ریشه به اکسین نیازمند هستند. برای ریشه‌دهی گیاهان چوبی نسبت به گیاهان علفی، به غلظت بیش‌تر اکسین نیاز است که بهترین اکسین‌های مؤثر IBA در غلظت‌های بین ۳-۰/۵ میلی‌گرم در لیتر و NAA در غلظت‌های بین ۱-۰/۵ میلی‌گرم در لیتر هستند (۷). در بسیاری از جنس‌های گیاهی، ریشه‌زایی شاخساره‌های ریز ازدیاد شده می‌تواند با حذف سیتوکینین‌ها از ترکیب محیط کشت صورت گیرد. در گلابی و دیگر گونه‌های چوبی، بیش‌تر از این‌که این روش مؤثر واقع شود، تیمار با اکسین‌ها مؤفقیت‌آمیز بوده است و در بین اکسین‌ها، IBA همواره یک تیمار مؤثر برای ریشه‌زایی ریزشاخه‌های درون‌شیشه‌ای گزارش شده است (۵).

در پژوهشی، ریشه‌زایی درون‌شیشه‌ای پایه سیب M_9 مورد بررسی قرار گرفت. حداکثر سرعت تکثیر ریزشاخه و ریشه‌زایی با غلظت‌های ۲ تا ٤ میلی‌گرم در لیتر BAP و ۰/۵-۰/۱ میلی‌گرم در لیتر IBA به‌دست آمد (۱۳). تعداد ریشه نابجای تولیدی به‌ازای ریزشاخه در پایه پیرودوآرف در چهار هفته روی محیط MS فاقد تنظیم‌کننده رشد و پس از شش هفته روی محیط حاوی ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر IBA مشاهده شد. پایه‌های گلابی در محیط کشت MS همراه با ۱ میلی‌گرم در لیتر IBA از نظر صفات تعداد ریشه و طول ریشه بهترین پاسخ را نشان دادند (۲۵). پایه‌های گلابی در محیط کشت MS همراه با ۱ میلی‌گرم در لیتر IBA از نظر صفات تعداد ریشه و طول ریشه بهترین پاسخ را نشان دادند (۱). هپاکسوی و آکسوی (۲۰۰٦)، برای ریشه‌زایی درون‌شیشه انجیر رقم ساری لوپ غلظت‌های متفاوتی از NAA و IBA را به‌کار برده و نشان دادند که از بین غلظت‌های ۰، ۱/۲، ۲/۵ و ۵ میکرومولار، غلظت ۲/۵ میکرومولار IBA از بقیه مؤثرتر است (۱۱). در پایه‌های رویشی تترا، نماگارد و GF_{677} بیش‌ترین تعداد ریشه و درصد ریشه‌زایی در محیط MS تغییریافته با ۱ میلی‌گرم در لیتر اسیدنفتالین استیک حاصل شد (۳۳).

هدف از انجام پژوهش حاضر، بهینه‌سازی پرآوری و تعیین مناسب‌ترین محیط کشت و تنظیم‌کننده رشد گیاهی برای پرآوری و ریشه‌زایی درون‌شیشه‌ای پایه نیمه‌پاکوتاه سیب M_7 بود.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی اولیه این آزمایش ریزشاخه‌های پایه سیب M_7 که از شرکت اروم زیست‌تاک تهیه گردید. این نمونه‌ها پس از جداسازی از محیط کشت و جدا کردن برگ‌ها برای کشت در محیط کشت آماده شدند. به‌منظور بررسی شرایط بهینه تکثیر درون‌شیشه این پایه، سه آزمایش مجزا انجام و به‌ترتیب اثر محیط‌های کشت، نوع و غلظت تنظیم‌کننده رشد گیاهی و شرایط ریشه‌زایی بر پایه سیب M_7 بررسی گردید. تجزیه و تحلیل داده‌ها به‌وسیله نرم‌افزار SAS صورت گرفت. برای رسم نمودارها از نرم‌افزار اکسل نسخه ۲۰۰۷ استفاده گردید. مقایسه میانگین داده‌ها به‌وسیله آزمون چنددامنه‌ای دانکن در سطح احتمال یک درصد و پنج درصد صورت گرفت.

آزمایش اول

بررسی اثر نوع محیط کشت پایه بر ریزازدیادی پایه سیب M_7: در این آزمایش اثر پنج نوع محیط

کشت پایه شامل MS[1]، 1/5MS (یک‌ونیم برابر سه نمک $CaCl_2$، $MgSO_4$ و KH_2PO_4)، 2MS (دو برابر سه نمک $CaCl_2$، $MgSO_4$ و KH_2PO_4)، WPM[2] و B_5[3] بر میانگین تعداد ریزشاخه و میانگین طول ریزشاخه پایه نیمه‌پاکوتاه‌کننده سیب M_7 با هدف تعیین مطلوب‌ترین محیط کشت پایه برای آزمایش دوم بررسی گردید. آزمایش به‌صورت طرح آماری کاملاً تصادفی با سه تکرار و سه ریزنمونه در هر تکرار انجام گردید. در همه محیط‌های مورد استفاده از ۱ میلی‌گرم بر لیتر بنزیل‌آدنین استفاده گردید. نمونه‌ها در شرایط ۱۶ ساعت روشنایی و دمای شبانه‌روزی ۱±۲٤ درجه سانتی‌گراد نگهداری گردید. یادداشت‌برداری‌ها پس از چهار هفته و قبل از ورود ریزشاخه‌ها به مرحله پیری و چوبی شدن انجام گردید.

روش تهیه محیط کشت MS: محلول‌های ذخیره محیط کشت که شامل محلول ذخیره نیترات، سولفات، ترکیب فسفر، بر و مولیبدن (PBMo)، NaFeEDTA و هالوژن‌ها می‌باشد با غلظت ۵۰ برابر غلظت نهایی محیط کشت تهیه شدند و به مقدار ۲۰ میلی‌لیتر از هر محلول ذخیره برای تهیه ۱۰۰۰ میلی‌لیتر محیط کشت استفاده شدند.

محیط‌های کشت ۱/۵MS و ۲MS محیط‌های MS تغییریافته حاوی ترکیبات مختلف ($CaCl_2$، $MgSO_4$ و KH_2PO_4) می‌باشند که همانند محیط پایه MS تهیه می‌گردند.

تهیه کلات آهن NaFeEDTA: برای تهیه این محلول، ۰/٦۹۵ گرم $Fe.SO_4.7H_2O$ به همراه ۰/۹۳۰ گرم $NaEDTA.2H_2O$ در آب حل کرده و به حجم یک لیتر رسانده شد. محلول ذخیره NaFeEDTA باید در مقابل نور محافظت شود. بنابراین لازم بود پس از تهیه، در یک بطری تیره رنگ نگه‌داری شود (۲۲).

روش تهیه محیط کشت WPM: برای تهیه این محیط کشت، مقدار مورد نظر از هر ماده طبق جدول ۱ به‌طور مستقیم توزین گردید و با آب مقطر حل گردید و به حجم مورد نظر رسانده شد. برای تهیه موادی که حجم مورد نیاز آن‌ها خیلی‌کم می‌باشد و قابل اندازه‌گیری با ترازوی آزمایشگاه کشت بافت نمی‌باشد، میزان ۵۰ برابر غلظت مورد نیاز از این ترکیبات توزین گردیده و در مقداری آب مقطر حل نموده و سپس به حجم ۱۰۰۰ میلی‌لیتر رسانده شد. محلول تهیه شده با این روش ۵۰ برابر غلظت موردنظر می‌باشد. مقدار ۲۰ میلی‌لیتر از هر محلول ذخیره برای تهیه ۱۰۰۰ میلی‌لیتر محیط کشت استفاده شدند.

روش تهیه محیط کشت B5[4]: برای تهیه این محیط کشت، از محیط کشت آماده (شرکت دوچفا- هلند) استفاده شد و به مقدار ۳/۳۳۳ گرم از این محیط برای تهیه یک لیتر توزین گردیده و با مقداری آب مقطر دو بار تقطیر حل گردیده و به حجم رسانده شد.

