مجله به‌نژادی نهال و بذر
جلد ۱-۲۶، شماره ۱، سال ۱۳۸۹

اثر محیط کشت و تنظیم‌کننده‌های رشد بر پرآوری و ریشه‌زایی پایهٔ رویشی محلب (سنت لوسی ۶۴)

Effects of Culture Media and Growth Regulators on Proliferation and Rooting of a Vegetative Mahlab Rootstock (SL-64)

مرتضی مهدویان[۱]، ناصر بوذری[۲] و حمید عبداللهی[۲]

۱- دانشجوی سابق کارشناسی ارشد باغبانی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات، تهران
۲- استادیار، موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر، کرج

تاریخ دریافت: ۱۳۸۸/۱/۲۰ تاریخ پذیرش: ۱۳۸۸/۹/۱۲

چکیده

مهدویان، م.، بوذری، ن.، و عبداللهی، ح. ۱۳۸۹ اثر محیط کشت و تنظیم‌کننده‌های رشد بر پرآوری و ریشه‌زایی پایهٔ رویشی محلب (سنت لوسی ۶۴). **مجله به‌نژادی نهال و بذر ۱-۲۶:** ۲۶ - ۱۵.

پایهٔ سنت لوسی ۶۴ (SL-64) محلب (*Prunus mahaleb* L.) پایه‌ای نیمه پاکوتاه و سازگار با ارقام گیلاس و آلبالو است. در این تحقیق اثر محیط کشت‌های مختلف و تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی در استقرار، پرآوری و ریشه‌دهی این پایه مورد آزمون قرار گرفت. استقرار اولیه با استفاده ریزنمونه‌های شاخساره‌های انتهایی و جوانه‌های جانبی گیاهان یک سالهٔ گلدانی رشد یافته در شرایط گلخانه انجام شد. پرآوری ریزنمونه‌ها با استفاده از شش محیط مختلف ارزیابی شد. نتایج مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون دانکن نشان داد که محیط کشت DKW همراه با نیم میلی‌گرم در لیتر بنزیل آدنین با نرخ تکثیری حدود ۶/۰۶ شاخسارهٔ جدید به ازاء هر ریزنمونهٔ اولیه بهترین محیط برای پرآوری این پایه بود. محیط‌های $MS + 1mgl^{-1}$ BA و $MS + 0.5mgl^{-1}$ BA با تولید ۴/۰۶ و ۳/۸۱ شاخساره جدید به ازاء هر ریزنمونه به ترتیب در مراحل بعدی قرار گرفتند. نتایج حاصل از بررسی محیط‌های مختلف ریشه‌دهی بعد از چهار هفته نشان داد که محیط کشت DKW بدون هورمون با ریشه‌دهی صددرصد ریزنمونه‌ها بهترین محیط بود. محیط‌های MS با یک میلی‌گرم در لیترIBA و همچنین QL تغییر یافته، با ۸۱ درصد ریشه‌دهی به ازاء هر ریزنمونه در مراحل بعدی قرار گرفتند. به منظور سازگاری نمونه‌های ریشه‌دار شده از محیط حاوی پیت‌ماس، کوکوپیت و پرلایت (۱:۲:۲حجمی) استفاده شد که در نهایت گیاهچه‌های سالم، شاداب و با رشد مطلوب تولید شدند.

واژه‌های کلیدی: محلب، پایه SL-۶۴، کشت بافت، تنظیم‌کننده‌های رشد، ریزازدیادی.

نویسنده مسئول: bouzari1111@yahoo.com

Archive of SID
www.SID.ir

مقدمه

یکی از نکات بسیار مهم در ایجاد باغات جدید استفاده از پایه‌های رویشی است. این پایه‌ها به دلایل متعدد از جمله یکنواختی اندازه درخت، مدیریت کارآ در برنامه‌های داشت و برداشت در باغ، مقاومت به بعضی از آفات و بیماری‌ها، تولید محصول یکنواخت و عملکرد بالا در واحد سطح، هر روزه اهمیت بیشتری پیدا می‌کنند. این طیف وسیع کارآیی پایه‌های رویشی سرانجام منجر به کاهش هزینه‌های تولید و ایجاد درآمد بالاتر برای باغدار می‌شود. پایه‌های محلب، معمولاً پایه‌هایی با رشد متوسط برای گیلاس هستند و درختان پیوند شده روی این پایه‌ها بر خلاف درختانی که روی پایه‌های بذری پیوند شده‌اند رشد بی‌رویه ندارند. به هر حال پایه‌های محلب درختان متوسط تا بزرگی با وضعیت رویشی خوب و میوه‌دهی در سنین پائین‌تر می‌دهند. پایه‌های محلب در مقایسه با مازارد دارای عادت رشدی پهن‌تر و گسترده‌ای هستند. اما پایه‌های بذری (پایهٔ مازارد) رشد طولی بیشتری را القاء می‌کنند. نهال‌های محلب حالات متنوعی از ویژگی‌ها را نشان می‌دهند. پایه‌های محلب که دارای سیستم ریشه‌ای عمیق هستند، گیاهان را در برابر شرایط خشکی مقاوم می‌کنند. محلب در زمین‌هائی که سطح آب بالا و ضخامت لایهٔ خاک کم باشد، به دلیل عدم مقاومت در مقابل رطوبت بالای خاک و حساسیت به قارچ فیتوفتورا موفق نیستند (Hartmann and Kester, 1983).

