

Plant Prod., 43(2) (2020) 241-254  
DOI: 10.22055/ppd.2019.27439.1667

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

## Effect of Different Media and Growth Regulators on Micropropagation of GF677

Mohammad Gerdakaneh<sup>1\*</sup>, Hedieh Badakhshan<sup>2</sup>, Maryam Mohamadi<sup>3</sup> and Issa Arji<sup>4</sup>

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

Received: 31 October, 2018

Accepted: 16 January, 2019

### Abstract

#### Background and Objectives

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

#### Materials and Methods

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

#### Results

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

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

### **Discussion**

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

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

## اثر نوع محیط کشت و تنظیم کننده‌های رشد بر ریزازدیادی پایه‌رویشی GF۶۷۷ (دورگ بین هلو و بادام)

محمد گردکانه<sup>۱\*</sup>، هدیه بدخشان<sup>۲</sup>، مریم محمدی<sup>۳</sup> و عیسی ارجی<sup>۴</sup>

۱- \*نویسنده مسئول: استادیار بخش تحقیقات علوم زراعی و باغی، مرکز تحقیقات، آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان کرمانشاه، سازمان

تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرمانشاه، ایران (mgerdakaneh@gmail.com)

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

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

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

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۱۰/۲۶

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۰۸/۰۹

### چکیده

پایه GF۶۷۷، یک پایه مناسب برای بادام و هلو است، که به‌طور گسترده در سراسر دنیا استفاده می‌شود. در این تحقیق به منظور بهبود روش ریزازدیادی پایه GF۶۷۷، ریزنمونه‌های گره بر روی محیط‌های کشت MS، B<sub>s</sub> و WPM در حاوی تنظیم کننده‌های رشد بنزیل آدنین (BA)، در شش غلظت صفر، ۰/۱، ۰/۲۵، ۰/۵، ۱، ۲ و ۴ میلی‌گرم بر لیتر و ایندول-۳- بوتیریک اسید (IBA) در چهار غلظت صفر، ۰/۱، ۰/۲۵ و ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر در مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی کرمانشاه در سال ۱۳۹۵ اجرا شد. آنالیز داده‌های صفات مختلف بر اساس مدل آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی تجزیه و تحلیل گردید و مقایسات میانگین داده‌ها به روش آزمون LSD در سطح احتمال پنج درصد انجام شد. نتایج نشان داد که محیط کشت MS، همراه با ۱ میلی‌گرم در لیتر BA و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر IBA با تولید بیشترین تعداد شاخساره، بلندترین طول ساقه، بیشترین قطر ساقه، تعداد گره و فواصل میان‌گره، تعداد برگ و درصد ریزنمونه‌های باززایی شده، مناسب‌ترین محیط کشت در بین سایر محیط‌های کشت مورد استفاده بود. جهت ریشه‌زایی، شاخساره‌ها را به محیط کشت MS جامد همراه با IBA، در چهار غلظت ۰/۲۵، ۰/۵، ۱ و ۲ میلی‌گرم در لیتر و BA، در چهار غلظت صفر، ۰/۱، ۰/۲ و ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر منتقل شدند. بهترین ریشه‌زایی در محیط کشت MS حاوی ۱ میلی‌گرم در لیتر IBA و ۰/۵ BA حاصل شد. گیاهچه‌های ریشه‌دار شده در محیط شامل پرلیت، ماسه و خاک به نسبت ۱:۲:۱ قرار گرفتند. ۹۰ درصد نمونه‌های انتقال یافته به محیط خاکی زنده مانده و رشد طبیعی داشتند.

کلیدواژه‌ها: اکسین، باززایی، ریزنمونه، سیتوکینین

### مقدمه

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

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

کشت می‌باشد ( Shehata and Al-Khayri, 2013; Kose and Canli, 2015).