1- Murashige & Skooge (MS)
2- Woody Plant Medium (WPM)
3- Gamborg Medium (B5)
4- Gamborg Medium (B5)

جدول ۱- ترکیب محیط کشت‌های مختلف مورد استفاده (میلی‌گرم بر لیتر).

Table 1. Combination of different media used (mg/l).

McCown and Lioyd (WPM)	2x Murashige and Skoog	1/5x Murashige and Skoog	Murashige and Skoog	Chemical Materials
400	1650	1650	1650	NH_4NO_3
-	1900	1900	1900	KNO_3
96	880	660	440	$CaCl_2.2H_2O$
370	740	555	370	$MgSO_4.7H_2O$
170	340	255	170	KH_2PO_4
-	-	-	-	$(NH_4)_2SO_4$
556	-	-	-	$Ca_3(NO_3).4H_2O$
990	-	-	-	K_2SO_4
6.2	6.2	6.2	6.2	H_3BO_3
22.3	16.9	16.9	16.9	$MnSO_4.H_2O$
-	-	-	-	$MnSO_4.4H_2O$
8.6	8.6	8.6	8.6	$ZnSO_4.7H_2O$
-	0.83	0.83	0.83	KI
0.025	0.25	0.25	0.25	$Na_2MoO_4.2H_2O$
0.025	0.025	0.025	0.025	$CuSO_4.5H_2O$
-	-	-	-	$(Cl_2Hl_7ClN_4OS.HCl)$
-	-	-	-	$(NaH_2PO_4.H_2O)$
-	0.025	0.025	0.025	$CoCl_2.6H_2O$
27.8	27.8	27.8	27.8	$FeSO_4.7H_2O$
-	-	-	-	$(C_{10}H_{14}N_2Na_{208}.2H_2O)$
37.3	37.3	37.3	37.3	$Na_2EDTA(2H_2O)$
8000	8000	8000	8000	Agar
30000	30000	30000	30000	Sucrose
103.52	103.52	103.52	103.52	Vitamins

آزمایش دوم

بررسی اثر نوع و غلظت تنظیم‌کننده رشد گیاهی بر ریزازادیادی پایه سیب M_7: در این آزمایش از محیط کشت انتخابی و مطلوب (B5) به‌دست آمده از آزمایش اول و دو نوع تنظیم‌کننده رشد گیاهی ٦- بنزیل‌آمینوپورین[1] (BAP) و تیدیازورون[2] (TDZ) در چهار غلظت مختلف شامل صفر (شاهد)، ۲/۲، ٤/٤ و ۸/۸ میکرومولار استفاده گردید. آزمایش در قالب طرح آماری کاملاً تصادفی به‌صورت فاکتوریل با سه تکرار انجام گردید. شاخص‌های مورد بررسی در

1- 6-Benzylaminopurin
2- Thidiazuron

این آزمایش شامل، میانگین تعداد ریزشاخه، میانگین طول ریزشاخه، میانگین تعداد گره و میانگین طول میانگره بود. یادداشت‌برداری‌ها پس از چهار هفته انجام گردید.

آزمایش سوم

ارزیابی توان ریشه‌زایی: ریزشاخه‌های ازدیاد شده در محیط‌های کشت پایه MS و ½MS حاوی دو نوع تنظیم‌کننده رشد گیاهی اسیدایندول‌بوتیریک[1] (IBA) و اسیدنفتالین‌استیک[2] (NAA) در چهار غلظت صفر (شاهد)، ۱/۵، ۳ و ٤/٥ میلی‌گرم در لیتر استفاده گردید (۱۹ و ۳٦). آزمایش در قالب طرح آماری کاملاً تصادفی به‌صورت فاکتوریل (٤×۲×۲) با سه تکرار انجام گردید. برای این منظور ریزشاخه‌های پایه سیب M_7 در تیمارهای آزمایشی شامل MS و ½MS با غلظت‌های مختلف اسیدایندول‌بوتیریک و اسیدنفتالین‌استیک واکشت گردید. محیط کشت‌ها حاوی نمک‌های MS با ۳۰ گرم بر لیتر ساکارز و ٦ گرم آگار بود. ویتامین‌های محیط کشت شامل؛ تیامین، نیکوتینیک‌اسید و پیریدوکسین بود. اسیدیته همه محیط‌های کشت قبل از افزودن آگار در حد ٥/٧ تنظیم شد. همه ریزشاخه‌های مورد استفاده برای ریشه‌زائی به‌صورت جداگانه به‌مدت سه روز و چهار روز در محیط حاوی تنظیم‌کننده رشد گیاهی (محیط القاء) و در تاریکی قرار گرفتند (۳٦). سپس به محیط عاری از تنظیم‌کننده رشد گیاهی منتقل شدند. شاخص‌های مورد نظر شامل میانگین تعداد ریشه به‌ازای هر ریزشاخه و میانگین طول ریشه‌چه‌های هر ریزشاخه در محیط‌های مختلف بود. یادداشت‌برداری‌ها بر اساس شروع آغازش و رشد ریشه‌ها پس از گذشت چهار هفته انجام گردید.

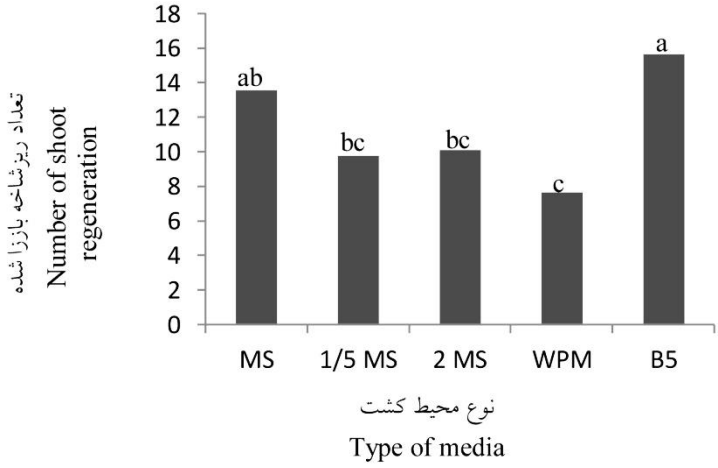
1- Indol-3-Butyric-Acid
2- Naphthalene acetic acid

به‌منظور بررسی اثر نوع محیط‌های خاکی بر استقرار مواد گیاهی در محیط خارج شیشه، شاخه‌چه‌های گیاهی ریشه‌دار شده به‌صورت جداگانه به محیط‌های خاکی حاوی پرلیت درشت، پرلیت ریز، پیت‌ماس همراه با پرلیت و پیت‌ماس منتقل شدند. به‌طوری‌که ابتدا درب شیشه‌های حاوی گیاهچه‌های ریشه‌دارشده در محیط کشت حاوی تنظیم‌کننده رشد پس از گذشت چهار هفته باز گردید. پس از خروج گیاهچه‌ها، آگار را از ریشه آن‌ها با دست جدا کرده و شستشوی ریشه‌ها با آب معمولی انجام گردید. پس از شستشوی ریشه‌ها، گیاهچه‌های ریشه‌دار شده به ظروف پلاستیکی حاوی چهار نوع محیط خاکی پرلیت درشت، پرلیت ریز، پیت‌ماس همراه با پرلیت و پیت‌ماس در اردیبهشت‌ماه ۱۳۹٥ منتقل گردید. آبیاری با فواصل چند روز انجام گردید. جهت جلوگیری از ایجاد پوسیدگی، سازگاری گیاهچه‌ها با باز کردن درب ظروف پلاستیکی و به‌تدریج انجام گردید. یادداشت‌برداری پس از گذشت حداقل چهار هفته و سازگاری کامل گیاهچه‌ها به شرایط معمولی گلخانه با رطوبت ۹۰ درصد و دمای متوسط ٢٤ درجه سانتی‌گراد، انجام گردید.