پایهٔ رویشی سنت لوسی ۶۴ (SL-64) در سال ۱۹۵۴ توسط M. Thomas گزینش شد. این پایه در خاک‌های قلیایی و سنگریزه‌ای خوب رشد می‌کند و تا حدودی از طریق قلمهٔ چوب نرم و چوب سخت قابل تکثیر است، اما قلمه‌های آن در مقایسه با پایه‌های رویشی دیگر محلب نظیر IK-M9، T-36 و P-1 قابلیت ریشه‌زایی کمتری دارند (Christov and Koleva, 1995). در مورد باززایی از کالوس پایه‌ها و ارقام مختلف گیلاس (Webster, 1980؛ James *et al.*, 1984؛ Bhagwat and David Lane, 2004؛ Durkovic, 2006) و ارگانوژنز کالوس تولید شده از ریشه در گونه‌های مختلف جنس Prunus (Gayner *et al.*, 1980؛ Druart, 1980) گزارش‌هائی وجود دارد، اما در سال‌های اخیر ریز ازدیادی پایه‌ها و گونه‌های مختلف جنس Prunus از ابعادگوناگون مانند تأثیر فراوانی واکشت شاخساره‌ه (Grant and Hammatt, 1999)، تأثیر کربوهیدرات‌ها (Harada and Murai, 1996؛ Nowak *et al.*, 2004) مقایسه منابع مختلف آهن در محیط کشت (Molassiotis *et al.*, 2003)، تأثیر ترکیبات مختلف تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی (Pruski *et al.*, 2000)، کاربرد میکوریزا در حفاظت گیاهان ریزازدیادی شده از بیمارگر، پس از انتقال آن‌ها به خاک (Hammerschlag and Scorza, 1991؛

Archive of SID

www.SID.ir

(Marn *et al.*, 2003؛ Hammatt, 1999) و تأثیر غلظت‌های مختلف نمک‌ها بر رشد ریزنمونه (Ruzič *et al.*, 2003) مورد مطالعه و ارزیابی قرار گرفته است. در این تحقیق تأثیر محیط کشت و تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی جهت دستیابی به یک محیط کشت مناسب برای ریزازدیادی پایهٔ رویشی SL-64 که برای بسیاری از مناطق ایران با خاک‌های خشک و قلیایی مناسب است، مورد بررسی و مطالعه قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