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

با توجه به این که کارایی ازدیاد پایه رویشی GF۶۷۷ در شرایط درون شیشه‌ای تحت تأثیر نوع محیط کشت و تنظیم کننده‌های رشد قرار می‌گیرد. بنابراین هدف از این مطالعه، استفاده تنظیم کننده‌های رشد و محیط‌های کشت MS، WPM و B<sub>5</sub> برای بهینه‌سازی ریزازدیادی پایه GF۶۷۷ در شرایط درون شیشه‌ای بود.

## مواد و روش‌ها

### جمع آوری نمونه

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

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

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

در هود لامینار، شاخساره‌های حاصل از آزمایش اول را جدا کرده و روی این محیط قرار داده شد. سپس طول ریشه، قطر ریشه، تعداد ریشه تولیدشده و درصد ریشه‌زایی ثبت شد.

### انتقال گیاهچه‌های ریشه‌دارشده به محیط سازگاری

گیاهچه‌های ریشه‌دارشده را به‌دقت از محیط کشت جدا سازی نموده و به تدریج با آب ملایم جهت حذف بقایای محیط کشت چسبیده به ریشه‌ها شسته شدند و در محلول ۱ در هزار قارچ کش به مدت ۱۵-۱۰ دقیقه قبل از انتقال، ضدعفونی شده و به گلدان با ترکیب پرلیت، ماسه و خاک به نسبت ۱:۲:۱ انتقال داده شدند و این گیاهان به مدت ۲ هفته در اتاقک رشد در دمای  $20 \pm 1$  درجه سانتی‌گراد، با شدت نور ۲۰۰۰ لوکس و دوره نوری ۱۶ ساعت روشنایی، با رطوبت ۸۰ درصد نگهداری گردیدند و برای جلوگیری از دست دادن سریع رطوبت، گیاهان کشت شده در گلدان با لیوان‌های شفاف پوشانده شدند بعد از دو هفته لیوان‌ها برداشته شده و رطوبت نسبی کاهش یافت و گیاهان به تدریج در معرض شرایط محیطی بیرون قرار گرفتند.

### تجزیه‌های آماری

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

### نتایج و بحث

جدول تجزیه واریانس (جدول ۱) نشان می‌دهد که، اثر سطوح مختلف فاکتورهای محیط کشت، تنظیم‌کننده‌های رشد سیتوکینین (BA) و اکسین (IBA) و اثرات متقابل دو گانه میان این فاکتورها و اثر متقابل سه گانه محیط  $BA \times IBA \times$  بر روی همه صفات مورد بررسی، معنی‌دار شد.

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

### تهیه محیط کشت

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

محیط‌های کشت را به مقدار ۲۵ میلی‌لیتر در ظروف شیشه‌ای توزیع کرده و به مدت ۲۰ دقیقه اتوکلاو شدند. پس از سرد شدن محیط‌های کشت در هود لامینار، جوانه‌های استریل، بر روی آن‌ها کشت شدند. آزمایش با سه تکرار انجام شد و در هر ظرف سه ریزنمونه کشت شد و بلافاصله پس از بستن درب شیشه‌ها، توسط پارافیلیم درب آن‌ها کاملاً مسدود گردید تا در اتاقک رشد دچار آلودگی نشوند. سپس کشت‌ها در اتاقک رشد تحت شرایط ۱۶ ساعت نور فلورسنت سرد و ۸ ساعت تاریکی در دمای  $25 \pm 2$  درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. در نهایت، تعداد روز مورد نیاز جهت شروع باززایی ثبت گردید و پس از شش هفته بعد از کشت، سرعت باززایی، درصد ریزنمونه‌های باززایی شده، تعداد شاخساره‌های تولیدشده، طول ساقه، قطر ساقه و تعداد برگ ریزنمونه‌های باززایی شده اندازه‌گیری و ثبت شد.