نتایج و بحث

بررسی اثر نوع محیط کشت پایه بر ریزازادیادی پایه سیب M_7: مقایسه تأثیر نوع محیط کشت پایه بر ریزازدیادی پایه سیب M_7 نشان داد که نوع و غلظت نمک‌ها در محیط کشت پایه تأثیر معنی‌داری در سطح احتمال پنج درصد بر تعداد ریزشاخه نشان داد. در حالی‌که نوع محیط کشت بر طول ریزشاخه تأثیر معنی‌داری نشان نداد. نتایج مقایسه میانگین داده‌ها نشان داد که بیش‌ترین تعداد ریزشاخه با میانگین ١٥/٦٦ ریزشاخه در هر تیمار در محیط کشت B_5 و کم‌ترین تعداد ریزشاخه با میانگین ٧/٦٦ ریزشاخه در

هر تیمار در محیط کشت WPM مشاهده گردید. بین محیط کشت‌های B_5 و MS و همچنین بین محیط کشت‌های MS، 1/5MS و 2MS تفاوت معنی‌دار مشاهده نگردید در حالی‌که بین محیط کشت‌های B_5 با 1/5MS، 2MS و WPM تفاوت معنی‌دار مشاهده گردید (شکل ۱). تنوع و تفاوت ارقام در طول ریزازدیادی در پژوهش‌های متعددی گزارش شده است (۲۶). این تفاوت می‌تواند به‌دلیل نیازهای مختلف هر رقم برای مواد معدنی، ویتامین‌ها، تنظیم‌کننده‌های رشد و سایر موارد باشد. در هر رقم، تفاوت در تحریک رشد ممکن است با اختلافات در محتوای عناصر پرمصرف و کم‌مصرف در ارتباط باشد (۳۰). بنابراین نتایج به‌دست آمده در یک محیط کشت خاص ممکن است با نتایج به‌دست آمده از ژنوتیپ‌های دیگر متفاوت باشد (۲۰). نتایج پژوهش‌های خلیلی (۲۰۱۱) در انگور رقم قزل اوزوم کشت‌شده در پنج نوع محیط کشت پایه MS، B_5، WPM، N&N و Knoudsen-C نشان داد که بیش‌ترین میانگین تعداد ریزشاخه در محیط کشت B_5 مشاهده گردید که با نتایج به‌دست آمده از این پژوهش مطابقت دارد (۱۶).



شکل ۱- نمودار مقایسه میانگین اثر نوع محیط کشت پایه بر تعداد ریزشاخه باززاشده در پایه سیب M_7. میانگین‌هایی که با حروف مختلف مشخص شده‌اند، اختلاف معنی‌داری با یکدیگر در سطح احتمال ۵ درصد دارند.

Figure 1. The chart of mean comparison of effect of type of basal media on number of shoot regeneration in M_7 apple rootstock. Means followed by different letters are significantly different at the 5% level of probability.

بررسی اثر نوع و غلظت تنظیم‌کننده رشد گیاهی بر ریزازدیادی پایه سیب M_7: مقایسه اثر نوع و غلظت تنظیم‌کننده رشد گیاهی و اثر متقابل آن‌ها نشان داد نوع و غلظت تنظیم‌کننده رشد گیاهی بر تعداد گره، تعداد میانگره، تعداد و طول ریزشاخه تأثیر معنی‌داری در سطح احتمال یک درصد و پنج درصد نشان نداد در حالی‌که اثر متقابل نوع و غلظت تنظیم‌کننده رشد گیاهی بر تعداد گره، تعداد میانگره و تعداد ریزشاخه تأثیر معنی‌داری در سطح احتمال پنج درصد نشان داد. نتایج مقایسه میانگین داده‌ها نشان داد که بیش‌ترین تعداد ریزشاخه با میانگین ۱۶/۵۵ ریزشاخه در هر تیمار در محیط کشت تکمیل‌شده با تنظیم‌کننده رشد گیاهی BAP در سطح ۲/۲ میکرومولار و کم‌ترین تعداد ریزشاخه با میانگین ۴/۷۷ ریزشاخه در هر تیمار در محیط کشت حاوی تنظیم‌کننده رشد گیاهی TDZ در سطح ۸/۸ میکرومولار مشاهده گردید (جدول ۲).

بین تیمار BAP در سطوح ۲/۲، ٤/٤ و ۸/۸ میکرومولار اختلاف معنی‌دار مشاهده نگردید. غلظت‌های بالاتر BAP تولید شاخه‌های رزت می‌نمایند و نیازمند سطوح پایین‌تر تنظیم‌کننده رشد گیاهی سیتوکینین برای ایجاد ریزشاخه‌هایی با تعداد و طول بیش‌تر گره و میانگره می‌باشد. مقایسه نتایج این پژوهش‌ها نشان می‌دهد. پاسخ TDZ به باززایی به نوع و ژنوتیپ گیاه وابسته می‌باشد که سطح تنظیم‌کننده‌های رشد درون‌زا در گیاه را تحت‌تاثیر قرار می‌دهد.

نتایج مقایسه میانگین داده‌ها نشان داد که بیش‌ترین تعداد گره با میانگین ۱۲/۵۵ در محیط کشت حاوی تنظیم‌کننده رشد گیاهی BAP در سطح ۲/۲ میکرومولار و کم‌ترین تعداد گره با میانگین ۷/۱۰ در محیط فاقد تنظیم‌کننده رشد گیاهی (شاهد) مشاهده گردید (جدول ۲). بین تیمار BAP در سطوح ۲/۲، ٤/٤ و ۸/۸ میکرومولار اختلاف معنی‌دار مشاهده نگردید. نتایج نشان می‌دهد که تولید گره بیش‌تر تحت‌تأثیر BAP است تا TDZ. کاربرد غلظت‌های زیاد BAP با تشدید رقابت بین جوانه‌های روی ریزنمونه موجب تأثیر بازدارندگی در رشد شاخساره‌ها و تشکیل گره می‌شود (۸). نتایج پژوهش‌های یومبی و همکاران (۲۰۰٦) در پرآوری ریزشاخه‌های موز (*Musa sapientum*) نشان داد که تیدیازورون تأثیر معنی‌داری در اندازه طول ریزشاخه، تعداد گره و میانگره نداشت که با نتایج به‌دست آمده از این پژوهش مطابقت نشان داد (۳۸).

جدول ۲- مقایسه میانگین اثر متقابل نوع و غلظت تنظیم‌کننده رشد گیاهی بر تعداد ریزشاخه و تعداد گره در پایه سیب M_7.

Table 2. Mean comparison of interactions of type and concentration (µM) of plant growth regulator on shoot number and node number in M_7 apple rootstock.

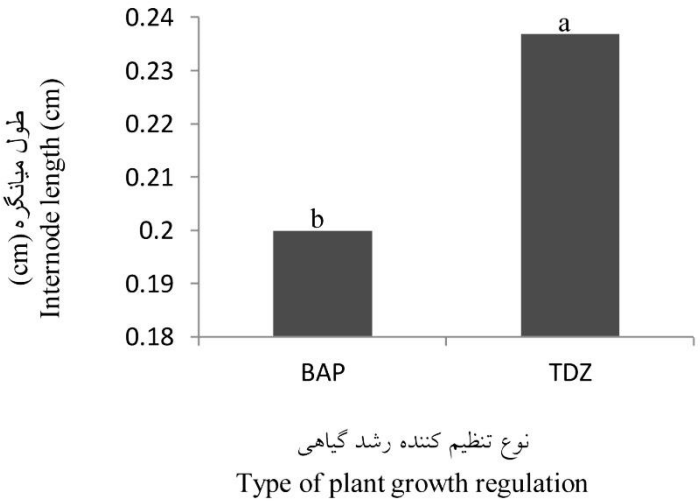
نوع و غلظت تنظیم‌کننده رشد گیاهی Type and concentration of plant growth regulator	تعداد ریزشاخه Shoot number	تعداد گره Node number
شاهد Control	6.77^{b}	7.10^{c}
BAP + 2.2 µM	16.55^{a}	12.55^{a}
BAP + 4.4 µM	14.44^{a}	10.77^{ab}
BAP + 8.8 µM	13.55^{a}	10.55^{ab}
TDZ + 2.2 µM	6.22^{b}	8^{c}
TDZ + 4.4 µM	5.33^{b}	9.32^{bc}
TDZ + 8.8 µM	4.77^{b}	9.33^{bc}

میانگین‌هایی که در هر ستون با حروف مختلف مشخص شده‌اند، اختلاف معنی‌داری با یکدیگر در سطح احتمال ۵ درصد دارند.

