بررسی تاثیر نوع محیط کشت و برخی ترکیبات بیوشیمیایی روی پرآوری درون شیشه‌ای سیب پا کوتاه گمی‌الماسی *Malus domestica* Borkh

Effect of Medium Type and Some Biochemical Components on *in vitro* Proliferation of Dwarf Rootstock of Apple (*Malus domestica* Borkh cv Gami Almasi)

مهدی محسنی‌آذر[1*]، سنبل ناظری[2]، مرتضی قدیم زاده[3] و محمد علی ملبوبی[4]

چکیده

پرآوری گیاهان مختلف در شرایط درون شیشه‌ای برای ریز ازدیادی و مطالعات درون شیشه‌ای امری الزامی است. بهینه‌سازی و افزایش پرآوری شاخه موضوع پایه‌ای برای ریز ازدیادی است و در این زمینه بیشتر مطالعات روی نوع محیط پایه و هم‌چنین ترکیباتی که در محیط کشت استفاده می‌شوند متمرکز شده است. سیب گمی الماسی یک پایه پاکوتاه سیب است که در شمال غرب ایران رشد می‌کند و برای گونه‌ها و ارقام مختلف سیب مناسب است. در این مطالعه تاثیر دو نوع محیط کشت پایه حاوی نمک‌های MS و N6 همراه با اثر مواد بیوشیمیایی مانندی فلوروگلوسینول، زغال فعال و هورمون جیبرلین بر روی پرآوری و طول شاخه‌ها بررسی شد. از شاخه‌های در حال رشد در شرایط درون شیشه‌ای برای این کار استفاده شد. نتایج به‌دست آمده از این آزمایش‌ها نشان‌داد که محیط کشت MS نسبت به N6 پرآوری سیب را بیشتر تحریک می‌کند. فلوروگلوسینول به‌عنوان یک ترکیب فلوردزینی تاثیر مثبتی در پرآوری سیب داشت و در طول یک ماه اول کشت تاثیر معنی‌داری در افزایش پرآوری درون شیشه‌ای و طول شاخه‌ها داشت. فلوروگلوسینول هم‌چنین تاثیر خوبی در کاهش شیشه‌ای شدن نمونه‌های سیب داشت. اختلاف بین اثر اسید جیبرلیک با فلوروگلوسینول روی پرآوری سیب معنی‌دار نبود. زغال فعال اثر معنی‌داری روی پرآوری نداشت. ترکیب 80 میلی‌گرم در لیتر فلوروگلوسینول با 2 میلی‌گرم در لیتر جیبرلین برای افزایش پرآوری در شرایط درون شیشه‌ای این رقم سیب مناسب تشخیص داده شد.

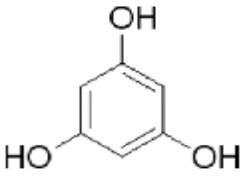
واژه‌های کلیدی: پرآوری، درون شیشه‌ای، سیب پاکوتاه، فلوروگلوسینول، محیط کشت، گمی آلماسی

1. کارشناس ارشد بیوتکنولوژی، گروه باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه، ارومیه.
2. استادیار گروه بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه بوعلی سینا، همدان.
3. استادیار گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه، ارومیه.
4. دانشیار پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری، تهران
*: نویسنده مسوول Email:mohseniazar@gmail. com

