به زراعی کشاورزی
دوره ۱۶ ■ شماره ۲ ■ تابستان ۱۳۹۳
صفحه‌های ۳۵۱-۳۳۹

اثر محیط کشت و تنظیم‌کننده‌های رشد بر ریزازدیادی پایهٔ گزیلا ۶

زینب کارآمد *[۱]، ابراهیم گنجی مقدم[۲]، احمدرضا بلندی[۳]

۱. کارشناس ارشد باغبانی، گروه باغبانی، دانشکدهٔ کشاورزی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شیروان، شیروان، ایران.
۲. استادیار، گروه باغبانی، مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی خراسان رضوی، مشهد، ایران.
۳. استادیار، بخش تحقیقات اصلاح و تهیهٔ نهال و بذر، مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی خراسان رضوی، مشهد، ایران.

تاریخ وصول مقاله: ۱۳۹۲/۰۳/۱۸ تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۲/۱۱/۲۶

چکیده

این مطالعه با هدف بررسی اثر محیط کشت و تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی بر سرعت پرآوری، ریشه‌زایی و سازگاری پایهٔ گزیلا ۶ طی سال ۱۳۹۰-۹۱، در مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی خراسان رضوی انجام گرفت. از شش نوع محیط کشت شامل MS، WPM و DKW در دو حالت جامد و مایع (محیط مایع به‌همراه پرلیت) و تنظیم‌کننده‌های رشد TDZ و BAP در غلظت‌های صفر، یک و دو میلی‌گرم در لیتر به‌همراه ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر IBA در مرحلهٔ پرآوری و محیط‌های ذکرشده به‌همراهIBA در غلظت‌های صفر، یک، دو و سه میلی‌گرم در لیتر، در مرحلهٔ ریشه‌زایی استفاده شد. نتایج نشان داد بیشترین تعداد و طول شاخه به‌ترتیب به‌مقدار ۶/۴۸ شاخه و ۳/۱۴ سانتی‌متر در محیط WPM جامد دارای دو میلی گرم در لیتر BAP و محیط MSمایع با یک میلی گرم در لیتر TDZ و بیشترین درصد ریشه‌زایی و طول ریشه به‌مقدار ۹۳/۹۰ درصد و ۱۱/۷۶ سانتی‌متر، در محیط MS مایع دارای دو میلی‌گرم در لیتر IBA به‌دست آمد. با اینکه کاربرد محیط های کشت مایع در میانگین کلی به سازگاری بهتر گیاهچه‌ها منجر شد، بیشترین درصد بقای گیاهچه (۹۱/۸۰ درصد) در محیط WPMجامد با دو میلی‌گرم در لیتر IBA به‌دست آمد.

کلیدواژه‌ها: پایهٔ رویشی، پرآوری، ریشه‌زایی، سازگاری، گیلاس.

* نویسنده مسئول Email: zkaramad@gmail.com

۱. مقدمه

پایهٔ گزیلا ۶ (*Prunus cerasus* × *Prunus canescens*) از پایه‌های مناسب نیمه‌پاکوتاه‌کنندهٔ گیلاس است [۴]. این پایه به زودباردهی و عملکرد بالای محصول گیلاس منجر می‌شود. پایهٔ رویشی گزیلا ۶ دارای ویژگی‌های خاص و قابل استفاده برای بخش‌های زیادی از خاک و اقلیم کشور ایران است [۸] و باتوجه به اثر پاکوتاه‌کنندگی این پایه، استفاده از آن به‌منظور بهبود وضعیت تولید، ضروری به‌نظر می‌رسد.

در حال حاضر، استفاده از دان‌نهال‌ها و قلمه‌ها به‌دلیل تفرق ویژگی‌های پایه‌ها و دیر به بار نشستن درختان به‌کلی منسوخ شده است، درنتیجه یکی از راه‌های مناسب، استفاده از پایه‌های رویشی گزینش شده و تکثیر آن در مقیاس وسیع با حفظ صفات ژنتیکی، بدون محدودیت فصل و زمان، از طریق کشت بافت است که امکان تولید گیاهان عاری از بیماری را نیز فراهم می‌کند.

در تحقیقی، باززایی شاخه‌های نابجا از برگ‌ها و میانگره‌های پنج رقم تجاری گیلاس، اثر محیط‌های پایه، ترکیبات و غلظت هورمون‌های گیاهی، بازدارنده‌های اتیلنی مانند دی‌سولفات نقره بررسی شد. بهترین باززایی در محیط‌های کشت DKW [۱۰] و WPM [۱۵] به‌نسبت ۱:۱ و محیط QL [۲۳] به‌دست آمد. تیدیازورون در ترکیب با اسید ایندول بوتریک سبب افزایش باززایی و دی‌سولفات نقره سبب کاهش آن شد [۱۴]. در تکثیر سریع گیلاس وحشی، غلظت بنزیل آمینوپورین به‌مقدار زیادی بر درصد شاخه‌زایی مؤثر بود، به‌طوری‌که ترکیبی از ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر بنزیل آمینو پورین و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر تیدیازرون سبب افزایش شاخه‌زایی شد [۹].

در ریزازدیادی هیبریدی از گیلاس (*Prunus cerasus* × *Yedoensis matsum*)، شاخه‌زایی مطلوب در محیط MS با کاهش عناصر ماکرو به یک دوم و به‌ترتیب هورمون‌های ۰/۵، ۰/۱ و ۳ میلی‌گرم در لیتر بنزیل آدنین، اسید ایندول بوتریک و اسید جیبرلیک به‌دست آمد [۱].

در مطالعهٔ ریزازدیادی پایهٔ گیلاس گزیلا ۵[1] از محیط پایهٔ MS [۱۷] و تغییر در نمک‌های ماکرو به‌صورت (MS×2) محیط MS دارای دو برابر، (MS 1/2) دارای یک‌دوم و (MS 1/4) دارای یک‌چهارم نمک‌های ماکرو استفاده شد. نتایج پس از چند واکشت با فواصل مشخص نشان داد که pH محیط و وزن تر و خشک ریزنمونه در طول واکشت در محیط‌های (MS 1/4) و (MS 1/2) رو به کاهش بوده است و بیشترین رشد و نمو گزیلا ۵ در محیط پایهٔ MS و (MS×2) با جذب زیاد فسفر و پتاسیم به‌دست آمد که نشان دهندهٔ وابستگی رشد و نمو گزیلا ۵ به این دو عنصر بوده است [۲۵]. در بررسی اثر محیط‌های کشت (G1 بر پایهٔ محیط MS و G2 براساس محیط کشت WPM) و اثر IBA و NAA بر ریشه‌زایی درون‌شیشه‌ای پایهٔ رویشی گزیلا ۵ با استفاده از کشت نوک شاخساره، بهترین نتایج در محیط G2 و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر IBA به‌دست آمد [۳۰].