### انتقال شاخساره‌ها به محیط ریشه‌زایی

محیط کشت MS حاوی ۳ درصد ساکارز، ۰/۸ درصد آگار همراه با تنظیم‌کننده‌های رشد IBA در چهار غلظت ۰/۲۵، ۰/۵، ۱ و ۲ میلی‌گرم در لیتر همراه با چهار غلظت صفر، ۰/۱، ۰/۲ و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BA تهیه شد. pH محیط کشت ۵/۸ تنظیم گردید. محیط‌های کشت را به مقدار ۳۰ میلی‌لیتر در ظروف شیشه‌ای توزیع کرده و به مدت ۲۰ دقیقه اتوکلاو شدند. پس از سرد شدن محیط‌های کشت

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

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

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

### سرعت باززایی ریزنمونه‌ها

نتایج مقایسه میانگین‌ها نشان داد که سرعت باززایی ریزنمونه‌ها با توجه به نوع محیط کشت، نوع و غلظت تنظیم کننده‌های رشد مختلف متفاوت بود و تشکیل شاخساره در ریزنمونه‌ها بین ۷/۳۳ تا ۱۷/۳۲ روز بعد از انتقال به محیط کشت باززایی آغاز شد. ریزنمونه‌ها در محیط کشت MS حاوی ۴ میلی گرم در لیتر BA همراه با ۰/۵ میلی گرم در لیتر IBA، در مقایسه با سایر تیمارها سریع‌تر شروع به باززایی نمودند ولی محیط B5 با غلظت ۰/۲۵ میلی گرم در لیتر BA و IBA صفر، نسبت به سایر غلظت‌های هورمونی نیاز به زمان بیشتری برای آغاز باززایی ریزنمونه‌ها داشت (جدول ۲). سیتوکینین و اکسین در تقسیم و طول شدن سلول تأثیرگذار است ولی تحریک یا بازدارندگی این تنظیم کننده‌های رشد به اندام مربوطه، نوع و غلظت آن‌ها بستگی دارد (Campbell et al, 2008). در برخی از گیاهان افزایش نسبت سیتوکینین به اکسین سبب پیدایش جوانه و در نتیجه شاخه‌های برگ‌دار می‌شود (Kieber, 2002). کاربرد غلظت بالای سیتوکینین‌ها موجب حذف غالبیت انتهایی و تحریک تولید شاخه‌های نابجا می‌گردد و نیز مقادیر خیلی زیاد آن سبب مشاهده ناهنجاری‌های ژنتیکی می‌شود (Sharifmoghaddam et al, 2011). (2012). Tatarivermosafadarani et al. ازدیاد پایه رویشی GF677 با استفاده از روش درون شیشه‌ای در محیط‌های کشت MS تغییر یافته، WPM و Knop مورد ارزیابی قرار دادند. نتایج آن‌ها نشان داد که نوع محیط

کشت می‌تواند بر سرعت باززایی ریزنمونه‌ها مؤثر باشد. به نظر می‌رسد غلظت بالای عناصر غذایی به کار رفته در محیط کشت MS مزیت این محیط کشت می‌باشد (Kose and Canli, 2015) که با نتایج این تحقیق همسو می‌باشد.

### درصد باززایی ریزنمونه‌ها

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

شاخساره با افزایش غلظت BA تا غلظت مشخصی افزایش یافت. نتایج نشان داد که تعداد شاخساره در غلظت تا ۱ میلی گرم BA در لیتر به میزان ۴/۹۹ شاخساره در هر ریزنمونه افزایش یافت. به نظر می رسد که بین غلظت BA و تعداد شاخساره تا یک غلظت خاصی از BA، رابطه مثبت وجود دارد به طوری که تعداد شاخساره در غلظت ۱ میلی گرم لیتر BA به اوج خود می رسد. در غلظت های بالاتر از ۱ میلی گرم در لیتر BA، تعداد شاخساره ها کاهش می یابد. یکی از احتمالاتی که می تواند باعث کاهش تعداد شاخساره ها در غلظت بالاتر BA شود ظاهراً مقدار مشخصی از BA برای به دست آوردن بهترین اثر مورد نیاز است. غلظت های بالاتر BA سبب ایجاد مقدار زیادی کالوس می شود که در کشت بافت برای تولید شاخساره مناسب نیست. ترکیب محیط کشت و غلظت نمک ها نقش مهمی را در ریزازدیادی بازی می کند (Ruzic et al., 2003). Nazarymoghaddam and Yadollahi (2012) نیز برای به دست آوردن بیشترین تعداد شاخساره از محیط MS استفاده نمود که با نتایج این تحقیق همسو بود.