Archive of SID
www.SID.ir

مقدمه

استفاده از پایه‌های کوتاه کننده سیب (*Malus domestica* Borkh) به‌دلیل تولید درختان کوچک که هزینه‌های کارگری سمپاشی، هرس، برداشت میوه و سایر عملیات زراعی در باغ را کاهش می‌دهد از رونق زیادی برخوردار است (ناصری و همکاران، 1385). به‌دلیل اهمیت نوع پایه درختان سیب در سیستم پرورش و مدیریت باغ، میزان تولید و عملکرد، کیفیت میوه و عمر اقتصادی درختان سیب، در غالب کشورهای مهم تولید کننده‌ی سیب دنیا پایه‌های متنوعی برای سیب اصلاح و معرفی گردیده است. اغلب پایه‌های معرفی شده در این کشورها با توجه به نیاز اقلیمی و نیاز باغداران آن کشور اصلاح و معرفی شده است. (زاد شکویان، 1371) گمی الماسی می‌تواند به‌عنوان میان‌پایه کاربرد خوبی داشته باشد و هم‌چنین با وجود ویژگی‌های بسیار مناسب این رقم، می‌توان از آن در اصلاح و ایجاد ارقام جدید پایه‌های کوتاه کننده سیب استفاده کرد (ناصری، و همکاران 1385). تکثیر درون شیشه‌ای[1] یکی از تکنیک‌های مرسوم برای تولید انبوه گیاهان است هم‌چنین به منظور حفاظت از ژنوتیپ‌های برتر برنامه‌های اصلاح درختان اغلب بر استفاده از روش ازدیاد رویشی، (چه به‌وسیله روش‌های کلاسیک اصلاح نباتات و چه تکنولوژی انتقال ژن)، تکیه دارد. ژنوتیپ‌های برتر در درختان میوه به‌دلیل وجود هتروزیگوسی بالا در نتاج آن‌ها حتما باید با روش‌های رویشی تکثیر گردند. ازدیاد پایه‌های سیب به‌وسیله قلمه فوق‌العاده سخت و مشکل است. استفاده از تکثیر درون شیشه‌ای به‌خاطر سرعت عمل و عملکرد بالا (تکثیر انبوه در یک زمان معین و مستقل از شرایط محیطی) در این زمینه مناسب می‌باشد. یافتن محیط کشتی که در آن نمونه‌های مورد مطالعه رشد سریعی داشته باشند و هم‌چنین در طول واکشت‌های مختلف شیشه‌ای[2] نشوند و به‌توان در تکثیر درون شیشه‌ای سیب از آن استفاده کرد، بسیار مطلوب خواهد بود (میری و همکاران، 1382). در آزمایش‌های مربوط به ریز ازدیادی، باززایی و تراریختی سیب نیز به‌دلیل نیاز به مقدار انبوهی از گیاهان باززایی شده، ضروری است که ابتدا نمونه‌ها تکثیر گردند و پرآوری شاخه‌ها بهینه گردد. در آزمایش‌های انجام شده برخی از پژوهش‌گران از موادی مثل فلوروگلوسینول[3] در افزایش پرآوری[4] و کاهش شیشه‌ای شدن نمونه‌ها در شرایط درون شیشه‌ای استفاده شده است (*اکلان* و همکاران، 1997). فلوروگلوسینول ماده‌ای است با فرمول $C_6H_6O_3$ و وزن مولکولی 11/ 126 مترادف با (1,3,5-Trihydroxybenzene) که جزء ترکیبات فنلی و از مشتقات فلوریدزین می‌باشد (شکل 1).



شکل 1: مولکول فلوروگلوسینول
(1,3,5-Trihydroxybenzene)