در ریزازدیادی پایهٔ رویشی گزیلا ۶، از محیط کشت‌های MS، 1/2MS، LS و LSتغییریافته به‌همراه BAP برای پرآوری و IBA برای ریشه‌زایی، در سه سطح صفر، یک و دو میلی‌گرم در لیتر استفاده شد که محیط کشت MS و غلظت یک میلی‌گرم در لیتر BAP برای پرآوری و محیط کشت MS به‌همراه یک میلی‌گرم در لیترIBA برای ریشه‌زایی، بهترین نتایج را داشت [۸]. در مطالعهٔ دیگری با هدف بررسی تأثیرات IBA و میواینزیتول بر ریشه‌زایی دو پایهٔ گیلاس گزیلا ۶ و CAB-6P، بیشترین تولید ریشه، وزن تر و مادهٔ خشک برای ریزنمونهٔ گزیلا ۶ در محیط MS دارای دو میلی‌گرم در لیتر IBA به‌همراه ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر میواینزیتول و بیشترین درصد ریشه‌زایی

1. Gisela 5

(صددرصد) در محیط دارای یک میلی‌گرم در لیتر IBA به‌تنهایی به‌دست آمد [۲۸].

گزارش‌های دیگری نیز در مورد کشت درون‌شیشه‌ای درختان میوه وجود دارد که می‌توان به بررسی مرحلهٔ ریشه‌زایی و سازگاری پایه‌های پرونوس [۲۴]، ریزازدیادی ارقام مختلف گیلاس [۳، ۵، ۶، ۱۱، ۱۴ ، ۲۲، ۲۶، ۲۷، ۲۹، ۳۱]، زردآلو [۲۰ و ۲۱] و آلو [۱۳] اشاره کرد. با توجه به مطالب ذکرشده و این مسئله که درختان میوهٔ هسته دار از نظر شاخه‌زایی و ریشه‌زایی در شرایط درون‌شیشه‌ای بسیار سرسخت‌اند [۲۰]، گزینش محیط‌های کشت تخصصی برای توسعهٔ سیستم ریزازدیادی در درختان میوهٔ هسته‌دار لازم به‌نظر می‌رسد.

هدف از پژوهش حاضر، بررسی تأثیرات نوع محیط کشت و غلظت انواع تنظیم‌کننده‌های رشد بر ریزنمونه‌های پایهٔ گزیلا ۶ از مرحلهٔ پرآوری و ریشه‌زایی تا مرحلهٔ انتقال و سازگاری گیاهچه‌ها در گلدان، به‌منظور دستیابی به روش مناسب برای ریزازدیادی این پایهٔ رویشی است.

۲. مواد و روش‌ها

در این مطالعه، از ریزنمونه‌های درون‌شیشه‌ای پایهٔ گزیلا ۶ که در محیط شاخه‌زایی (محیط کشت MS جامد دارای BAP و IBA) در مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی خراسان رضوی تکثیرشده بودند، طی سال ۱۳۹۰-۹۱ استفاده شد.

در این آزمایش، از شش تیمار شامل محیط کشت پایهٔ MS [۱۴]، محیط کشت DKW [۱۰] و WPM [۱۵] در دو حالت جامد (دارای آگار) و مایع (محیط کشت مایع به‌همراه پرلیت) استفاده شد. در تمامی تیمارها pH محیط برابر ۵/۷ تنظیم شد و ساکارز به‌مقدار ۳۰ گرم در لیتر به‌کار رفت.

برای محیط‌های جامد از آگار (آگار آگار- شرکت مرک آلمان) به‌مقدار شش گرم در لیتر و برای محیط‌های مایع از پرلیت که شسته شده و توسط اتوکلاو ضدعفونی شده بود، به اندازهٔ حجم نیمی از محیط کشت در هر ظرف کشت استفاده شد. برای ظروف کشت از شیشه‌هایی با حجم ۲۵۰ میلی‌لیتر استفاده شد و حجم محیط کشت‌های مایع و جامد در هر ظرف ۴۰ میلی‌لیتر بود (شکل ۱).

شکل ۱. محیط کشت مایع دارای پرلیت

تمامی ریزنمونه‌ها در ابعاد مساوی به طول یک سانتی‌متر در ظروف یکسان کشت شده، در اتاقک رشد با دمای ۱±۲۱ و فتوپریود ۱۶ ساعت روشنایی و هشت ساعت تاریکی با شدت نور ۲۰۰۰ تا ۲۵۰۰ لوکس نگهداری شدند.

۱.۲. شاخه‌زایی

در این مرحله، از شش نوع محیط کشت جامد و مایع DKW،MS و WPM و دو نوع تنظیم‌کنندهٔ رشد شامل بنزیل آمینوپورین (BAP) در سه سطح (صفر، یک و دو میلی‌گرم در لیتر)، تیدیازرون (TDZ) در سه سطح (صفر، یک و دو میلی گرم در لیتر) استفاده شد. اسید ایندول بوتریک (IBA)، به مقدار ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر در تمامی محیط‌های کشت استفاده شد.