کشت روی میزان پرآوری و ازدیاد پایه های هسته دارها تأثیر دارد. به گزارش Ruzic et al. (2003) ترکیب محیط کشت و غلظت نمک ها نقش مهمی را در ریزازدیادی پایه گیلاس بازی می کند. Zia ul Hasan et al. (2010) تأثیر دو محیط کشت MS و Lp را با غلظت های مختلف تنظیم کننده های رشد BAP و NAA بر روی پایه GF677 مورد بررسی قرار دادند، بیشترین باززایی با استفاده از محیط MS حاصل شد. بر اساس نتایج به دست آمده، می توان نتیجه گرفت که تفاوت تأثیر هورمون های مختلف سیتوکنین مربوط به جذب سیتوکنین، توسط سلول ها و یا مکانیسم عملکرد ترکیبات سیتوکنین باشد (Ruzic and Vujovic, 2008).

### تعداد شاخساره تولید شده

نتایج مقایسه میانگین ها نشان داد که حداکثر تعداد شاخساره در محیط کشت MS در ترکیب با ۱ میلی گرم در لیتر BA و ۰/۵ میلی گرم در لیتر IBA تولید شد (شکل ۱a) و کمترین تعداد شاخساره در محیط کشت MS همراه با ۰/۵ میلی گرم در لیتر BA و بدون استفاده از IBA حاصل شد (جدول ۳). این مطالعه نشان داد تعداد

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

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

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



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

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

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

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

میلی گرم در لیتر BA و در محیط کشت B5 با ۱ میلی گرم در لیتر BA، کمترین طول شاخساره حاصل شد (جدول ۳) که با نتایج Balapour et al. (2019) همسو بود. Mohamadzadeh Moghadam and Hamidi (2017) نیز بیشترین طول شاخساره‌ها در محیط کشت MS در

### طول شاخساره

نتایج مقایسه میانگین نشان داد که بیشترین طول شاخساره‌ها در محیط کشت MS در ترکیب با ۱ میلی گرم در لیتر BA و ۰/۵ میلی گرم در لیتر IBA ثبت شد ولی در محیط کشت WPM، با غلظت ۰/۲۵



کشت WPM دارای سطح بالاتری از کلرید است که به علت مهار جذب مواد غذایی، انتقال و استفاده از مواد مغذی منجر به رشد ضعیف گیاه می‌شود (Karimi et al., 2005). علاوه بر این، کمبود منیزیم مشاهده شده در شاخساره‌ها به علت مقدار کلرید بالاتر و در اثر پتانسیل اسمزی پایین محیط کشت WPM است. تحقیقاتی که به منظور تعیین پروتکل تکثیر درون شیشه‌ای دو پایه همگروه گلایی روی صفات رویشی ساقه‌چه‌های درون شیشه‌ای انجام شد که نتیجه آن برتری محیط کشت QL تغییر یافته با بیشترین پرآوری و کیفیت شاخه به‌عنوان محیط کشت پایه بوده است (Khodaei Chegini et al., 2011).

### تعداد برگ در شاخساره

نتایج مقایسه میانگین‌ها نشان داد که بیشترین تعداد برگ در محیط کشت MS با ۱ میلی‌گرم در لیتر BA و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر IBA و کمترین تعداد برگ در محیط کشت WPM با ۱ میلی‌گرم در لیتر BA و ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر IBA به‌دست آمد (جدول ۴). Channuntapipat et al. (2003) در ریزازدیادی دورگه هلو- بادام بیشترین تعداد برگ را در محیط کشت MS گزارش کردند. استفاده بیش از یک میلی‌گرم در لیتر BA باعث افزایش تعداد برگ می‌شود اما شیشه‌ای شدن را به‌دنبال دارد (Kamali et al., 2006). Iskalan (2008) et al. اثر غلظت‌های مختلف BA به تنهایی و ترکیبی از IAA + BA برای تکثیر شاخساره بادام رقم ناون پاریل مورد بررسی قرار دادند. بیشترین تعداد شاخساره از محیط کشت MS با ۲ میلی‌گرم در لیتر BA به‌دست آمد ولی بیشترین تعداد گره و تعداد برگ از محیط کشت MS با ۱ میلی‌گرم در لیتر BA حاصل شد که همسو با نتایج این تحقیق می‌باشد.