در این بررسی از پایهٔ رویشی SL-64 که در سال ۱۳۸۵ توسط بخش تحقیقات باغبانی موسسه تحقیقات اصلاح و تهیهٔ نهال و بذر از کشور ایتالیا وارد شد، استفاده شد. ریزنمونه‌ها در فصل تابستان از جوانه‌های انتهایی و جانبی شاخه‌های نیمه خشبی نهال‌های یکساله گلدانی که در شرایط گلخانه قرار داشتند تهیه شدند. ابتدا برای ضدعفونی سطحی، نمونه‌ها در محلول ۵۰٪ هیپوکلریت سدیم به مدت ۱۵ دقیقه قرار گرفتند. برای حصول اطمینان از ضدعفونی کامل، نمونه‌ها سه مرتبه با آب مقطر استریل شستشو شدند. دو انتهای سفید شده نمونه با تیغ اسکالپل برش داده شد و در لوله‌های آزمایش ۱۵ یا ۱۸ × ۲/۵ سانتی‌متری که هر کدام حاوی ۱۰ میلی‌لیتر محیط کشت آگاردار QL تغییریافته، بدون تنظیم‌کننده‌های رشد بودند، قرار داده شدند. بعد از دو هفته، ریزنمونه‌های رشد یافته به شیشه‌های کشت بزرگ‌تر حاوی ۴۰-۵۰ میلی‌لیتر از محیط کشت غذایی منتقل شدند. بعد از ۳-۲ مرحله واکشت به فاصله زمانی چهار هفته، نمونه‌ها به محیط کشت‌های پرآوری انتقال داده شدند. محیط‌های کشت پرآوری شامل شش محیط بودند که برای این منظور از محیط‌های پایهٔ MS و QL تغییر یافته و DKW با $30\ gl^{-1}$ ساکاروز و ۰/۶ درصد آگار و سایر تنظیم‌کننده‌های رشد استفاده شد. pH برای همهٔ محیط‌های پرآوری ۵/۷۵ بود که قبل از اتوکلاو کردن (به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۱۲۱°C) تنظیم شده بود و تمامی محتویات محیط با هم اتوکلاو شدند. به منظور ارزیابی محیط‌های مختلف برای پرآوری، تعداد شاخساره‌های تولیدی در هر تکرار شمارش و سپس نرخ تکثیر که حاصل تعداد شاخسارهٔ تولید شده به ازاء شاخسارهٔ کشت شده بود برآورد شد (Durkovič, 2006؛ Sedlak and Paprštein, 2008؛ Ruzič and Vujovič, 2008). در مرحلهٔ ریشه‌زایی نیز شاخساره‌ها با طول تقریبی ۳-۲ سانتی‌متر به شیشه‌های کشت (400ml) حاوی ۴۰-۵۰ میلی‌لیتر از انواع محیط‌های پایه شامل DKW و MS (با ۱/۲ ماکروالمان‌ها و مقدار کامل ماکروالمان‌ها) و DKW همراه با مقادیر مختلفی از تنظیم‌کننده‌های رشد و pHهای مختلف به همراه ۰/۶ درصد آگار مورد بررسی قرار گرفتند. نتایج مربوط به محیط‌های ریشه‌زایی نیز همچون محیط‌های پرآوری در

Archive of SID

www.SID.ir

پایان هفته چهارم مورد ارزیابی قرار گرفت و یادداشت‌برداری‌های لازم انجام شد.

گیاهچه‌های ریشه دار شده بعد از ۴-۲ هفته، به گلدان‌های کوچک پلاستیکی با قطر ۷ سانتی‌متر که محتوی مخلوط حجمی (۱:۲:۲) از پیت‌ماس، کوکوپیت و پرلایت بودند و با محلول ۲ در هزار از کود مایع فوسامکو و نیز محلول ۲ در هزار از قارچ کش مانکوزب تیمار شده بودند منتقل شدند ودر اتاق رشد کنترل شده با دمای ۲۳ درجهٔ سانتی گراد و ۱۶ ساعت فتوپریود زیر نور سفید خنک فلورسنت و لامپ‌های زرد گازی (۴۰۰۰ لوکس) قرار گرفتند. گیاهچه‌ها به همراه گلدان‌های مربوطه در داخل کیسه‌های پلاستیکی شفاف برای حفظ رطوبت نگهداری شدند و بعد از گذشت ده روز از انتقال، سازگاری با هوادهی روزانه به تدریج شروع و پس از گذشت حدود ده هفته مراحل آن تکمیل شد. آزمایش‌ها در قالب طرح‌های کاملاً تصادفی اجرا شد. هر تیمار شامل چهار تکرار و هر تکرار حاوی چهار ریزنمونه بود. تجزیهٔ آماری با استفاده از نرم‌افزار SAS انجام شد ونمودارها با نرم‌افزار Sigma Plot ترسیم شدند.

نتایج و بحث

محیط کشت‌های مختلف به کار برده شده در مراحل مختلف در جدول‌های ۱، ۲ و ۳ نشان داده شده‌اند.

نرخ آلودگی برای استقرار اولیه ریزنمونه‌ها حدود ۴٪ و برای واکشت‌های بعدی کمتر از ۱٪ بود. در نمونه‌برداری‌های انجام شده در ابتدای اسفند ماه از گیاهان رشد یافته در شرایط مزرعه، نرخ آلودگی در ریزنمونه‌هایی که با هیپوکلریت سدیم هم ضدعفونی شده بودند، از ۴٪ بالاتر نبوده است. برای بررسی بهترین محیط کشت و تأثیر تنظیم‌کننده‌های رشد پرآوری از شاخساره‌های ۲-۱ سانتی‌متری در محیط‌های مختلف استفاده شد. در پایان هفته چهارم، تعداد و ارتفاع شاخساره‌ها، شادابی و توسعهٔ برگی برای همهٔ نمونه‌ها ثبت شد. تشکیل شاخساره‌های جانبی همراه با رشد سریع شاخساره در محیط‌های مختلف مشاهده شد. تشکیل کالوس در قسمت پائین شاخساره‌ها القاء شده و شاخساره‌های جدید از این پینه‌ها متمایز شدند. شاخه‌زایی این شاخساره‌ها در زاویهٔ برگی آن‌ها نیز مشاهده شد. پرآوری شاخساره تحت تأثیر غلظت تنظیم‌کننده‌های رشد خصوصاً سایتوکینین و محیط غذایی پایه بود. در بین محیط‌ها، محیط کشت DKW+ 0.5 mgl^{-1}BA منجر به تولید ۶/۰۶ شاخسارهٔ جدید شد (شکل ۱) در حالی که در محیط کشت MS + 1mgl^{-1}BA و نیز محیط MS + 0.5mgl^{-1}BA، تولید شاخساره‌های جدید به ازاء هر ریز نمونه به ترتیب ۴/۰۶ و ۳/۸۱ بود (جدول ۴). در محیط‌های حاوی عناصر پر مصرف تغییر یافتهٔ QL، ۱/۵ برابر عناصر کم مصرف MS، تیامین 0.15mgl^{-1} و گلایسین 1mgl^{-1}، در