در مرحلهٔ پرآوری پس از سه بار واکشت با فاصلهٔ

زمـانی ۲۱ روز، تعـداد شـاخه، طـول شـاخه و کیفیـت ریزنمونه ها اندازه‌گیری شد. کیفیت شـاخه‌هـای حاصـل از پرآوری در سه گروه، A با امتیاز سه (ریزنمونه‌هـا قـوی و پر رشد، فاقـد نشـانه‌هـای شیشـه‌ای شـدن، نکـروز شـدن مریستم انتهایی و زرد شدن برگ)، B با امتیاز دو (کمتـر از ۱۵ درصد نمونه‌ها دارای نشانه‌های شیشه‌ای شدن، نکـروز شدن مریستم انتهایی و زرد شدن برگ) و C با امتیـاز یـک (ریزنمونه هـا ضـعیف، ۱۵ تـا ۳۰ درصـد نمونـه‌هـا دارای نشانه‌های شیشه‌ای شدن، نکروز شـدن مریسـتم انتهـایی و زرد شدن برگ) قـرار گرفتنـد. بـه منظـور آنـالیز آمـاری از آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۳۰ تیمار و چهار تکرار که هر تکرار شامل پنج ریزنمونه بود، استفاده شد. مقایسهٔ میانگین‌هـا بـا اسـتفاده از آزمـون چنددامنـه‌ای دانکن در سطح احتمال ۱ درصد انجام شد.

۲.۲. ریشه‌زایی

در مرحلهٔ ریشه‌زایی نیـز از شـش محـیط کشـت جامـد و مایع MS، DKW و WPM به همراه اسید ایندول بوتریک، در چهار غلظت صفر، یـک، دو و سـه میلـی گـرم در لیتـر استفاده شد. اندازهٔ اولیهٔ طول شاخه انتقال یافته بـه مرحلـهٔ ریشـه‌زایـی ۲ سـانتی‌متـر بـود. پـس از ریشـه‌دار شـدن ریزنمونه هـا، تعـداد و طـول ریشـه و درصـد ریشـه زایـی اندازه‌گیری شد. به منظور آنالیز آماری از آزمایش فاکتوریـل در قالب طرح کاملاً صادفی با بیست‌وچهار تیمـار و هفـت تکرار، که هر تکرار شامل سه ریزنمونه بود، اسـتفاده شـد. مقایسهٔ میانگین‌ها با استفاده از آزمون چنددامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ۱ درصد انجام گرفت.

۲.۳. انتقال و سازگاری

به‌منظور سازگار کردن گیاهچه‌های آماده‌شده، گیاهچه‌هـا از ظروف کشت خارج شده و بـا آب مقطـر، بـه‌طـور کامـل شسـت‌وشـو داده شـدند. گیاهچـه‌هـای آمـاده‌شـده درون گلدان های جی فی حاوی بستر ضدعفونی‌شده توسط آون، منتقـل شـدند. بسـتر کشـت در ایـن مرحلـه مخلـوطی از کوکوپیت و پرلیت بود کـه بـه‌نسـبت ۱:۱ بـا هـم مخلـوط شدند. به‌دلیل حساسیت گیاهچه‌ها به تنش‌های محیطی پس از انتقال به محـیط بیـرون، گلـدان‌هـای دارای گیاهچـه‌هـا توسط ظروف شفاف پلاسـتیکی محصـور شـدند. پـس از گذشت یـک هفتـه روی پوشـش‌هـای پلاسـتیکی سـوراخ کوچکی برای تبادل هوا ایجاد شد و با گذشت زمان بـرای کاهش تدریجی رطوبت و نبودن تنش در گیاهچه‌ها تعـداد این سوراخ‌ها اضافه شد. در این مدت، بـرای جلـوگیری از فعالیت قارچ‌ها نیز از هفتهٔ دوم به بعد روزانه پوشـش‌هـای پلاستیکی به‌مدت ۲۰ تا ۳۰ دقیقـه و در هفتـه‌هـای بعـد از یک تا چند ساعت برداشته شدند. آبیاری گیاهچه‌ها در ابتدا با آب مقطر انجام گرفت تا گیاه با شـرایط جدیـد سـازگار شود. سپس به‌منظور کمک به سازگاری با محلول مـاکرو و میکرو محیط کشت **MS** که غلظـت آن نصـف شـده بـود، آبیاری شدند. پس از آنکه گیاهچـه هـا سـازگار شـدند، در زمان مناسب به زمین اصلی منتقل شدند.

۳. نتایج و بحث

مقایسهٔ میانگین‌ها در مرحلهٔ پرآوری نشان داد، نوع محـیط کشت، غلظت و نوع تنظیم‌کنندهٔ رشـد بـر تعـداد و طـول شاخه و کیفیت ریزنمونه اثر معناداری داشت (جـدول‌هـای ۱ و ۲). بررسـی تـأثیرات متقابـل نـوع محـیط کشـت و تنظیم‌کننده‌های رشد بر تعداد شاخهٔ تشکیل‌شده در مرحلـهٔ پرآوری نشان داد که بین تیمارها تفاوت معناداری در سطح یک درصد وجود دارد. شایان ذکر است که پرآوری در پای شاخساره‌ها انجام می گیرد، ولی این شاخساره‌های جـانبی، از نوع محوری بوده و بـه‌نـدرت از شاخسـاره‌هـای نابجـا هستند [۱۶].

در این مرحله، بیشترین تعداد شاخه ۶/۴۸ در محیط کشت جامد WPM حاوی دو میلی‌گرم در لیتر BAP تشکیل شد و کمترین تعداد شاخه در محیط‌های کشت فاقد تنظیم کننده‌های رشد (تیمار شاهد) بود (جدول ۱). این نتایج با یافته‌های برخی محققان [۱۹، ۲۹] در کشت درون‌شیشه‌ای گیلاس و گونه‌های جنس پرونوس، در نوع محیط کشت و غلظت BAP استفاده شده، مطابقت دارد اما با نتایج ریزازدیادی پایهٔ گزیلا ۶ که بیشترین تعداد شاخه را ۵/۱۱ در یک میلی‌گرم در لیتر BAP و محیط کشت MSگزارش کردند [۸]، متفاوت بود. در توجیه آن می‌توان به تفاوت در نوع محیط کشت اشاره کرد. به‌طور کلی، در تجزیهٔ اثر دو نوع سایتوکینین TDZ و BAP در ریزازدیادی گزیلا ۶، می‌توان گفت که حضور سایتوکینین در محیط کشت برای تشکیل شاخساره‌های جدید، مهم‌ترین نقش را داشت و بهترین نوع سایتوکینین برای فاز تکثیر و پرآوری، BAP با غلظت دو میلی‌گرم در لیتر بود.