### درصد ریشه‌زایی

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

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

### قطر شاخساره

نتایج مقایسه میانگین‌ها نشان داد که شاخساره‌ها در محیط کشت MS همراه با ۱ میلی‌گرم در لیتر BA و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر IBA بیشترین قطر را داشتند و شاخساره‌ها در محیط WPM با ترکیب هورمونی، BA با غلظت ۱ میلی‌گرم در لیتر و IBA با غلظت ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر کمترین قطر شاخساره را به خود اختصاص دادند (جدول ۴). نتایج نشان داد، نوع محیط کشت و ترکیبات هورمونی، بر افزایش قطر شاخساره‌های تولیدشده مؤثر می‌باشند. به نظر می‌رسد با تغییر غلظت عناصر در محیط‌های کشت، نتایج بهتری حاصل می‌شود. محیط

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

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

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

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

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

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

مدت مدیدی است که نقش آن در ریشه‌زایی شناخته شده است و نقش مثبت اکسین‌ها بر القاء و توسعه پرموردیای ریشه به خوبی مستند است (Frett et al., 2001). در میان اکسین‌های مختلف، استفاده IBA برای تحریک ریشه‌زایی ریزقلمه‌ها به علت سمیت ضعیف و ثبات زیاد بسیار معمول است (Hartmann et al., 2007). سیتوکینین با غلظت خیلی کم به تشکیل ریشه کمک کرده ولیکن در غلظت زیاد از تشکیل آن جلوگیری می‌کند (Campbell et al., 2008).

نتایج مقایسه میانگین‌ها نشان داد، در محیط کشت با ترکیب هورمونی ۱ میلی‌گرم در لیتر IBA و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BA بیشترین درصد ریشه‌زایی مشاهده شد (جدول ۶). تشکیل ریشه‌های نابجا در شاخساره‌هایی که از طریق ریزازدیادی تکثیر شده‌اند یک مرحله اجباری در باززایی و تعیین‌کننده اثربخشی سیستم‌های تولید گیاه در شرایط *In vitro* است. تیمار اکسین یکی از عوامل مهمی است که توجه پژوهشگران را برای ریشه‌زایی شاخساره‌ها به خود جلب نموده است (Lambardi and Rugini, 2003) و

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

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

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

### تعداد ریشه

کردند که اثر غلظت تنظیم کننده رشد IBA بر ریشه‌زایی پایه GF677 متفاوت است به نحوی که بیشترین تعداد ریشه در غلظت ۲ میلی گرم در لیتر IBA مشاهده شد. ولی بیشترین طول ریشه در محیط کشت حاوی ۱ میلی گرم در لیتر IBA حاصل شد.

### قطر ریشه نمونه‌های تولیدشده

نتایج مقایسه میانگین‌ها نشان داد که بیشترین قطر ریشه در محیط کشت با ترکیب هورمونی ۱ میلی گرم در لیتر IBA و ۰/۵ میلی گرم در لیتر BA ثبت شد (جدول ۶). پژوهش‌ها نشانگر این است که ریشه‌دهی پایه GF677 در شرایط درون شیشه‌ای به نوع محیط کشت بستگی دارد (Sharifmoghaddam et al. (2011), (Kamali et al., 2006). گزارش کردند، بهترین محیط برای القای ریشه‌زایی پایه‌های GF677 محیط MS همراه با ۰/۵ میلی گرم در لیتر IBA می‌باشد.