Archive of SID

www.SID.ir

جدول ۱- انواع محیط کشت‌های استفاده شده در مرحلهٔ پرآوری

Table 1. Types of media used for shoot proliferation stage

Medium	Plant Growth Regulators
DKW	0.5 mgl^{-1} BA
MS	1 mgl^{-1} BA
MS	0.5 mgl^{-1} BA
Modified QL1	0.5 mgl^{-1} BA, 0.5 mgl^{-1} GA3 and 0.01 mgl^{-1} NAA
Modified QL2	2 mg l^{-1} BA and 0.01 mg l^{-1} IBA
Modified QL3	no plant growth regulators

جدول ۲- ترکیب محیط L تغییر یافتهٔ مورد استفاده در مرحلهٔ پرآوری و ریشه‌زایی

Table 2. Composition of modified QL medium in proliferation and rooting stage

NH_4NO_3	0.40 mgl^{-1}
$Ca(NO_3)$, $4H_2O$	1.20 mgl^{-1}
$MgSO_4$. $7H_2O$	0.36 mgl^{-1}
KNO_3	2.10 mgl^{-1}l
KH_2PO_4	0.27 mgl^{-1}
$MnSO_4$. H_2O	16.90 mgl^{-1}
$CuSO_4$. $5H_2O$	0.025 mgl^{-1}
$CoCl_2$. $6H_2O$	0.025 mgl^{-1}
$ZnSO_4$. $7H_2O$	8.60 mgl^{-1}
H_3BO_3	6.20 mgl^{-1}
Na_2MoO_4. $2H_2O$	0.25 mgl^{-1}
KI	0.83 mgl^{-1}
FeNaEDTA	20.00 mgl^{-1}
Nicotinic acid	0.50 mgl^{-1}
Pyridoxin	0.50 mgl^{-1}
Thiamine	0.15 mgl^{-1}
Glysine	1.00 mgl^{-1}
Sucrose	30.00 gl^{-1}

جدول ۳- مشخصات انواع محیط‌های ریشه‌زایی

Table 3. Characteristics of rooting medium

Media	محیط پایه	Hormone contend	pH
MS(H-free)	MS	No hormone	5.75
QLM (6.2)	QL Modified	No hormone	6.20
DKW (H-free)	DKW	No hormone	5.75
MS (1/2)	MS, 1/2 Macroelem.	0.1 mgl^{-1} BA + 0.1 mgl^{-1} NAA	5.75
DKW (5.7)	DKW	0.1 mgl^{-1} BA + 0.1 mgl^{-1} NAA	5.75
DKW (6.2)	DKW	0.1 mgl^{-1} BA + 0.1 mgl^{-1} NAA	6.20
QLM (5.7)	QL Modified	No hormone	5.75
MS-1.IBA	MS	1 mgl^{-1} IBA	5.75
MS-0.5IBA	MS	0.5 mgl^{-1} IBA	5.75
MS-1NAA	MS	1 mgl^{-1} NAA	5.75
QL.M3	QL Modified	No hormone	5.75

Archive of SID

www.SID.ir

شرایط بدون هورمون پرآوری ۳/۱۳ و همین محیط به همراه $0.5mgl^{-1}$BA و $0.5mgl^{-1}$GA3 و $0.01mgl^{-1}$NAA، میزان پرآوری ۴/۵ و در شرایطی که با $2mgl^{-1}$BA و $0.01mgl^{-1}$ IBA همراه بود پرآوری ۳/۵ بود. در مجموع نتایج نشان داد که بهترین محیط برای پرآوری شاخساره‌های این پایه، محیط DKW+$0.5mgl^{-1}$BA بوده است و بین محیط‌های مورد آزمون، از نظر آماری تفاوت معنی‌داری در سطح ۱٪ مشاهده شد (جدول ۵).