Means followed by different letters in each column are significantly different at the 5% level of probability.

مقایسه اثر نوع و غلظت تنظیم‌کننده رشد گیاهی و اثر متقابل آن‌ها نشان داد نوع تنظیم‌کننده رشد گیاهی بر طول میانگره تأثیر معنی‌داری در سطح احتمال پنج درصد نشان داد در حالی‌که غلظت تنظیم‌کننده رشد گیاهی و اثر متقابل نوع و غلظت تنظیم‌کننده رشد گیاهی بر طول ریزشاخه تأثیر معنی‌داری نشان نداد. نتایج مقایسه میانگین داده‌ها نشان داد که بیش‌ترین طول میانگره با میانگین ۰/۲۳ سانتی‌متر در محیط کشت حاوی تنظیم‌کننده رشد گیاهی TDZ و کم‌ترین طول میانگره با میانگین ۰/۲ سانتی‌متر در محیط کشت حاوی تنظیم‌کننده رشد گیاهی BAP مشاهده گردید (شکل ۲). مطالعات نشان داده است که با افزایش غلظت BAP اکثر نوساقه‌ها رشد ضعیف همراه با زردشدگی و خشکیدگی انتهایی را نشان داده که

می‌تواند به‌دلیل افزایش بیش از حد تقسیم سلولی و ایجاد تنش باشد. تنظیم‌کننده رشد گیاهی BAP از جمله تنظیم‌کننده‌های محرک رشد و تکثیر شاخه بوده و در غلظت‌های نسبتاً بالای این تنظیم‌کننده رشد، رشد شاخه‌های جانبی به‌دلیل ذخیره شدن این تنظیم‌کننده رشد در جوانه‌های جانبی انجام می‌گیرد. غلظت‌های بالاتر سیتوکینین باعث شیشه‌ای شدن گیاهچه‌ها و تولید شاخه‌های کوتاه‌تر و دارای حالت جارویی می‌شود. همچنین غلظت‌های بالاتر تولید شاخه‌های رزت می‌نمایند و نیازمند سطوح پایین‌تر سیتوکینین برای ایجاد ریزشاخه‌هایی با طول بیش‌تر می‌باشد (۳۵). افزودن تیدیازورون به محیط کشت، رشد ریزشاخه‌ها و تعداد گره و میانگره را کاهش می‌دهد که با کاهش تعداد گره و میانگره، طول میانگره افزایش می‌یابد (۳٤). نتایج پژوهش‌های خدایی چگنی و همکاران (۲۰۱۱) در پایه‌های هم‌گروه گلابی OH×F333 و OH×F69 نشان داد که بیش‌ترین طول میانگره در غلظت ۱ میلی‌گرم در لیتر BAP مشاهده گردید که با نتایج به‌دست آمده از پژوهش حاضر مطابقت نشان نداد (۱۷).



شکل ۲- نمودار مقایسه میانگین اثر نوع تنظیم‌کننده رشد گیاهی بر طول میانگره در پایه سیب M_7. میانگین‌هایی که با حروف مختلف مشخص شده‌اند، اختلاف معنی‌داری با یکدیگر در سطح احتمال ۵ درصد دارند.

Figure 2. The chart of mean comparison of effect of type of plant growth regulator on internode length in M_7 apple rootstock. Means followed by different letters are significantly different at the 5% level of probability.

ارزیابی توان ریشه‌زایی: مقایسه اثر نوع محیط کشت، نوع و غلظت تنظیم‌کننده رشد گیاهی و اثر متقابل آن‌ها نشان داد که این عوامل تأثیر معنی‌داری در سطح احتمال یک درصد بر تعداد ریشه در سه روز تاریکی و طول ریشه در چهار روز تاریکی دارند. در حالی‌که اثر نوع محیط کشت پایه، نوع و غلظت تنظیم‌کننده رشد گیاهی تأثیر معنی‌داری در سطح احتمال یک درصد و پنج درصد بر تعداد ریشه در سه روز تاریکی و طول ریشه در چهار روز تاریکی نشان نداد. نتایج مقایسه میانگین داده‌ها نشان داد که در سه روز تاریکی بیش‌ترین تعداد ریشه با میانگین ۱۱/۱۰ ریشه در هر تیمار در محیط کشت ½MS حاوی تنظیم‌کننده رشد گیاهی NAA در سطح ۳ میلی‌گرم در لیتر و کم‌ترین تعداد ریشه با میانگین ۰/۵۵ ریشه در هر تیمار در محیط کشت MS فاقد تنظیم‌کننده رشد گیاهی (شاهد) مشاهده گردید (جدول ۳). در

محیط‌های کشت ½MS عناصر معدنی به نصف کاهش می‌یابد که تأمین مواد غذایی را تحت‌تأثیر قرار می‌دهد. تشکیل ریشه‌های نابجا مرحله کلیدی برای ازدیاد رویشی است که تشکیل آن توسط ژنتیک، شرایط محیطی و عوامل داخلی تنظیم می‌شود (۳۱).

نتایج مقایسه میانگین داده‌ها نشان داد که در چهار روز تاریکی بیش‌ترین طول ریشه با میانگین ۳/۸۸ سانتی‌متر در محیط کشت MS حاوی تنظیم‌کننده رشد گیاهی NAA در سطح ۳ میلی‌گرم در لیتر و کم‌ترین طول ریشه با میانگین ۰/۹۲ سانتی‌متر در محیط MS حاوی تنظیم‌کننده رشد گیاهی IBA در سطح ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر مشاهده گردید (جدول ۳). به‌نظر می‌رسد این پایه نسبت به غلظت نمک‌ها در محیط کشت MS پایداری بیش‌تری از خود نشان می‌دهد. ریشه‌ها به عناصر غذایی کافی برای رشد نیاز دارند که به این دلیل محیط کشت ½MS نمی‌تواند مواد غذایی کافی برای طویل شدن ریشه در اختیار ریزنمونه‌ها قرار دهد. استفاده از تنظیم‌کننده رشد گیاهی NAA میزان تشکیل کالوس را به‌میزان قابل‌توجهی کاهش داد. تشکیل کالوس به نوبه خود می‌تواند باعث کاهش جذب مواد غذایی و آب و نهایت منتج به کاهش رشد شود. آب در تقسیم سلولی نقش اساسی دارد، ولی کالوس از جذب آب و مواد غذایی جلوگیری می‌کند. غلظت بیش‌تر از ۳ میلی‌گرم در لیتر NAA و غلظت‌های مختلفی از IBA، باعث افزایش تشکیل کالوس گردید. ریزنمونه‌ها برای پاسخ به علایم و نشانه‌های ارگانوژنیک، نیاز به نوع و غلظت مناسبی از اکسین دارند (۸).

جدول ۳- مقایسه میانگین اثر متقابل نوع محیط کشت پایه، نوع و غلظت تنظیم‌کننده رشد گیاهی بر تعداد و طول ریشه در پایه سیب M_7.

Table 3. Mean comparison of interactions of type of basal media, type and concentration (mg/l) of plant growth regulator on number and length of root in M_7 apple rootstock.