### انتقال گیاهچه‌های ریشه‌دارشده به محیط سازگاری

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

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

### طول ریشه گیاهچه

نتایج مقایسه میانگین‌ها نشان داد، در محیط کشت MS همراه با ۱ میلی گرم در لیتر IBA و ۰/۵ میلی گرم در لیتر BA بیشترین طول ریشه حاصل شد (جدول ۶). (Ali et al. (2009) ناتوانی جهت القای ریشه‌های نابجا اغلب یک عامل محدود کننده در قلمه‌های معمولی و کشت بافت است. ریشه‌های تولیدشده در IBA بلندتر با شاخساره‌های با کیفیت بهتر در حالی که در NAA پاسخ ضعیف بود و تولید برگ‌های نکرده و ریزش برگ صورت می‌گرفت. (Nazarymoghaddam and Yadollahi (2012) گزارش

برگ و درصد ریزنمونه‌های باززایی شده، مناسب‌ترین محیط کشت در بین سایر محیط‌های کشت مورد استفاده می‌باشد. ترکیبات تنظیم کننده‌های رشد اثرات معنی‌داری بر روی صفات مختلف می‌گذارند و این تغییرات به صفت، نوع و غلظت تنظیم کننده‌های رشد بستگی دارد. هر دو تنظیم کننده‌های رشد اکسین و سیتوکینین در اندام‌زایی مهم هستند و به‌عنوان تسهیل کننده این فرایند عمل می‌کنند. مطابق نتایج، بهترین ترکیب تنظیم کننده‌های رشد به منظور باززایی شاخساره GF677، یک میلی گرم در لیتر BA و ۰/۵ میلی گرم در لیتر IBA بود. در محیط ریشه‌زایی نیز بهترین نتیجه در غلظت ۱ میلی گرم در لیتر IBA و ۰/۵ میلی گرم در لیتر BA به دست آمد. با این حال، نتایج این تحقیق با نتایج تحقیقات قبلی کمی متفاوت است و این اختلاف ممکن است به تفاوت وضعیت فیزیولوژیکی ریزنمونه‌ها نسبت داده شود.

### سپاس‌گزاری

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

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

### نتیجه‌گیری

به منظور ریزازدیادی در پایه GF677، محیط کشت‌های MS، B5 و WPM با غلظت‌های تنظیم کننده‌های رشد مختلف مورد مطالعه قرار گرفتند. نتایج نشان داد که گیاهچه‌های تولیدشده تحت تأثیر محیط و تنظیم کننده‌های رشد قرار می‌گیرند. محیط کشت MS جامد، با تولید، بیشترین تعداد شاخساره، بلندترین طول ساقه، بیشترین قطر ساقه، تعداد گره و فواصل میان‌گره، تعداد برگ و سطح

### References

- Akbarpour, E., Imani, A. and Ferdowskhah Yeganeh, S. (2017). Physiological and morphological responses of almond cultivars under in vitro drought stress. *Journal of Nuts*, 8(1), 61-72.
- Ali, A., Ahamad T., Abbasi, N. A., Hafez, I. and Ahmad, H. I. (2009). Effect of different concentrations of auxin on in vitro rooting of olive cultivar moraiolo. *Pakistan Journal Botany*, 41(3), 1223-1231.
- Andreu, P. and Marin, J. A. (2005). *In vitro* culture establishment and multiplication of the prunus rootstock Adesoto 101 (*P. insititia* L.) as affected by the type of propagation of the donor plant and by the culture medium composition. *Scientia Horticulturae*, 106(2), 258-267.
- Antonopoulou, C., Dimassi, K., Therios, I., Chatzissavvidis, C. and Tsirakoglou, V. (2005). Inhibitory effects of riboflavin (Vitamin B2) on the in vitro rooting and nutrient concentration of explants of peach rootstock GF-677. *Scientia Horticulturae*, 106(2), 268-272.
- Arab, M. M., Yadollahi, A., Shojaeiyan, A., Shokri, S. and Ghoghah, S. M. (2014). Effects of nutrient media, different cytokinin types and their concentrations on in vitro multiplication of G × N15 (hybrid of almond × peach) vegetative rootstock. *Journal of Genetic Engineering And Biotechnology*, 12(2), 81-87.
- Bagheri, S., Davoodi, D., Amiri, M. E., Bayanati, M. and Entesari, M. (2017). Effect of different culture media on the micropropagation of GF677. *Journal of Horticulture Science (Agricultural Sciences and Technology)*, 30(4), 616-623.