بررسی نتایج حاصل از اثر متقابل نوع محیط کشت و غلظت تنظیم‌کننده‌های رشد بر طول شاخهٔ تشکیل‌شده در مرحلهٔ پرآوری نشان داد که بین تیمارها تفاوت معناداری در سطح یک درصد وجود دارد. بیشترین طول شاخه به‌مقدار ۳/۱۴۰ سانتی‌متر در محیط کشت مایع MS و غلظت یک میلی‌گرم در لیتر TDZ تشکیل شد و کمترین طول شاخه به‌مقدار ۱/۲۳۰ سانتی‌متر در محیط کشت جامد WPM که فاقد تنظیم‌کننده‌های رشد (تیمار شاهد)، به‌دست آمد (جدول ۲، شکل‌های ۲ و ۳).

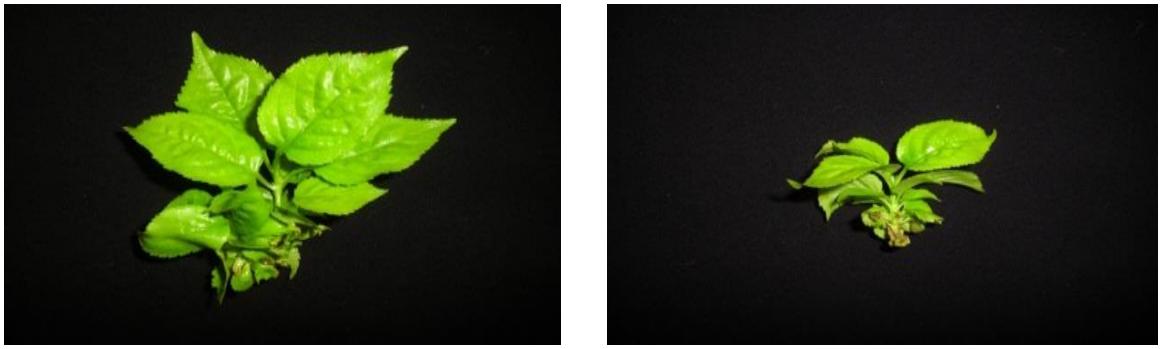
با افزایش غلظت BAP، تعداد شاخسارهٔ تولیدشده از هر ریزنمونه در محیط WPM افزایش یافت، به‌طوری‌که بالاترین میانگین تعداد شاخساره در غلظت دو میلی گرم در لیتر BAP در محیط WPM به‌دست آمد، ولی طول شاخساره ها به‌شدت کاهش یافت. بررسی ریزازدیادی زردآلوی رقم کانینو[۲] نشان داد که با افزایش غلظت BAP، شدت پرآوری بسیار بالا و طول شاخساره‌ها حداقل بود [۲۰].

جدول ۱. اثر نوع محیط کشت و غلظت تنظیم‌کننده‌های رشد بر میانگین تعداد شاخه در مرحلهٔ پرآوری پس از ۲۱ روز

تنظیم‌کننده‌های رشد	میانگین تعداد شاخه						
	محیط کشت جامد			محیط کشت مایع			میانگین
	DKW جامد	MS جامد	WPM جامد	DKW مایع	MS مایع	WPM مایع	
BAP- 1mg/l	۳/۵۶i†	۴/۱۳fg	۴/۲f	۲/۶ k	۳/۶۲i	۳/۷۸h	۳/۶۴b
BAP- 2mg/l	۵/۳۹c	۶/۰۳b	۶/۴۸a	۴/۰۷ g	۴/۳۴e	۴/۶۴d	۵/۱۵a
TDZ- 1mg/l	۲/۶k	۲/۷۷j	۲/۸۵j	۲/۲۵mn	۲/۴۴l	۲/۳۹ l	۲/۵۵c
TDZ- 2mg/l	۲/۳۴lm	۲/۵۷k	۲/۶۱k	۲/۰۹o	۲/۲no	۲/۱۹no	۲/۳۳d
0- mg/l	۱/۰۰P	۱/۰۰P	۱/۰۰P	۱/۰۰P	۱/۰۰P	۱/۰۰P	۱/۰۰e
میانگین	۲/۹۷c	۳/۳b	۳/۴۲a	۲/۴۰f	۲/۷۲e	۲/۸d	

† میانگین‌های هر ستون و ردیف با حروف مشابه، براساس آزمون چنددامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ۱ درصد اختلاف معنادار ندارند.

شکل ۲. از راست به چپ: پرآوری گزیلا ۶، در غلظت‌های ۲ و ۱ میلی‌گرم در لیتر BAP در محیط جامد پس از ۲۱ روز



شکل۳. از راست به چپ: طول شاخهٔ گزیلا ۶ در غلظت‌های ۲ و ۱ میلی‌گرم در لیتر TDZ در محیط جامد پس از ۲۱ روز

جدول ۲. اثر نوع محیط کشت و غلظت تنظیم‌کننده‌های رشد بر میانگین طول شاخه در مرحلهٔ پرآوری پس از ۲۱ روز

تنظیم‌کننده‌های رشد	میانگین طول شاخه (cm)						میانگین
	محیط کشت جامد			محیط کشت مایع			
	DKW جامد	MS جامد	WPM جامد	DKW مایع	MS مایع	WPM مایع	
BAP- 1mg/l	۱/۶۱h†	۱/۷۲h	۱/۷۲h	۲/۳۴defg	۲/۴۹cd	۲/۶۴de	۲/۰۵c
BAP- 2mg/l	۱/۶۱h	۱/۷۳h	۱/۷۳h	۲/۴۰de	۲/۶۲c	۲/۳۵defg	۲/۱c
TDZ- 1mg/l	۲/۳۶def	۲/۴۱de	۲/۴۱de	۲/۹۹ ab	۳/۱۴a	۳ /۱۳a	۲/۷۴a
TDZ- 2mg/l	۲/۳۰efg	۲/۳۳defg	۲/۳۳defg	۲/۹۰b	۲/۹۸ab	۲/۹۹ab	۲/۶۴b
0- mg/l	۱/۲۴i	۱/۲۶i	۱/۲۶i	۲/۱۹g	۲/۲۰fg	۲/۱۹ fg	۱/۷۲d
میانگین	۱/۸۴c	۱/۸۹c	۱/۸۹c	۲/۵۶b	۲/۶۹a	۲/۶۲ab	

† – میانگین‌های هر ستون و ردیف با حروف مشابه، براساس آزمون چنددامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ۱ درصد اختلاف معنادار ندارند.