نوع محیط کشت، نوع و غلظت تنظیم‌کننده رشد گیاهی Type of media, type andconcentration of plant growth regulator	تعداد ریشه (سه روز تاریکی) Root number (3 days darkness)	طول ریشه (cm) (چهار روز تاریکی) Root length (cm) (4 days darkness)
MS	0.55^{h}	1.22^{cd}
MS + 1.5 mg/l IBA	1.55^{gh}	0.92^{d}
MS + 3 mg/l IBA	3.55^{ef}	1.26^{cd}
MS + 4.5 mg/l IBA	1.55^{gh}	1.05^{d}
MS + 1.5 mg/l NAA	4.33^{de}	2.28^{bcd}
MS + 3 mg/l NAA	5.44^{cd}	3.88^{a}
MS + 4.5 mg/l NAA	5.77^{cd}	1.78^{bcd}
½MS	1.77^{fgh}	2.29^{bcd}
½MS + 1.5 mg/l IBA	2.77^{efg}	2.13^{bcd}
½MS + 3 mg/l IBA	6.22^{bc}	2.83^{ab}
½MS + 4.5 mg/l IBA	7.22^{bc}	3.05^{ab}
½Ms + 1.5 mg/l NAA	5.55^{cd}	3.02^{ab}
½MS + 3 mg/l NAA	11.10^{a}	2.56^{abc}
½MS + 4.5 mg/l NAA	7.99^{b}	1.36^{cd}

میانگین‌هایی که در هر ستون با حروف مختلف مشخص شده‌اند، اختلاف معنی‌داری با یکدیگر در سطح احتمال ۱ درصد دارند.

Means followed by different letters in each column are significantly different at the 1% level of probability.

مقایسه اثر نوع محیط کشت، نوع و غلظت تنظیم‌کننده رشد گیاهی و اثر متقابل آن‌ها نشان داد که اثر متقابل نوع محیط کشت و غلظت تنظیم‌کننده رشد گیاهی و اثر متقابل نوع و غلظت تنظیم‌کننده رشد گیاهی تأثیر معنی‌داری در سطح احتمال یک درصد بر تعداد ریشه در چهار روز تاریکی دارند. همچنین اثر متقابل نوع محیط کشت و نوع تنظیم‌کننده رشد گیاهی تأثیر معنی‌داری در سطح احتمال پنج درصد بر تعداد ریشه در چهار روز تاریکی نشان داد. در حالی‌که اثر ساده نوع محیط کشت، نوع و غلظت تنظیم‌کننده رشد گیاهی تأثیر معنی‌داری در سطح احتمال یک درصد و پنج درصد بر تعداد ریشه در چهار روز تاریکی نشان نداد. نتایج مقایسه میانگین داده‌ها در اثر متقابل نوع و غلظت تنظیم‌کننده رشد گیاهی IBA نشان داد که در چهار روز تاریکی بیش‌ترین تعداد ریشه با میانگین ۵/۸۸ در محیط ½MS در سطح ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر IBA و کم‌ترین تعداد ریشه با میانگین ۰/۵۵ در محیط MS در سطح صفر (شاهد) مشاهده گردید (جدول ٤). حرکت کند IBA در داخل بافت و همچنین تخریب دیرهنگام آن می‌تواند دلیل اصلی کارایی بهتر این اکسین باشد. IBA درون بافت‌ها به آرامی حرکت می‌کند به‌طوری‌که با حرکت آهسته، بافت‌ها فرصت کافی برای دریافت علامت IBA پیدا می‌کنند در نتیجه تمامی بافت‌ها IBA را دریافت کرده و این اکسین روی ریشه‌زایی تأثیر مثبت می‌گذارد و همچنین اکسین در هنگام حرکت درون بافت‌ها ذخیره گردیده و بعد از تأثیرگذاری شروع به تخریب می‌نماید (٢٤).

مقایسه اثر نوع محیط کشت، نوع و غلظت تنظیم‌کننده رشد گیاهی و اثر متقابل آن‌ها نشان داد که اثر متقابل نوع محیط کشت و نوع تنظیم‌کننده رشد گیاهی و اثر متقابل نوع و غلظت تنظیم‌کننده رشد گیاهی تأثیر معنی‌داری در سطح احتمال یک درصد بر طول ریشه در سه روز تاریکی نشان داد در حالی‌که اثر ساده نوع محیط کشت، نوع و غلظت تنظیم‌کننده رشد گیاهی، تأثیر معنی‌داری در سطح احتمال یک درصد و پنج درصد بر طول ریشه در سه روز تاریکی نشان نداد. نتایج مقایسه میانگین داده‌ها در اثر متقابل نوع و غلظت تنظیم‌کننده رشد گیاهی IBA نشان داد که در سه روز تاریکی بیش‌ترین طول ریشه با میانگین ۳/۹٦ سانتی‌متر در محیط کشت ½MS در سطح ۳ میلی‌گرم در لیتر IBA و کم‌ترین طول ریشه با میانگین ۱/۲۲ سانتی‌متر در محیط کشت MS در سطح صفر (شاهد) مشاهده گردید (جدول ٤). به‌نظر می‌رسد یکی از روش‌های حفظ تعادل متابولیسمی گیاهان در غلظت‌های بالای تنظیم‌کننده رشد گیاهی، ممانعت از عمل و یا حتی تجزیه تنظیم‌کننده رشد گیاهی باشد (۸). نتایج پژوهش‌های بانیلاس و کورکاس (۲۰۰۷)، نشان داد که انگور رقم Agiorgitiko بهترین نتایج ریشه‌زایی را در محیط کشت MS با ۱ میلی‌گرم بر لیتر IBA نشان داد که با نتایج به‌دست آمده از پژوهش حاضر مطابقت ندارد (۳).

جدول ٤- مقایسه میانگین اثر متقابل نوع محیط کشت پایه و غلظت تنظیم‌کننده رشد گیاهی IBA بر تعداد و طول ریشه در پایه سیب M_7.

Table 4. Mean comparison of interactions of type of basal media and cocentration (mg/l) of plant growth regulator IBA on number and length of root in M_7 apple rootstock.

نوع محیط کشت و غلظت تنظیم‌کننده رشد گیاهی Type of media and plant growth regulator concentration	تعداد ریشه (چهار روز تاریکی) Root number (4 days darkness)	طول ریشه (cm) (سه روز تاریکی) Root length (cm) (3 days darkness)
MS	0.55^{cd}	1.22^{bc}
MS + 1.5 mg/l	0^{d}	2.89^{abc}
MS + 3 mg/l	1.33^{cd}	2.54^{abc}
MS + 4.5 mg/l	1.11^{cd}	2.31^{abc}
½ MS	1.77^{bcd}	2.29^{abc}
½MS + 1.5 mg/l	5.88^{a}	1.47^{c}
½MS + 3 mg/l	4.66^{abc}	3.35^{a}
½MS + 4.5 mg/l	4.77^{ab}	2.77^{ab}

میانگین‌هایی که در هر ستون با حروف مختلف مشخص شده‌اند، اختلاف معنی‌داری با یکدیگر در سطح احتمال ۱ درصد دارند.

Means followed by different letters in each column are significantly different at the 1% level of probability.

نتایج مقایسه میانگین داده‌ها در اثر متقابل نوع و غلظت تنظیم‌کننده رشد گیاهی NAA نشان داد که در چهار روز تاریکی بیش‌ترین تعداد ریشه با میانگین ۹/۸۸ در محیط ½MS در سطح ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA و کم‌ترین تعداد ریشه با میانگین ۰/۵۵ در محیط MS در سطح صفر (شاهد) مشاهده گردید (جدول ۵). NAA میزان تشکیل ریشه را نسبت به IBA بیش‌تر تحت‌تأثیر قرار می‌دهد و در غلظت‌های بالاتر ریشه‌های به وجود آمده متورم و شکننده‌تر بودند همچنین با کاهش غلظت اکسین میزان تشکیل کالوس نیز کاهش یافت.

نتایج مقایسه میانگین داده‌ها نتایج مقایسه میانگین داده‌ها در اثر متقابل نوع و غلظت تنظیم‌کننده رشد گیاهی NAA نشان داد که در سه روز تاریکی بیش‌ترین طول ریشه با میانگین ۳/۵۸ سانتی‌متر در محیط کشت MS در سطح ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA و کم‌ترین طول ریشه با میانگین ۱/۲۲ سانتی‌متر در محیط کشت MS در سطح صفر (شاهد) مشاهده گردید (جدول ۵). اکسین‌ها در تحریک تقسیم سلولی، افزایش طول سلول‌ها، تحریک آغازیدن ریشه، تمایزیابی بافت‌های آوندی و افزایش حرکت مواد در آوندها نقش دارند.

جدول ۵- مقایسه میانگین اثر متقابل نوع محیط کشت پایه و غلظت تنظیم‌کننده رشد گیاهی NAA بر تعداد و طول ریشه در پایه سیب M_7.