بهترین تشکیل ریشه در محیط DKW بدون هورمون مشاهده شد که به القاء صددرصد ریشه‌زایی منجر شد (شکل ۱). در محیط ریشه‌زایی MS+$1mgl^{-1}$IBA ، ۸۱ درصد ریشه‌زایی مشاهده شد. در محیط محتوی عناصر پر مصرف تغییر یافته QL و ۱/۵ برابر عناصر کم مصرف MS، تیامین $0.15mgl^{-1}$ گلایسین $1mgl^{-1}$ و بدون هورمون نیز ۸۱ درصد ریشه‌زایی مشاهده شد (جدول ۴)، که البته در این محیط رشد بخش‌های هوایی بسیار خوب بود و در مقایسه با سایر محیط‌ها بیشترین توسعهٔ برگی را داشت و با توجه به کیفیت بالای ریشه در آن، این محیط برای مرحلهٔ سازگاری مناسب‌ترین محیط بود (جدول ۴). در این محیط کشت، پرآوری شاخساره‌ها (۳/۱۳ شاخسارهٔ جدید برای هر ریزنمونه) نیز انجام شد که در مرحلهٔ سازگاری برخی از آن‌ها حذف شدند. بین محیط‌های مورد آزمون در این مرحله نیز، از نظر آماری تفاوت معنی‌داری در سطح ۱٪ مشاهده شد (جدول ۶). سازگاری گیاهچه‌ها تحت تأثیر مستقیم شرایط مرحلهٔ ریشه‌دهی بود. گیاهچه‌هائی که پس از مدت کوتاهی از ظهور ریشه در محیط کشت ریشه‌دهی به گلدان منتقل شدند بهترین نرخ بقاء را داشتند. نگه‌داشتن گیاهچه‌ها در محیط ریشه موجب طویل شدن ریشه شده اما با گذشت زمان و قهوه‌ای شدن آن موجب بقاء کمتر آن‌ها شد. نتایج مرحلهٔ سازگاری نشان داد محیط‌هایی که توسعهٔ برگی و رشد عمومی قوی‌تری را در مرحلهٔ پرآوری و در نتیجه کیفیت بالاتری را در مرحله ریشه‌زایی القاء کرده بودند (محیط حاوی عناصر پرمصرف تغییر یافتهٔ QL، ۱/۵برابر عناصر کم مصرف MS، تیامین $0.15mgl^{-1}$ و گلایسین $1mgl^{-1}$) منجر به سازگاری و بقاء بهتری نسبت به سایر محیط ها شدند.

گزارش‌های زیادی وجود دارد که در آن‌ها از محلول کلرور جیوه برای ضدعفونی سطحی ریزنمونه‌های گونه‌های مختلف گیلاس و جنس Prunus استفاده شده و نتایج به دست آمده موفق بوده است (Muna *et al.*, 1999؛ Durkovič, 2006؛ Andreu and Marin, 2005).

برعکس، در ۴۴٪ از رقم Karešova و ۵۲٪ از رقم Rivan ریز نمونه‌های اولیه منجر به توسعه شاخساره نشده‌اندکه این به دلیل سمیت کلرور جیوه مصرفی (۱۵٪ برای یک دقیقه) برای دو رقم ذکر شده فوق است (Sedlak and Paprštein, 2008).

گزارش‌های زیادی مبنی بر موفقیت

Archive of SID

www.SID.ir

جدول ۴- مقایسهٔ میانگین تیمارها و صفات درصد شاخساره های ریشه دار شده، تعداد ریشه به ازاء هر گیاهچه، تعداد شاخساره های جانبی و توسعهٔ برگی در محیط‌های مختلف کشت

Table 4. Comparison of means of percent of rooted shoots, number of roots per plantlet, number of axillary shoots and leaf development in different media

محیط‌های ریشه‌زایی Rooting media			محیط‌های پرآوری Proliferation media		
محیط Media	درصد شاخساره‌های ریشه‌دار شده Percent of rooted shoots	تعداد ریشه در هر گیاهچه Number of roots per plantlet	محیط media	تعداد شاخساره‌های جانبی Number of axillary shoots	توسعهٔ برگی Leaf development
MS (H-free)	75abc	5.2abc	DKW+0.5BA	6.06a	3.5c
DKW (H-free)	100a	5.9a	MS+1BA	4.06b	3.0d
MS (1/2)	25de	5.7ab	MS+0.5BA	3.81b	4.0b
DKW (5.7)	58bcd	2.9abcd	Modified QL1	4.5b	3.0d
QLM (5.7)	37cde	2.4bcd	Modified QL2	3.5b	3.0d
MS+1 IBA	81ab	3.0abcd	Modified QL3	3.13b	5.0a
MS+0.5 IBA	58bcd	2.0bcd			
MS+1 NAA	20de	1.0bcd			
Modified QL3	81ab	3.3abc			

میانگین ها با حروف مشابه در هر ستون، فاقد اختلاف معنی داری در سطح احتمال ۱٪ هستند.