جدول ۳. اثر نوع محیط کشت و غلظت تنظیم‌کننده‌های رشد بر کیفیت ریزنمونهٔ گزیلا ۶ در مرحلهٔ پرآوری پس از ۲۱ روز

تنظیم‌کننده‌های رشد	کیفیت ریزنمونه††						میانگین
	محیط کشت جامد			محیط کشت مایع			
	DKW جامد	MS جامد	WPM جامد	DKW مایع	MS مایع	WPM مایع	
BAP- 1mg/l	۱/۶cdef†	۲cd	۲cd	۱/۲ef	۱/۶cdef	۱/۶cdef	۱/۶۷bc
BAP- 2mg/l	۲/۲ bc	۳a	۳a	۱/۸cde	۲cd	۲cd	۲/۳۳a
TDZ- 1mg/l	۱/۸cde	۲/۸ab	۲cd	۱/۴def	۱/۶cdef	۱/۸cde	۱/۹b
TDZ- 2mg/l	۱/۸cde	۱/۸cde	۱/۶cdef	۱/۶cdef	۱/۶cdef	۱/۲ef	۱/۶c
0- mg/l	۱f	۱f	۱f	۱f	۱f	۱f	۱d
میانگین	۱/۶۸bc	۲/۱۲a	۱/۹۲ab	۱/۴c	۱/۵۶c	۱/۵۲c	

† – میانگین‌های هر ستون و ردیف با حروف مشابه، براساس آزمون چنددامنه‌ای دانکن در سطح احتمال یک درصد اختلاف معنادار ندارند.

†† A: ریزنمونه‌ها قوی و پررشد، فاقد نشانه‌های شیشه‌ای شدن، نکروز شدن مریستم انتهایی و زرد شدن برگ. B: کمتر از ۱۵ درصد نمونه‌ها دارای نشانه‌های شیشه‌ای شدن، نکروز شدن مریستم انتهایی و زرد شدن برگ. C: ریزنمونه‌ها ضعیف، ۱۵ تا ۳۰ درصد نمونه‌ها دارای نشانه‌های شیشه‌ای شدن، نکروز شدن مریستم انتهایی و زرد شدن برگ.

بررسی نتایج حاصل از اثر متقابل نوع محیط کشت و غلظت تنظیم‌کننده‌های رشد بر کیفیت[1] ریزنمونه در مرحلهٔ پرآوری نشان داد که بین تیمارها اختلاف معنا داری وجود دارد و بالاترین کیفیت ریزنمونه در محیط کشت جامد MS و WPM دارای دو میلی‌گرم در لیتر BAP و پایین‌ترین کیفیت ریزنمونه در هر شش محیط کشت فاقد تنظیم‌کننده‌های رشد (تیمار شاهد) دیده شد (جدول ۳).

با توجه به افزایش پرآوری شاخه در غلظت دو میلی‌گرم در لیتر BAP و یک مطالعه مبنی بر کاهش شیشه‌ای شدن ریزنمونه‌ها با افزایش میزان پرآوری، می‌توان گفت که پرآوری تا مقدار مطلوب، سبب افزایش کیفیت ریزنمونه می‌شود [۲]. در این بررسی، نوع محیط کشت تأثیر بسزایی بر پرآوری موفق و کیفیت ریزنمونه ها داشت، زردی و کلروزه شدن برگ‌ها و مردن بافت انتهای برگ‌ها، رشد سریع گیاهچه ها در محیط و تماس نوک برگ ها با دیوارهٔ ظروف کشت، تجمع رطوبت به صورت قطره بر دیوارهٔ ظرف محیط کشت‌های مایع، کمبود برخی عناصر غذایی در محیط DKW نظیر نیترات، از جمله عوامل کاهش کیفیت ریزنمونه ها بودند. به‌طور کلی کیفیت ریزنمونه‌ها در محیط کشت مایع پایین‌تر بود. در مورد علت کاهش کیفیت ریزنمونه‌ها در محیط کشت مایع می‌توان گفت که در شرایط درون شیشه‌ای زمانی که مقدار رطوبت زیاد باشد، تعرق گیاه و درنتیجهٔ جذب کلسیم کاهش می یابد و قهوه‌ای شدن و مردن بافت ها در نتیجهٔ تجزیه و تخریب یاخته‌ها رخ می‌دهد [۲۵].

در بررسی ریزازدیادی پایه های مختلف درختان میوه از محیط های کشت متفاوتی استفاده شده است که انواع مختلف ناهنجاری‌های رشد، به‌نحوی با نوع محیط کشت

۱. معیارهای کیفیت ریزنمونه‌های حاصل از پرآوری در قسمت مواد و روش‌ها آمده است.

در ارتباط بودند [۱۲، ۲۱، ۲۵]. همچنین در بررسی تکثیر درون‌شیشه‌ای گزیلا ۵، محیط مناسب، محیط موراشیگ و اسکوگMS گزارش شد. در این محیط جذب فسفر و نیتروژن بیشتر توسط شاخساره‌ها، افزایش پرآوری و کیفیت بهتر آنها را به‌دنبال داشت [۲۵].

به‌طور کلی، در مقایسهٔ اثر انواع محیط کشت در ریزازدیادی گزیلا ۶ و با در نظر گرفتن تمام عوامل می‌توان گفت که بهترین نوع محیط کشت برای پرآوری، محیط کشت جامد WPM و MS بود.

مقایسهٔ میانگین‌ها در مرحلهٔ ریشه‌زایی نشان داد، نوع محیط کشت و غلظت تنظیم‌کنندهٔ رشد بر درصد ریشه‌زایی، تعداد و طول ریشه اثر معناداری داشت (جدول‌های ۴، ۵ و ۶). بررسی نتایج حاصل از اثر متقابل نوع محیط کشت و غلظت تنظیم‌کنندهٔ رشد بر درصد ریشه‌زایی نشان داد که بین تیمارها تفاوت معناداری در سطح ۱ درصد وجود دارد. بیشترین درصد ریشه‌زایی به‌مقدار ۹۳/۹۰ در محیط کشت مایع MS و غلظت دو میلی‌گرم در لیتر IBA تشکیل شد و کمترین درصد ریشه‌زایی به‌مقدار ۰/۰۱ در محیط کشت جامدWPM و غلظت صفر میلی‌گرم در لیتر IBA (تیمار شاهد)، به دست آمد (جدول ۴). البته ریشه‌زایی بهتر گزیلا ۶ در محیط کشت MS در مطالعهٔ دیگری هم گزارش شده است [۲۸].