- Bakhtiari, F., Mozafari, J. and Abdollahi, H. (2017). A study on growth, propagation and rooting of Iranian native pears for developing *in vitro* conservation system. *Journal of Agricultural Biotechnology*, 8(4), 17-34.
- Balapour, Z., Hosseini Moghaddam, H., Zarei, M. and Mollashahi, M. (2019). Micro propagation of penta rootstock (*Prunus domestica*) in the two culture media (MS and B5). *Plant Productions*, 42(4), 441-454. [In Farsi]
- Bolandi, A. R., Hamidi, H. and Rezagholy, A. A. (2016). Effects of culture media and growth regulators on propagation of rootstock GF677 in tissue culture conditions. *Journal of Plant Research (Iranian Journal of Biology)*, 29(1), 1-14. [In Farsi]
- Campbell, N. A., Reece, J. B., Urry, L. A., Cain M. L. and Robert, B. (2008). *Biology* (8th ed.). San Francisco: Pearson, Benjamin Cummings.
- Channuntapipat, C., Sedgley, M. and Collins, G. (2003). Micropropagation of almond cultivars Nonpareil and NePlus Ultra and the hybrid rootstocks Titan × Nemaguard. *Scientia Horticulturae*, 98(4), 473-484.
- Choudhary, R., Chaudhury, R., Malik, S. K. and Sharma K. C. (2015). An efficient regeneration and rapid micropropagation protocol for Almond using dormant axillary buds as explants. *Indian Journal of Experimental Biology*, 53(7), 462-467.
- Dobranszki, J. and Teixeira da Silva, J. A. (2010). Micropropagation of apple a review. *Biotechnology Advances*, 28(4), 462-488.
- Durkovic, J. (2006). Rapid micropropagation of mature wild cherry. *Biologia Plantarum*, 50(3), 733-736.
- Eugene, K. K., Justin, Y. and Flori, A. (2007). Evidence for an interaction effect during *in vitro* rooting of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) somatic embryo-derived plantlets. *In Vitro Cellular Developmental Biology Plant*, 43(7), 456-466.
- Frett, N. A. G., Gett, A. G., Goulart, L. W. V., Pasquali, R. R., Termignoni, R. R. and Ferreira, A. G. (2001). Distinct effect of auxin and light on adventitious root development in *Eucalyptus saligna* and *Eucalyptus globules*. *Tree Physiology*, 21(7), 457-464.
- Gerdakaneh, M., Mozafari, A. A., Sioseh-Mardah, A. and Sarabi B. (2011). Effects of different amino acids on somatic embryogenesis of strawberry (*Fragaria ananassa* Duch.) *Acta Physiologiae Plantarum*, 33(5), 1847-1852.
- Haghgou Tabalvandani, M., Yadollahi, A., Atashkar, D., Kalatejari, S. and Eftekhari, M. (2014). Optimized root production during micropropagation of new Iranian apple hybrid rootstock (AZ X M9): Effects of Fe-EDDHA and thiamine. *International Journal of Advanced Biological and Biomedical Research*, 2(10), 2659-2662.
- Hartmann, H.T., Kester, D.E., Davies, F.T. and Geneve, R. L. (2007). *Plant propagation: Principle and practices*. New Delhi: Prentice-Hall.
- Hasan, S. Z. U., Ahmad, T., Hafizi, I. A. and Hussain, A. (2010). Direct plant regeneration from leaves of prunus rootstock GF677 (*Prunus amygdalus* × *P. persica*). *Pakistan Journal Botany*, 42(6), 3817-3830.
- Hazarika, B. N. (2003). Acclimatization of tissue-cultured plants. *Current Science*, 85(12), 1704-1712.
- Iskalan, C., Adiyaman Akba, F., Namlı, S., Tilkat, E. and Basaran, D. (2008). In vitro micropropagation of almond (*Amygdalus communis* L. cv. Nonpareil). *African Journal of Biotechnology*, 7(12), 1875-1880.
- Kamali, K., Majidi, E. and Zarghami, R. (2006). Micropropagation of GF677 rootstocks (*Prunus amygdalus* × *P. persica*). *Plant Genetics and Breeding*, 56(1), 175-177.
- Karimi, G., Ghorbanli, M., Heidari, H., Khavari-Nejad, R. A. and Assareh, M. H. (2005). The effects of NaCl on growth, water relations, osmolytes and ion content in *Kochia prostrata*. *Biologia Plantarum*, 49(2), 301-304.