Table 5. Mean comparison of interactions of type of basal media and cocentration (mg/l) of plant growth regulator NAA on number and length of root in M_7 apple rootstock.

نوع محیط کشت و غلظت تنظیم‌کننده رشد گیاهی Type of media and plant growth regulator concentration	تعداد ریشه (چهار روز تاریکی) Root number (4 days darkness)	طول ریشه (cm) (سه روز تاریکی) Root length (cm) (3 days darkness)
MS	0.55^{d}	1.22^{c}
MS + 1.5 mg/l	4.44^{cd}	3.58^{a}
MS + 3 mg/l	6.11^{abc}	2.48^{ab}
MS + 4.5 mg/l	5.22^{cd}	1.85^{bc}
½MS	1.77^{cd}	2.29^{abc}
½MS + 1.5 mg/l	9.88^{a}	2.26^{abc}
½MS + 3 mg/l	8.77^{ab}	2.74^{ab}
½MS + 4.5 mg/l	5.55^{bcd}	1.98^{abc}

میانگین‌هایی که در هر ستون با حروف مختلف مشخص شده‌اند، اختلاف معنی‌داری با یکدیگر در سطح احتمال ۱ درصد دارند.

Means followed by different letters in each column are significantly different at the 1% level of probability.

با مقایسه میانگین اثر متقابل نوع تنظیم‌کننده رشد گیاهی و سطوح تنظیم‌کننده رشد گیاهی در چهار روز تاریکی بیش‌ترین تعداد ریشه با میانگین ۷/٤٤ ریشه در هر تیمار در محیط حاوی تنظیم‌کننده رشد گیاهی NAA در سطح ۳ میلی‌گرم در لیتر و کم‌ترین تعداد ریشه با میانگین ۱/۱٦ ریشه در هر تیمار در محیط فاقد تنظیم‌کننده رشد گیاهی (شاهد) ثبت گردید (جدول ٦). بین تیمار NAA در سطوح ۱/۵ و ۳ میلی‌گرم در لیتر اختلاف معنی‌دار مشاهده نگردید. غلظت ۳ میلی‌گرم در لیتر غلظت کافی برای تشکیل ریشه می‌باشد در حالی‌که در غلظت پایین‌تر تولید ریشه به اندازه کافی صورت نمی‌گیرد. افزایش در غلظت اکسین در محیط ریشه‌زایی موجب ایجاد ریشه‌های فرعی بیش‌تر و کوتاه شدن طول ریشه‌ها می‌گردد (۳۵). اکسین‌ها در تحریک تقسیم سلولی، افزایش طول سلول‌ها، تحریک آغازش ریشه، تمایزیابی بافت‌های آوندی و افزایش حرکت مواد در آوندها نقش دارند (۱۲).

با مقایسه میانگین اثر متقابل نوع تنظیم کنند رشد گیاهی و سطوح تنظیم‌کننده رشد گیاهی در سه روز تاریکی بیش‌ترین طول ریشه با میانگین ۳/۲۸ سانتی‌متر در محیط کشت حاوی IBA در سطح ۳ میلی‌گرم در لیتر و کم‌ترین طول ریشه با میانگین ۱/٤٤ سانتی‌متر در محیط حاوی IBA در سطح ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر مشاهده گردید (جدول ٦). IBA نسبت به NAA تأثیر بیش‌تری بر طول ریشه داشت و همچنین باعث کاهش تشکیل کالوس گردید. ریزنمونه‌ها برای پاسخ به علایم و سیگنال‌های ارگانوژنیک، نیاز به نوع و غلظت مناسبی از اکسین دارند (۸). نتایج پژوهش‌های بیوتیک‌کئول و همکاران (۲۰۰۸)، نشان داد که IBA بیش‌ترین تأثیر را در ریشه‌زایی درون‌شیشه‌ای انگور رقم Perlette داشت که با نتایج به‌دست آمده از پژوهش حاضر مطابقت داشت (٤). همچنین نتایج پژوهش‌های کلاته‌جاری و همکاران (۲۰۰٦)، بر ریشه‌زایی دو رقم انگور بیدانه سفید و شاهرودی نشان داد که محیط کشت حاوی نصف غلظت MS تکمیل شده با ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر IBA بهترین نتیجه را برای ریشه‌زایی داشته است که با نتایج به‌دست آمده از پژوهش حاضر مطابقت نشان نداد (١٤).

جدول ٦- مقایسه میانگین اثر متقابل نوع و غلظت تنظیم‌کننده رشد گیاهی بر تعداد و طول ریشه در پایه سیب M_7.

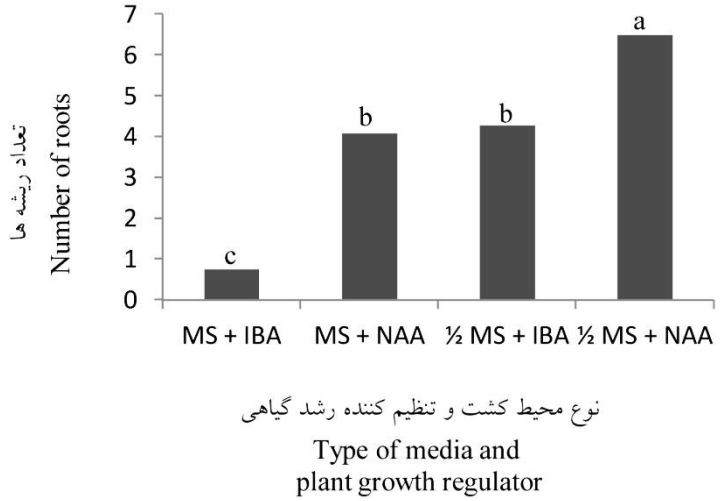
Table 6. Mean comparison of interactions of type and cocentration (mg/l) of plant growth regulator on number and length of root M_7 apple rootstock.

نوع و غلظت تنظیم‌کننده رشد گیاهی Type and concentration of Plant growth regulator	تعداد ریشه (چهار روز تاریکی) Root number (4 days darkness)	طول ریشه (cm) (سه روز تاریکی) Root length (cm) (3 days darkness)
Control شاهد	1.16^{c}	1.75^{bc}
1.5 mg/l IBA	2.94^{bc}	1.44^{c}
3 mg/l IBA	2.99^{bc}	3.28^{a}
4.5 mg/l IBA	2.94^{bc}	3.18^{ab}
1.5 mg/l NAA	7.16^{a}	2.92^{ab}
3 mg/l NAA	7.44^{a}	2.61^{abc}
4.5 mg/l NAA	5.38^{ab}	1.91^{abc}

میانگین‌هایی که در هر ستون با حروف مختلف مشخص شده‌اند، اختلاف معنی‌داری با یکدیگر در سطح احتمال ۱ درصد دارند.

Means followed by different letters in each column are significantly different at the 1% level of probability.

با مقایسه میانگین اثر متقابل نوع محیط کشت و تنظیم‌کننده رشد گیاهی در چهار روز تاریکی، بیش‌ترین تعداد ریشه با میانگین ٦/٤٩ ریشه در هر تیمار در محیط کشت ½MS حاوی تنظیم‌کننده رشد گیاهی NAA و کم‌ترین تعداد ریشه با میانگین ٠/٧٤ ریشه در هر تیمار در محیط MS حاوی تنظیم‌کننده رشد گیاهی IBA مشاهده گردید (شکل ٣). بین تیمار ½MS حاوی NAA با بقیه تیمارها اختلاف معنی‌دار مشاهده گردید. تفاوت در سن فیزیولوژیک ریزنمونه، پاسخ‌های مختلف در بیان ژن ریزنمونه به تنظیم‌کننده رشد به‌کار رفته، سطوح داخلی تنظیم‌کننده رشد درون‌زا و سایر عوامل دخیل در ریشه‌زایی درون‌شیشه‌ای مؤثر می‌باشد (٣٩). تشکیل ریشه‌های نابجا مرحله کلیدی برای ازدیاد رویشی است که تشکیل آن توسط ژنتیک، شرایط محیطی و عوامل داخلی تنظیم می‌شود (٣١). از آن‌جایی که شرایط محیطی برای تمامی ریزنمونه‌ها یکسان بود از این‌رو می‌توان ژنتیک و عوامل داخلی از جمله سطح داخلی تنظیم‌کننده رشد را مؤثر پنداشت. ریزنمونه‌ها باید دارای مواد درونی مورد نیاز برای انگیزش ریشه‌زایی باشند. نتایج پژوهش‌های یربولاوا و همکاران (٢٠١٣) بر ریشه‌زایی انگورهای رقم Almaty، Zhambyl و Kyzydorda نشان داد که محیط کشت نصف غلظت MS و ١ میلی‌گرم بر لیتر IAA بیش‌ترین ریشه‌زایی را داشت که با نتایج به‌دست آمده از پژوهش حاضر مطابقت نشان نداد (٣٧).