در محیط کشت مایع (محیط مایع دارای پرلیت) ظهور اولین ریشه‌ها در مقایسه با محیط جامد بسیار سریع‌تر بود. در واقع استفاده از پرلیت در محیط کشت مایع به دلیل زیاد بردن اکسیژن در محیط اطراف ریشه و افزایش قابلیت جذب مواد غذایی توسط ریشه در محیط مایع سبب رویش سریع‌تر ریشه و برگ در گیاهچه‌ها به‌نسبت محیط جامد شد.

بررسی اثر متقابل نوع محیط کشت و غلظت IBA بر تعداد ریشهٔ تشکیل‌شده نشان داد که بین تیمارها تفاوت معنا داری در سطح ۱ درصد وجود دارد. بیشترین تعداد ریشه به مقدار ۵/۲۰ در محیط کشت جامد DKW و غلظت دو میلی‌گرم در لیتر IBA تشکیل شد و کمترین تعداد ریشه به‌مقدار ۰/۰۱ در محیط کشت جامد و مایع WPM و غلظت صفر میلی‌گرم در لیتر IBA (تیمار شاهد)، به دست آمد (شکل ۴، جدول ۵). گزارش دیگری هم مبنی بر تولید بیشترین مقدار ریشه با استفاده از دو میلی گرم در لیتر IBA در محیط کشت ریشه‌زایی گزیلا ۶ وجود دارد [۲۸].

جدول ۴. اثر نوع محیط کشت و غلظت تنظیم‌کننده رشد بر درصد ریشه‌زایی پایهٔ گزیلا ۶

تنظیم‌کننده‌های رشد	درصد ریشه‌زایی						
	محیط کشت جامد			محیط کشت مایع			میانگین
	DKW جامد	MS جامد	WPM جامد	DKW مایع	MS مایع	WPM مایع	
IBA - 1mg/l	۵۹/۹۷m†	۷۵/۹ g	۶۲/۶l	۷۰/۹ i	۸۰/۱f	۷۲/۸h	۷۰/۳۸c
IBA - 2mg/l	۸۶/۳d	۸۸/۱c	۸۷/۶c	۸۷/۶ c	۹۳/۹ a	۹۱b	۸۹/۰۸a
IBA - 3mg/l	۶۵/۴k	۷۰/۸۵ i	۸۳/۲e	۶۶/۷ j	۹۱b	۸۵/۸d	۷۷/۱۶b
0- mg/l	۰/۰۱p	۸/۱o	۰/۰۱p	۰/۰۱p	۱۶/۷n	۸/۰۲o	۵/۴۷d
میانگین	۵۲/۹۲f	۶۰/۷۴c	۵۸/۳۵d	۵۶/۳e	۷۰/۴۳a	۶۴/۴۱b	

† میانگین‌های هر ستون و ردیف با حروف مشابه، براساس آزمون چنددامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ۱ درصد اختلاف معنادار ندارند.

شکل ۴. از چپ به راست: اثر غلظت‌های ۱، ۲، ۳ و ۰ میلی‌گرم در لیتر IBA بر تعداد ریشهٔ تشکیل‌شده در گزیلا ۶

جدول ۵. اثر نوع محیط کشت و غلظت تنظیم‌کنندهٔ رشد بر میانگین تعداد ریشه

تنظیم‌کننده‌های رشد	میانگین تعداد ریشه						میانگین
	محیط کشت جامد			محیط کشت مایع			
	DKW جامد	MS جامد	WPM جامد	DKW مایع	MS مایع	WPM مایع	
IBA - 1mg/l	۳/۵۲ ef †	۳/۴۵ ef	۲/۸ gh	۲/۵gh	۳/۵۷ef	۲/۴۵ h	۳/۰۵c
IBA - 2mg/l	۵/۲ a	۴/۵۵ bc	۳/۰۵fgh	۴/۲۵cd	۴/۷۷abc	۴/۹ab	۴/۴۵a
IBA - 3mg/l	۴/۷۵ abc	۳/۱fg	۳/۰۲fgh	۳/۸۵de	۴/۷۷ab	۴/۸abc	۴/۰۸b
0- mg/l	۰/۰۶i	۰/۰۵i	۰/۰۱ i	۰/۰۵i	۰/۲۰ i	۰/۰۱ i	۰/۰۵d
میانگین	۳/۳۷a	۲/۷۹bc	۲/۲۲d	۲/۶۵c	۳/۳۷a	۳/۰۵b	

† میانگین‌های هر ستون و ردیف با حروف مشابه، براساس آزمون چنددامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ۱ درصد اختلاف معنادار ندارند.

بررسی نتایج حاصل از اثر متقابل نوع محیط کشت و غلظت IBA بر طول ریشهٔ تشکیل‌شده نشان داد که بین تیمارها تفاوت معناداری در سطح ۱ درصد وجود دارد. بیشترین طول ریشه به مقدار ۱۱/۷۶ سانتی‌متر در محیط کشت مایع MS و غلظت دو میلی‌گرم در لیتر IBA و کمترین طول ریشه به‌مقدار ۰/۰۱ سانتی‌متر در محیط کشت جامد WPM و غلظت صفر میلی‌گرم در لیتر IBA (تیمار شاهد)، به‌دست آمد (جدول ۶).

ریشه‌زایی در شرایط درون‌شیشه‌ای یکی از مهم‌ترین مراحل ریزازدیادی است، به‌ویژه ریشه‌زایی گیاهان چوبی بالغ که اغلب به‌سختی صورت می گیرد [۱۱]. مردن بافت مریستم انتهایی بیشتر در طول مرحلهٔ ریشه زایی هنگامی که شاخساره به محیط بدون سایتوکینین انتقال می یابد و هنوز هیچ ریشه‌ای تشکیل نشده است، رخ می‌دهد که این کمبود سبب توقف تقسیم یاخته ای و رشد مریستم انتهایی و نکروزه شدن آن می‌شود [۱۳].