- Khodaei Chegini, F., Abdollahi, H., Ershadi, A. and Aasni ashari, M. (2011). Determination of Micropropagation Protocol for OH × F333 and OH × F69 Pear Clonal Rootstocks. *Seed and Plant Production Journal*, 27(3), 312-297.
- Kieber, J. J. (2002). Tribute to folke skoog: Recent advances in our understanding of cytokinin biology. *Journal of Plant Growth Regulation*, 21(1), 1-2.
- Kose, S. and Canli, F. A. (2015). In vitro propagation and rooting of 'Garnem' (*P. persica* × *P. dulcis*) rootstock. *Plant Molecular Biology and Biotechnology*, 5(1), 25-30
- Lambardi, M. and Rugini, E. (2003). Micropropagation of olive (*Olea europaea* L.). In: S. M. Jain and K. Ishii (Eds.), *Micropropagation of woody trees and fruits* (PP. 621-646). Dordrecht: Kluwer Academic Publishers.
- Mohamadzadeh Moghadam, N. and Hamidi H. (2017). Investigating the effects of medium, sterilization and hormonal treatment on micropropagation of some apple (*Mallus domestica* Borkh.) rootstocks. *Plant Productions*, 40(1), 41-54. [In Farsi]
- Nazarymoghaddam, R. and Yadollahi, A. (2012). Micropropagation of GF 677 rootstock. *Journal of Agricultural Science*, 4(5), 131-138.
- Pilar, A. and Marin, J.A. (2005). In vitro culture establishment and multiplication of the prunus rootstock 'Adesoto 101' (*P. insititia* L.) as affected by the type of propagation of the donor plant and by the culture medium composition. *Scientia Horticulturae*, 106(2), 258-267.
- Ruzic, D. J. V. and Vujovic, T. I. (2008). The effect of cytokinin types and their concentration on in vitro, multiplication of sweet cherry cv. *Horticultural Science*, 35(1), 12-21.
- Ruzic, D., Saric, M., Cerovic, R. and Culafic, L. (2003). Contents of macroelements and growth of sweet cherry rootstock in vitro. *Biology of Plants*, 47(3), 463-465.
- Sharifmoghaddam, N., Safarnejad, A. and Tabatabaei, S. M. (2011). The effect of plant growth regulators on callus induction and regeneration of GF677 rootstock. *International Journal of Science and Nature*, 2(4), 805-808.
- Shehata, W. F. and Al-Khayri, J. M. (2013). Conservation of endangered hassawi peach (*Prunus persica* L.) through micropropagation. *Journal of Biological Sciences*, 13(2), 75-81.
- Tatarivernosafadarani, M., Mousavi, S. A. and Buzarim, N. (2012). Micropropagation of some clonal root stocks of stone fruits. *Seed and Plant Improvement Journal*, 28(1), 53-66. [In Farsi]



© 2020 by the authors. Licensee SCU, Ahvaz, Iran. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution-Non Commercial 4.0 International (CC BY-NC 4.0 license) (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>)