Means with similar letters in each column are not significantly different at 1% probability level.

شکل ۱– پرآوری در محیط DKW+ 0.5 mgl^{-1} BA (راست)، محیط کشت ریشه زایی DKW بدون هورمون(چپ)

Fig. 1. Proliferation medium containing DKW + 0.5 mgl^{-1} BA (right), rooting medium DKW without growth regulators (left)

ضدعفونی سطحی ریزنمونه‌های گیلاس با استفاده از هیپوکلریت سدیم نیز وجود دارد (Hammatt and Grant, 1997؛ Pruski *et al.*, 2000؛ Pruski *et al.*, 2005؛ Kalinina and Brown, 2007). در این تحقیق هم هیپو کلریت سدیم و هم کلرور جیوه برای

www.SID.ir

ضدعفونی اولیهٔ ریزنمونه‌ها استفاده شد. برای نمونه‌هایی که از گیاهان رشد یافته درگلخانه و یا محیط‌های درون شیشه‌ای برداشته شدند به دلیل کوتیکول‌های حساس و ضعیف از هیپوکلریت سدیم استفاده شد و برای نمونه‌هایی که از گیاهان رشد یافته در شرایط مزرعه و در فصل زمستان برداشته شدند به دلیل کوتیکول ضخیم‌تر از کلرور جیوه استفاده شد که هر دو مورد منتج به ضدعفونی موفق شد و میزان آلودگی بسیار پائین بود. در سه محیط شامل MS+1mgl^{-1}BA و نیز محیط QL تغییریافته به همراه 0.5mgl^{-1}BA، 0.5mgl^{-1}GA3 و 0.01mgl^{-1}NAA، و همین محیط همراه با 2mgl^{-1}BA و 0.01mgl^{-1} IBA، شیشه‌ای شدن (Vitrification) و آبدار شدن بافت‌ها همراه با قرمز شدن رنگ ساقه مشاهده شد (جدول ۴). تمام محیط کشت‌هایی که شیشه‌ای شدن گیاهچه‌ها در آن‌ها مشاهده شده بود، وقتی که در مرحله‌ای دیگر به صورت محیط کشت دو قسمتی حاوی محیط کشت مایع (بدون آگار) و پرلایت تهیه شده بودند، دیگر حالت شیشه‌ای شدن را در گیاهچه‌ها ایجاد نشد. این مسئله توسط Damiano *et al.* (2002) نیز گزارش شده است. شاخساره‌های محوری مستقیماً از ریزنمونه‌های بریده شدهٔ اولیه القاء شدند. در قسمت پائین ریزنمونه کالوس تشکیل شد و شاخساره‌های نابجا از آن تمایز یافتند. شاخه‌زایی محوری در زاویه برگ‌ها مشاهده شد که البته این روش بهتر از روش تمایز شاخساره‌ها از کالوس است که گاهاً ممکن است منتج به تولید گیاهان غیر معمول از نظر سیتولوژیک شود. حضور سایتوکینین در محیط کشت برای تشکیل شاخساره‌های جدید، مهم‌ترین نقش را داشت. در تجزیه اثر چهار نوع سایتوکینین BA، کینتین، 2ip و TDZ، در ریزازدیادی گیلاس رقم Lapins، BA بهترین نوع سایتوکینین برای فاز تکثیر و پرآوری بود. (Ruzič and Vujovič, 2008). در حضور BA پرآوری در پای شاخساره‌ها انجام می‌شود ولی این شاخساره‌های جانبی، از نوع محوری بوده و به ندرت از شاخساره‌های نابجا هستند (Muna *et al.*, 1999).

نقش و اثر BA در شکستن غالبیت انتهایی و تحریک رشد شاخساره‌های جدید است، بنابراین با افزایش غلظت بنزیل آدنین در محیط (MS+ 1mgl^{-1}BA به MS + 0.5mgl^{-1}BA) شاخساره‌های بیشتر اما کوتاه‌تری تولید شدند. این نکته توسط (Pruski *et al.*, 2005) نیز تأیید شده است. یکی دیگر از اثرهای BA در محیط، ممانعت کامل یا نسبی از تشکیل ریشه است.در محیط‌های پرآوری استفاده از 0.5mgl^{-1}GA3 در محیط با پایهٔ عناصر پرمصرف تغییر یافتهٔ QL و۱/۵ برابر عناصر کم مصرف MS به همراه تیامین 0.15mgl^{-1} و گلایسین 1 mgl^{-1} حاوی0.5mgl^{-1}BA و 0.01mgl^{-1}NAA در مقایسه با همین محیط پایه و حاوی 2mgl^{-1}BA و0.01mgl^{-1}IBA بعد از شش هفته، ریشه‌زایی راحت‌تری داشتند.