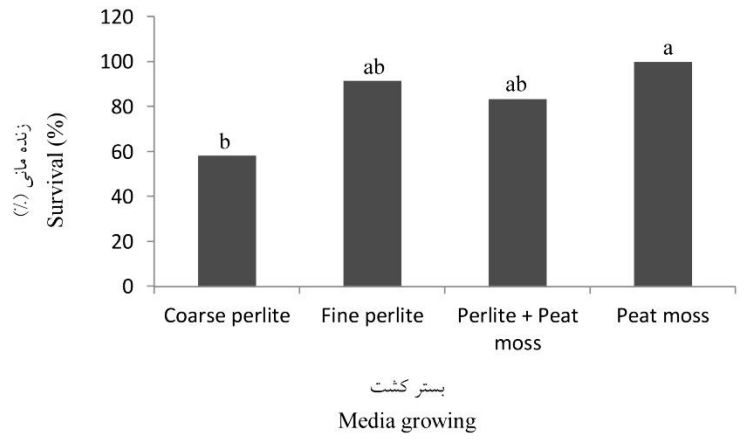


شکل ٣- نمودار مقایسه میانگین اثر متقابل نوع محیط کشت پایه و تنظیم‌کننده رشد گیاهی بر تعداد ریشه در پایه سیب M_7. میانگین‌هایی که با حروف مختلف مشخص شده‌اند، اختلاف معنی‌داری با یکدیگر در سطح احتمال ٥ درصد دارند.

Figure 3. The chart of mean comparison of interactions of type of basal media and plant growth regulator on number of root in M_7 apple rootstock. Means followed by different letters are significantly different at the 5% level of probability.

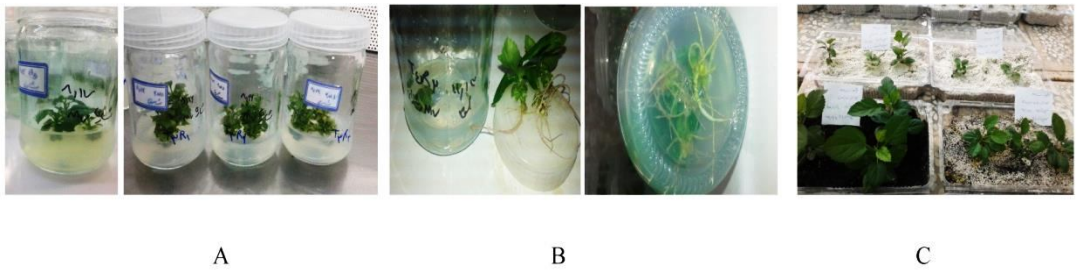
سازگاری: مقایسه اثر نوع بستر کشت نشان داد در پایه سیب M_7 نوع بستر کشت تأثیر معنی‌داری در سطح احتمال یک درصد بر درصد زنده‌مانی گیاهچه‌ها دارد. با مقایسه میانگین اثر نوع بستر کشت بر درصد زنده‌مانی پایه سیب M_7، بیش‌ترین درصد زنده‌مانی با میانگین ١٠٠ درصد در بستر کشت پیت‌ماس و کم‌ترین درصد زنده‌مانی با میانگین ٥٨/٣٣ درصد در بستر کشت پرلیت درشت مشاهده گردید (شکل ٤).

بین تیمارهای پرلیت درشت و پیت‌ماس تفاوت معنی‌دار مشاهده گردید در حالی‌که بین این دو تیمار با بقیه تیمارها تفاوت معنی‌دار مشاهده نشد. به‌نظر می‌رسد این پایه در بستر پیت‌ماس به‌دلیل نگهداشت آب به‌مدت طولانی و دارا بودن منافذ ریز نسبت به سایر بسترها سازگاری بیش‌تری نشان می‌دهد و این نشان‌دهنده سازگاری این پایه با بستری است که بتواند آب را مدت زمان بیش‌تری در خود نگه دارد و در این بستر دچار پوسیدگی ریشه نیز نمی‌شود.



شکل ٤- نمودار مقایسه میانگین اثر نوع بستر کشت بر درصد زنده‌مانی در پایه سیب M_7. میانگین‌هایی که با حروف مختلف مشخص شده‌اند، اختلاف معنی‌داری با یکدیگر در سطح احتمال ۱ درصد دارند.

Figure 4. The chart of mean comparison of effect of media growing on the percentage of survival in M_7 apple rootstock. Means followed by different letters are significantly different at the 1% level of probability.



شکل ٥- مراحل مختلف ریزازدیادی پایه سیب M_7. A) باززایی، B) ریشه‌زایی و C) سازگاری.

Figure 5. Different stages of in vitro micropropagation of M_7 apple rootstock. A) regeneration, B) rooting and C) hardening.

نتیجه‌گیری کلی

با توجه به نتایج به‌دست آمده از آزمایش اول، محیط کشت B_5 حاوی ۱ میلی‌گرم بر لیتر بنزیل‌آدنین با میانگین ۱۵/٦٦ ریزشاخه به‌ازای هر ریزنمونه، مطلوب‌ترین محیط برای پرآوری سیب M_7 در این پژوهش بود. بر اساس نتایج آزمایش دوم، بنزیل‌آمینوپورین تأثیر بیش‌تری نسبت به تیدیازورون روی پرآوری، تعداد گره و میانگره داشت ولی طول میانگره بیش‌تر تحت‌تأثیر تیدیازورون قرار گرفت. بیش‌ترین پرآوری با میانگین ۱٦/٥٥ ریزشاخه به‌ازای هر ریزنمونه در محیط B_5

حاوی ۲/۲ میکرومولار BAP مشاهده گردید. در آزمایش سوم با هدف ارزیابی توان ریشه‌زایی، تیمار سه روز تاریکی نسبت به تیمار چهار روز تاریکی نتایج مطلوب‌تری نشان داد. در این مرحله از پژوهش بهترین دوره تاریکی، نوع محیط کشت، نوع تنظیم‌کننده رشد گیاهی و بهترین غلظت تنظیم‌کننده رشد گیاهی به‌ترتیب شامل سه روز تاریکی، محیط کشت ½MS، تنظیم‌کننده رشد NAA و غلظت ۳ میلی‌گرم بر لیتر به‌دست آمد. در سازگاری پایه نیمه‌پاکوتاه سیب M_7 بستر پیت‌ماس نتایج بهتری نشان داد.

سپاسگزاری

بدین‌وسیله از مدیریت شرکت دانش بنیان اروم زیست تاک به‌منظور تأمین گیاهچه استریل سیب M7 سپاسگزاری می‌نمائیم.