بررسی نتایج تأثیر غلظت های مختلف IBA در مرحلهٔ ریشه‌زایی بر میانگین تعداد ریشه در هر ریزنمونه و میانگین طول ریشه نشان داد که با افزایش میانگین تعداد ریشه، میانگین طول ریشه کاهش پیدا کرده است. ازاین رو با افزایش تعداد ریشه در هر ریزنمونه، از میانگین طول ریشه کاسته می‌شود.

جدول ۶. اثر نوع محیط کشت و غلظت تنظیم‌کنندهٔ رشد بر میانگین طول ریشه

تنظیم‌کننده‌های رشد	طول ریشه (cm)						میانگین
	محیط کشت جامد			محیط کشت مایع			
	DKW جامد	MS جامد	WPM جامد	DKW مایع	MS مایع	WPM مایع	
IBA - 1mg/l	۷/۵۵efg†	۷/۶۷efg	۷/۶۷efg	۵/۸۲h	۶/۹g	۶/۶ gh	۷/۰۴c
IBA - 2mg/l	۷/۳۵fg	۹/۱۵cd	۱۰/۵b	۸/۹۲cd	۱۱/۷۶a	۱۰/۷۵b	۹/۷۳a
IBA - 3mg/l	۷/۰۵fg	۹/۲۲c	۸/۱۲def	۶/۸gh	۸/۵۵ cde	۷/۳۲ fg	۷/۸۴b
0- mg/l	۰/۰۱i	۰/۰۸ i	۰/۰۱i	۰/۰۱i	۰/۱۵ i	۰/۰۸ i	۰/۰۵d
میانگین	۵/۴۹c	۶/۵۳ab	۶/۵۳ab	۵/۳۹c	۶/۸۴a	۶/۱۸b	

† – میانگین‌های هر ستون و ردیف با حروف مشابه، براساس آزمون چنددامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ۱ درصد اختلاف معنادار ندارند.

جدول ۷. اثر نوع محیط کشت و غلظت تنظیم‌کنندهٔ رشد بر درصد بقای گیاهچه گزیلا ۶

تنظیم‌کننده‌های رشد	درصد بقای گیاهچه						میانگین
	محیط کشت جامد			محیط کشت مایع			
	DKW جامد	MS جامد	WPM جامد	DKW مایع	MS مایع	WPM مایع	
IBA - 1mg/l	۷۰/۵e†	۱۹/۶۳l	۸۸b	۶۰/۰۵g	۷۱/۰۳e	۵۸/۹۷h	۶۱/۳۶a
IBA - 2mg/l	۲۴/۶۳k	۲۵/۵k	۹۱/۸a	۷۱/۴۳e	۶۹/۰۵f	۵۵/۵۳ i	۵۶/۳۲c
IBA - 3mg/l	۷۵/۵d	۱۲/۸۲ m	۵۳/۷۲j	۶۹/۲۸f	۸۳/۸c	۶۰/۶۳g	۵۹/۲۹b
0- mg/l	۰/۰۱n	۰/۰۱n	۰/۰۱n	۰/۰۱n	۰/۰۱n	۰/۰۱n	۰/۰۱d
میانگین	۴۲/۶۶e	۱۴/۴۹f	۵۸/۳۸a	۵۰/۱۹c	۵۵/۹۷b	۴۳/۷۸d	

† – میانگین‌های هر ستون و ردیف با حروف مشابه، براساس آزمون چنددامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ۱ درصد اختلاف معنادار ندارند.

بررسی نتایج حاصل از اثر متقابل نوع محیط کشت و غلظت IBA بر درصد بقای گیاهچهٔ ریشه‌دارشده نشان داد که بین تیمارها تفاوت معناداری در سطح ۱ درصد وجود دارد. بیشترین درصد بقا به مقدار ۹۱/۸ در محیط کشت جامد WPM و غلظت دو میلی‌گرم در لیتر IBA دیده شد و کمترین درصد بقا در هر شش محیط کشت که فاقد IBA بودند، به دست آمد، اما به‌طور میانگین درصد بقای گیاهچه‌ها در محیط مایع بیشتر از محیط جامد بود (جدول ۷).

نتایج این مطالعه با یافته‌های حاصل از کشت پایهٔ پاکوتاه گیلاس [۳] و بررسی تأثیر تنظیم‌کننده‌های رشد

گیاهی در میزان سازگاری پایه‌های پرونوس [۲۴]، مبنی بر اینکه گیاهچه‌هایی که در محیط مایع ریشه‌دار شده بودند در مقایسه با آنهایی که در محیط جامد ریشه‌دار شده بودند، بقای بهتری را نشان دادند و اینکه درصد بقای گیاهان به‌طور معناداری تحت تأثیر غلظت IBA بوده و بهترین درصد بقا با دو میلی گرم در لیتر IBA به دست آمده است، مطابقت دارد.

اگرچه در سازگاری ارقام بادام بدون اشاره به‌نسبت ترکیب پیت‌خزه و ورمی‌کولایت ۹۲ درصد موفقیت در سازگار کردن گیاهچه ها حاصل شد [۷]، در روش مشابهی با این مطالعه، سازگاری موفق گیاهچه‌های زردآلو با انتقال آنها به گلدان‌های دارای پیت و پرلیت به‌نسبت یک به یک و کاهش تدریجی رطوبت به‌دست آمد [۱۸، ۱۹].

موفقیت ریزازدیادی به توانایی انتقال گیاهچه‌ها به بستر گلدان و سازگار کردن موفق آنها به شرایط محیط بیرون بستگی دارد. گیاهچه‌های گزیلا ۶ در مرحلهٔ انتقال، در گلدان‌های جی‌فی دارای بستر ضدعفونی‌شدهٔ کوکوپیت و پرلیت سازگاری موفقی داشتند (شکل ۵).

در این بررسی، به‌طور کلی گیاهچه‌هایی که در محیط کشت مایع با غلظت دو میلی‌گرم بر لیتر IBA ریشه‌دار شده بودند، از نظر کیفیت و کمیت، ریشه‌زایی بهتری داشتند و سازگاری بیشتری در مقابل تنش ناشی از تغییر شرایط محیطی در مرحلهٔ انتقال نشان دادند.