Archive of SID

www.SID.ir

جدول ۵- جدول تجزیهٔ واریانس صفات مختلف در مرحلهٔ پرآوری

Table 5. Analysis of variance of different characteristics in proliferation stage

			میانگین مربعات MS					
S.O.V.	منابع تغییرات	درجهٔ آزادی df.	تعداد شاخساره Shoot number	طول شاخساره Shoot height	رشد رویشی Vigorous	توسعهٔ برگی Leaf development	شیشه‌ای شدن Vitrification	میانگره‌های طویل شده Longinternod
Media	محیط کشت	5	4.29**	0.36ns	1.31**	2.56**	2.44**	1.97**
Error	اشتباه آزمایشی	18	0.74	0.30	0.20	0.010	0.32	0.09
Total	مجموع	23	5.03	0.66	0.20	0.010	2.76	0.09
C.V (%)	ضریب تغییرات		20.6	20.7	11.37	1.000	10.40	33.15

ns , * و ** : به ترتیب غیر معنی دار، معنی دار در سطوح احتمال ۵ درصد و ۱ درصد.

ns, * and ** : Not significant, significant at 5% and 1% probability levels, respectively.

جدول ۶- جدول تجزیهٔ واریانس صفات مختلف مرحلهٔ ریشه زایی

Table 6. Analysis of variance of different characteristics in rppting stage

			میانگین مربعات MS					
S.O.V.	منابع تغییرات	درجهٔ آزادی df.	گیاهچه‌های ریشه‌دار شده Rooted plantlets	رشد رویشی Vegetative growth	درجهٔ آزادی df.	طول ریشه Root length	ضخامت ریشه Root thickness	تعداد ریشه Root number
Media	محیط کشت	10	9.49**	9.99**	10	7.08**	13.02**	37.28*
Error	اشتباه آزمایشی	33	0.37	0.21	93	0.98	1.04	2.83
Total	مجموع	43	0.37	0.21	103	8.06	14.07	40.11
C.V (%)	ضریب تغییرات		15.74	14.63		22.79	21.18	23.86

ns , * و ** : به ترتیب غیر معنی دار، معنی دار در سطوح احتمال ۵ درصد و ۱ درصد.

ns, * and ** : Not significant, significant at 5% and 1% probability levels, respectively.

که این می‌تواند به دلیل میزان BA کمتر و یا تأثیر GA3 باشد. تأثیر مثبت GA3 بر ریشه‌زایی بهتر رقم F12/1 نیز گزارش شده است (Hammatt and Grant, 1997). ضمناً در محیط حاوی GA3 افزایش طول میانگره معنی‌داری در مقایسه با سایر محیط‌های بدون GA3 مشاهده می‌شود. در محیط های ریشه‌زایی افزایش pH از ۵/۷ به ۶/۲ موجب تولید گیاهچه‌های بسیار ضعیف شده است. از طرفی دیگر در محیط غذایی حاوی عناصر پرمصرف تغییر یافته QL، ۱/۵ برابر عناصر کم‌مصرف MS، تیامین $0.15mgl^{-1}$ و گلاسین $1mgl^{-1}$ که

Archive of SID

www.SID.ir

فاقد هورمون بودند، به دلیل رشد اولیه مناسب شاخساره‌ها و تولید سایتوکینین طبیعی (کینتین)، در ادامه منجر به توسعهٔ برگی بسیار خوب، افزایش رشد بخش‌های هوایی و طویل شدن معنی‌دار ریشه شد. به نظر می‌رسد علت اساسی این رشد قابل توجه در بخش‌های هوایی و ریشهٔ گیاه مربوط به تولید کینتین در گیاه باشد. این تأثیر کینتین در تولید شاخساره‌های قوی و برگ‌های توسعه یافته همراه با پرآوری کم و نهایتاً القاء ریشه‌زایی بهتر توسط (Ruzič and Vujovič, 2008) مطرح شده است.

References

Andreu, P., and Marin, J. A. 2005. *In vitro* culture establishment and multiplication of prunus rootstock, Adesoto 101'(*P. insitita* L.) as affected by the type of propagation of donor plant and the culture medium composition. Scientia Horticulturae 106: 258-267.