منابع

1.Abdollahi, H. 2014. Guidebook of pome fruits: (Apple, Pear and Quince); cultivation and growing. Agricultural extension and education publications ministry of Jihad-e-Agriculture. Tehran, Iran. 98p. (In Persian)
2.Amiri, E.,and Elahinia, A. 2011. Optimization of medium composition for apple rootstocks. J. Afric. Biotech. 10: 18. 3594-3601.
3.Banilas, G. and Korkas, E. 2007. Rapid micropropagation of gravepine cv. Agiorgitiko through lateral bud development. Sci. Technol. 2: 31-38.
4.Butiuc-Keul, A.L., Cotse, A., Bcraaciunaa, A., Halmagyl, A., Deliu, F., Iliescu, M. and Iuoras, R. 2008 b. *In vitro* clonal propagation of several grapevine cultivars. Hort. Sci. 843: 151-156.
5.Dolcet-Sanjuan, R., Mok, D.W.S. and Mok, M.C. 1990. Micropropagation of *Pyrus* and *Cydonia* and their responses to Fe-limiting conditions. Plant Cell. Tissue. Organ. Cult. 21: 3. 191-199.
6.D'Onofrie, C. and Morini, S. 2005. Development of adventitious shoots from *in vitro* grown *Cydonia oblonga* leaves as influenced by different cytokinins and treatment duration. Biol. Plant. 49: 1. 17-21.
7.Edwin, R.F. and Paul, D.S. 1984. Plant propagation by tissue culture. Handbook and directory of commercial laboratories. First published. Exegetics Ltd. Eversley, Basingstoke. Hants. RG27 OQY, England, 709p.
8.Evers, P.W., Donkers, J., Prat, A. and Vermeer, E. 1988. Micropropagation of forest trees through tissue culture. P 98-102, In: Bonga, J.M., Aderkas,p. (Eds). *In vitro* culture of trees. Centre for Agricultural Publishing and Documentation, 236p.
9.George, E.F., Hall, M.A. and De Klerk, G.D. 2008. The components of plant tissue culture media I: macro – and micro – nutrients. Springer, Netherlands, Pp: 65-113.
10.Greenway, M.B., Phillips, I.C., Lloyd, M.N., Hubstenberger, J.F. and Phillips, G.C. 2012. A nutrient medium for diverse applications and tissue growth of plant species *in vitro*. *In Vitro* Cell. Dev. Biol. Plant. 48: 403-410.
11.Hepaksoy, S. and Aksoy, U. 2006. Propagation of *Ficus carica* L. clones by *in vitro* Cul. Biol. Plant. 50: 3. 433-436.
12.Jalili Marandi, R. 2007. *Plants propagation*. Publications (SID). second edition. 469p. (In Persian)
13.James, D.J. and Thurbon, I.J. 1981. Shoot and root initiation *in vitro* in the apple rootstock M9 the promotive and effects of phloroglusinol. Hort. Sci. 56: 15-20.
14.Kalateh Jari, S. 2006. Reaction study of two varieties of bidaneye sefid grape and shahrodi to conditions of *in vitro* culture. Iran. Agric. Sci. 2: 215-205. (In Persian)

15.Karimpour, S., Davarynejad, Gh., Bagheri, A. and Tehranifar, A. 2013. *In vitro* establishment and clonal propagation of Sebri pear cultivar. J. Agric. Sci. Technol. 15: 1209-1217. (In Persian)
16.Khalili, H. 2011. Micropropagation of vitis vinifera cv. ghizil ouzum. Master's Thesis, Faculty of agriculture, Urmia university. 84p. (In Persian)
17.Khodaee Chegenee, F., Ershadi, A., Abdollahi, H. and Esnaashari, M. 2011. Determination of micropropagation protocol for OH×F333 and OH×F69 pear clonal rootstocks. Seed Plant Prod. J. 27: 3. 297-312. (In Persian)
18.Lane, W.D., Looney, N.E. and Mage, F. 1982. A selective tissue culture medium for growth of compact (dwarf) mutants of apple. TAG Theoretical Appl. Gen. 61: 3. 219-223.
19.Li, J.R. and Eaton, G.W. 1984. Growth and rooting of grape shoot apices *in vitro*. Hort. Sci. 19: 64-65.
20.Lu, M.C. 2005. Micropropagation of *Vitis thunnbergii* Sieb et Zucc., a medicinal herb, throuth high frequency shoot tip culture. Hort. Sci. 107: 1. 64-69.
21.Mahdavian, M., Bouzari, N. and Abdollahi, H. 2010. Effects of culture media and growth regulators on proliferation and rooting of vegetative Mahaleb (St. Lucie 64). Seed Plant Improve. J. 26: 1. 26-15. (In Persian)
22.Murashige, T. and Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant. 15: 473-497.
23.Nasib, A., Ali, K. and Khan, S. 2008. An optimized and improved method for the *in vitro* proparagation of Kiwifruit (*Actinidia deliciosa*) using coconut water. Pakistan. J. Bot. 40: 6. 2355-2360.
24.Norozalipur Tape, E. 2014. Investigation on effective factors of grape (cv. *Bidaneh Ghermez*) micropropagation. Master's Thesis, Faculty of agriculture, Urmia university. 95p. (In Persian)
25.Nourmohamadi, N., Abdollahi, H., Moini, A. and Ruholamin, A. 2015. Effects of growth media and Fe source on micropropagation and rooting of semi-dwarf pear rootstocks, pyrodwarf and OH×F87. Seed Plant Improve. J. 1: 2. 265-278. (In Persian)
26.Peros, J.P., Torregrosa, L. and Berger, G. 1998. Variablity among *Vitis vinifera* cultivars in micropropagation, organogenesis and antibiotic sensitivity. J. Exp. Bot. 49: 319. 171-179.
27.Ramage, C.M. and Williams, R.R. 2002. Mineral nutrition and plant morphogenesis. *In Vitro* Cell. Dev. Biol. Plant. 38: 116-124.
28.Radnia, H. 1996. Fruit trees (compiled on sidi rome & robert F. carlson). First edition. Agricultural Training Publish, 637p. (In Persian)
29.Reed, B.M., DeNoma, J., Wada, S. and Postman, J. 2013. Micropropagation of pear (*Pyrus* sp). Protocols for micropropagation of selected economically important horticultural plants, Pp: 3-18.
30.Skiada, F., Grigoriadou, K. and Eleftheriou, E.P. 2010. Micropropagation of *Vitis vinifera* L. cv. Malagouzia and Xinomavro. Cen. Euro. J. Biol. 5: 6. 839-852.
31.Sorin, C., Bussell, J.D., Camus, I., Ljung, K., Kowalczyk, M., Geiss, G., Mckhann, H., Garcion, Ch., Vaucheret, H. and Sandberg, G. 2005. Auxin and light control of adventitious rooting in *Arabidopsis* require ARGONUTE1. Americ. Soc. Plant. Biol. 17: 1343-1359.
32.Taji, A.M., Dodd, W.A. and Williams, R.R. 1997. Plant tissue culture practice. Third ed. UNI press, Australia, 171p.
33.Tatari, M. and Mousavi, A. 2013. Optimization *in vitrio* culture of vegetative rootstocks of tetra, nemagard & GF6777. Agric. J. 15: 3. 103-115. (In Persian)
34.Tatari Vernosfaderani, M., Askari Raberi, N. and Nosrati, S.Z. 2010. The optimizing of *in vitro* Culture for gerbera varieties of Tropic Blend. Seed Plant Improve. J. 25: 4. 389-401. (In Persian)
35.Wang, K.Y.I. 2009. *In vitro* culture of dog ridge grapevine. M.Sc. Thesis, Faculty of Agriculture Texas A & M University, USA.

36. Werner, E.M. and Boe, A.A. 1980. *In vitro* propagation of M7 apple rootstoock. Hort. Sci. 15: 509-510.
37. Yerbolova, S.L., Ryabusbkina, A.N., Oleichenko, N.S., Oleichenko, A.G. and Galiakparov, N.N. 2013. The effect of growth regulators on *in vitro* culture of some *Vitis vinifera* L. cultivars. Worl. Appl. Sci. 23: 1. 76-80.
38. Youmbi, E., Ella, B. and Tomekpe, K. 2006. Effect of thidiazuron on *in vitro* proliferation Capacityes of some banana (*Musa* spp.) cultivars with weak multiplication potential. Agric. J. Akdeniz Uni. 19: 2. 255-259.
39. Zamanzadeh, Z., Ehsanpour, A.A. and Amini, F. 2010. The study of the amount of auxin in plants regenerated from the roots of transgenic tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) contain Ri-TDNA. Cell. Tiss. 1: 2. 7-1. (In Persian)