شکل ۵. گیاهچه‌های گزیلا ۶ پس از انتقال و سازگاری

منابع

1. Akita M, Negishi K, Kitano A, Wasaki M, Ohta Y, Kuriu T and Takii T (2006) Mass propagation of cherry (*Prunus cerasus* × *Yedonsis matusum*) through shoot primordial. Acta Horticulturae. 725: 579-584.
2. Alkan K, Cetiner S, Aka Y, Yalcin MY and Kuden AB (1997) In vitro multiplication of clonal apple rootstocks M9, M26 and MM 1 06 by meristem culture. Acta Horticulturae. 441: 325-327.
3. Al-sabagh M, Abdul-Kader A, Khoder M and Abdul-Rahman A (1999) In vitro propagation of semi-dwarf cherry rootstock. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 59(3): 203-208.
4. Andersen RL, Robinson T and Lang GA (1999) Managing the Gisela cherry rootstocks. New York Fruit Quarterly. 7(4): 1-4.
5. Baghwat B and Lane D (2004) *In vitro* shoot regeneration from leaves of sweet cherry (*Prunus avium*) 'Lapins' and 'Sweet heart'. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 78(2): 173-181.
6. Buzkan N, Cetiner S, Yalcin-Mendi Y and Di Terlizzi B (1997) Clonal propagation of disease free rootstooks for sour and sweet cherry by meristem culture. Acta Horticulturae. 441: 327-332.
7. Channuntapipat ChM, Sedgley and Collins G (2003) Microporopagation of almond cultivars Nonpariel and Ne plus Ultra and the hybrid rootstocks Titan Nemagard. HortSciense. 98: 473-484.
8. Daneshvar Hossini A, Ganji Moghadam E and Anahid S (2010) Effects of Media Cultures and Plant Growth Regulators in Micro Propagation of Gisela 6 Rootstock. Annals of Biological Research. 1(2):135-141.

9. Dorkovic J (2006) Rapid micropropagation of maturawild cherry (*Prunus avium* L.). Biologia Plantarum. 50(4): 733-736.

10. Driver JA and Kuniyuki AH (1984) *In vitro* propagation of paradox walnut rootstock. HortScience. 19(4): 507-509.

11. Erbenova M, Paprstein F and Seldak J (2001) *In vitro* propagation of dwarf rootstocks for sweet cherry. Acta Horticulturae. 560: 477-480.

12. Hatchinsun FJ and Zimmerman HR (1987) Tissue culture of temperate fruit and nut trees. In: J. Janick (ed). Horticultural Reviews. Vol. 9. Van Nostrand Reinhild Company Inc. Pp. 337-349.

13. Hossain SN, Munshi MR, Islam MR, Hakim L and Hossain M (2003) *In vitro* propagation of plum (*Zyziphus jujubalam*). Plant Tissue Culture. 13(1): 81-84.

14. Matt A and Johannnes AJ (2005) *In vitro* plant regeneration from leaves and internodes sections of sweet cherry cultivars (*Prunus avium* L.). Plant Cell Reports. 24(8): 468-476.

15. Mc Cown B and Lioyd GB (1980) Commercially feasible micropropagation of mountain laurel (*Kalmia latifolia*) by use of shoot tip culture vitro cultue. Proceedings of the international plant propagation society. 30: 421-427.

16. Muna AS, Ahmad AK, 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.

17. Murashig T and Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissue culture. Physiologia Plantarum. 15: 473-497.

18. Perez-Tornero O, Burgos L, Egea I and Lopez JM (2000) Apricot meristem tip culture. Acta Horticulturae. 488: 417

19. Perez-Tornero O and Burgos L (2000) Different media requirements for micropropagation of apricot cultivars. Plant Cell Tissue and Organ Culture. 63: 133-141.

20. Perez-Tornero O, Egea J, Vanoostende A and Burgos L (2000) Assessment of factors affecting adventitious shoot regeneration from *in vitro* cultured leaves of apricot. Plant Science. 158: 61-70.

21. Perez-Tornero O, Lopez JM, Egea J and Burgos L (2000) Effect of basal media and growth regulators on the in vitro propagation of apricot (*Prunus armeniaca* L.) cv. Cannino. Journal of Horticultural Science and Biotechnology. 75:283-286.

22. Prushki K, Astatkie T and Nowak J (2005) Tissue culture propagation of Mongolian Cherry (*Prunus fruticosa*) and Nanking Cherry (*Prunus tomentosa*). Plant Cell Tissue and Organ Culture. 82(2): 207-211.

23. Quoirin M and Lepoivre P (1977) Improved medium for in vitro culture of Prunus sp. Acta Horticulturae. 78: 437-442.

24. Rogaleski M, Moraeas LK, Feslibino C, Crestani L, Guerra MP and Silva AL (2003) Acclimazation of micropropagated Prunus sp. Revista Brasileira de Fruticultura. 25(2): 279-281.

25. Ruzic D, Saric M, Cerovic R and Culafic L (2000) Relationship between the concentration of macro elements, their uptake and multiplication of cherry rootstock Gisela 5 *in vitro*. Plant Cell Tissue and Organ Culture. 63(1): 9-14.

26. . Ruzic D, Saric M, Cerovic R and Culafic L (2001) Change in macroelement content of the media and in sweet cherry Inmil GM 9 shoots during in vitro culture. Journal of Horticultural Science and Biotechnology. 78: 295-299.

27. Ruzic DV and Vajovic TI (2008) The effect of cytokenins types and their concentration on in vitro multiplication of sweet cherry C.V. Lapins (*Prunus avium* L.). HortScience. 35(1): 12-21.

28. Sarropoulou V, Dimassi-Theriou K and Therios I (2013) Indole-3-butyric acid and myo-inositol impacts on in vitro rooting of the cherry rootstocks CAB-6P and Gisela 6. Biologia Plantarum. 57(4): 613-619.

29. Sedlak J and Paprstein F (2008) *In vitro* shoot proliferation of sweet cherry cultivars Karesova and Rivan. HortScience. 35(3): 95-98.

30. Sisko M (2011) *In vitro* propagation of Gisela 5 (*Prunus cerasus* × *P. canescens*). Agricultura 8: 31-34.

31. Tang M, Pen ZL and Krczal G (2002) Plant regeneration from leaves of sweet and sour cherry cultivars. Scientia Horticulturae. 93(3): 235-244.