Bhagwat, B., and DavidLane, W. 2004. *In vitro* shoot regeneration from leaves of sweet cherry (*Prunus avium*) 'Lapins' and 'Sweet heart'. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 78: 173-181.

Christov, C., and Koleva, A. 1995. Stimulation of root initiation in hardwood sweet and sour cherry rootstocks (*Prunus mahaleb* L.). Bulgarian Journal of Plant Physiology 21: 68-72.

Damiano, C., Liberali, M., Avanzato, D., and Preka, P. 1996. Micropropagation of *Pyrus communis* var. *pyraster*. Macfrut: Agro Biology 96: 132-133.

Druart, P. 1980. Plantlet Regeneration from root callus of different prunus species. Scientia Horticulturae 12: 339-342.

Durkovič, J. 2006. Rapid micropropagation of mature wild Cherry. Biologia Plantarum 50: 733-736.

Gayner, J. A., Jones, O. P., Watkins, R., and Hopgood, M. E. 1980. Regeneration of plants from callus. Annual Report of East Malling Research Station for 1979. pp. 187-188.

Grant, N. J., and Hammatt, N. 1999. Increased root and shoot production during micropropagation of cherry and apple rootstocks. Effect of subculture frequency. Tree Physiology 19: 899-903.

Hammatt, N., 1999. Delayed flowering in *Prunus avium* L. compared with rooted cutting and seedlings. Plant Cell Reproduction 18: 478-484.

Archive of SID

www.SID.ir

Hammatt, N., and Grant, N. J. 1997. Micropagation of mature British wild cherry. Plant Cell, Tissue and Organ Calture 47: 103-110.

Hammerschlag, F. A., and Scorza, R., 1991. Field performance of micropropagated, own-rooted peach trees. Journal of American of Society of Horticultural Science 116: 1089-1091.

Harada, H., and Murai, Y. 1996. Micropropagation of *Prunus mume*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 46: 265-267.

Hartman, H. T., and Kester, D. E. 1983. Plant Propagation, Principles and Practice. 4th. edition. Prentice-Hall, Englewood Cilffs, NJ Publishers, UK.

James, D. J., Passey, A. J., and Malhotra, S. B. 1984. Organogenesis in callus derived from stem and leaf tissue of apple and cherry rootstock. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 3: 333 -341.

Kalinina, A., and Brown, D. C. W. 2007. Micropropagtion of ornamental *Prunus* spp. and GF305 peach, a prunus viral indicator. Plant Cell Reproduction 26: 927-935.

Marin. J. A., Castillo, M., Garcia, E., and Andreu, P. 2003. Field performance of grafted fruit-tree rootstocks was not affected by micropropagation. Acta Horticulturae 616: 295-299.

Molassiotis, A. N., Dimassi, K., Therios, I., and Diamantidis, G., 2003. Fe-EDDHA promotes rooting of rootstock GF677 (*Prunus amygdalus*×*Prunus persica*) explants *in vitro*. Biol. Plant 47: 141-144.

Muna, A. S., Ahmad, A. K., Mahmoud, K., and Abdul-Rahman, K. 1999. *In vitro* propagation of a semi–dwarfing cherry rootstock. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 59: 203-208.

Nowak, B., Miczynski, K., and Hudy, L. 2004. Sugar uptake and Utilization during adventitious bud differentiation on *in vitro* leaf explants of 'Wegierka Zwykla' plum (*Prunus domestica*). Plant Cell, Tissue and Organ Culture 76: 255-260.

Pruski, K., Astatkie, T., Nowak, J. 2005. Tissue culture propagation of mongolian cherry (*Prunus froticosa*) and nanking cherry (*P. tomentosa*). Plant Cell, Tissue and Organ Culture 82: 207-211.

Pruski, K., Lewis, T., Astatkie, T., and Nowak, J. 2000. Micropropgation of chokecherry and pincherry cultivars. Plant Cell , Tissue and Organ Calture 63: 93-100.

Archive of SID

www.SID.ir

Ruzic, D., Saric, M., Cerovic, R., and Culafic, L. 2003. Contents of macroelements and growth of sweet cherry rootstocks *in vitro*. Biol. Plant 47: 463-465

Ruzič, D. V., and Vujovič, T. I. 2008. The effects of cytokinin types and their concentration on *in vitro* multiplication of sweet cherry cv. Lapins (*Prunus avium* L.) HortScience 35: 12-21.

Sedlak, J., and Paprštein, F. 2008. *In vitro* shoot proliferation of sweet cherry cultivars Karešova and Rivan. HortScience 35: 95–98.

Webster, A. D. 1980. Dwarfing rootstock for plums and cherries. Acta Horticulturae 114: 201-207.

Archive of SID

www.SID.ir