بسیاری از پژوهش‌گران از BA[5] برای پرآوری استفاده می‌کنند. کینتین در مقایسه با BA تاثیر بسیار کمی بر پرآوری پایه‌های M9 و M26 دارد (میری و همکاران، 1382). جیبرلین‌ها موجب رشد طولی میانگره‌ها و رشد مریستم یا جوانه می‌شوند. اکسین‌ها توسط بعضی از پژوهش‌گران در مرحله پرآوری (همراه سایتوکینین) استفاده شدند، اما به‌نظر می‌رسد وجود آن‌ها در محیط کشت ضروری نیست (میری و همکاران، 1382). گزارش‌هایی از تاثیر مثبت یا منفی جیبرلین‌ها روی تشکیل ساقه نا به‌جا وجود دارد که این اختلافات ممکن است ناشی از این باشد که جیبرلین‌ها روی القاء مریستموئید اثر بازدارنده دارند، اما برای رشد و نمو اندام‌های از پیش تشکیل شده مفید هستند (*گاسپار*[6] و همکاران، 1996). *ویلسون*[7] و جیمز (2003) گزارش کردند، که در رقم کوپین‌کوکس سیب، رشد شاخه‌ها بر روی محیط MS[8] با سطح نصف شده NH_4NO_3 و KNO_3 بیشتر از محیط محیط DKW[9] بود در حالی‌که هر دو محیط کشت حاوی فلوروگلوسینول بودند، سطح نیترات در محیط DKW حدود دو برابر MS معمولی است. فلوروگلوسینول در پرآوری شاخه در سیب تاثیر دارد، هم‌چنین برای ریشه‌زایی ریز قلمه‌ها (در شرایط *این ویترو*) استفاده می‌شود (میری و همکاران، 1382[a] و *شارما*[10] و همکاران، 2000). تاثیر مثبت فلوروگلوسینول روی تحریک رشد و پرآوری شاخه در برخی گونه‌ها گزارش

1. *in vitro*
2. Vitrification
3. phloroglucinol
4. proliferation
5. 6-Benzyladenine
6. Gaspar *et al*.
7. Wilson and James
8. Murashige and Skoog
9. Driver and Kuniyuk Walnut medium
10. Sharma *et al.*

Archive of SID
www.SID.ir

شده است (جونز[1]، 1976). *اُلیویرا*[2] (2003) تاثیر مثبت فلوروگلوسینول را در پرآوری جوانه‌های انتهایی و جانبی *Tabernaemontana fuchsiaefolia* نشان داد. ترکیبات فلوروگلوسینول هم‌چنین به‌عنوان مهارکننده فعالیت ترانسکریپتاز HIV و نیز به‌عنوان ضد باکتری و ضد رسوب شناخته شده است (روچا[3] و همکاران، 1995 و *ایندر پال*[4] و همکاران، 2005). با توجه به نتایج ذکر شده برای فلوروگلوسینول و هم‌چنین برای یافتن محیط کشت مناسب و ترکیب بیوشیمیایی مناسب به‌منظور پرآوری بیشتر سیب-های رقم گمی‌آلماسی در شرایط درون شیشه‌ای تحقیقی طراحی و به شرح ذیل انجام گرفت.

مواد و روش‌ها

برای انجام این آزمایش از شاخساره‌های باززایی شده و رشد کرده در شرایط درون شیشه‌ای استفاده شد. برای این منظور ریزنمونه جوانه شاخه از درختان مادری جدا گردیده و با استفاده از هیپوکلریت سدیم 1درصد به‌مدت 15 دقیقه و کلرید جیوه 1 درصد به‌مدت دو دقیقه استریل سطحی شدند و پس از آب کشی با آب مقطر استریل در محیط کشت MS حاوی 1 میلی‌گرم در لیتر BA کشت گردیدند. شاخساره‌های گمی‌آلماسی سپس روی محیط کشت MS حاوی 1 میلی‌گرم در لیتر BA و 0/1 میلی‌گرم IBA تکثیر شدند. شاخه‌های سیب باززایی شده، که هرکدام حاوی حداقل 3 جوانه و حداکثر چهار جوانه بودند، پس از حذف برگ‌های اضافی آن-ها در دو نوع محیط کشت پایه متفاوت MS و N6 به‌صورت افقی کشت شدند. غلظت نمک‌های محیط کشت‌ها دقیقاً بر اساس گزارش سریسکانداراجاه[5] و گودوین (1998) تهیه گردید. غلظت مواد هر دو محیط کشت در جدول 1 آمده است. علاوه بر نوع محیط کشت تاثیر 3 ماده دیگر (زغال فعال، فلوروگلوسینول، هورمون جیبرلین) بر روی پرآوری، شاخه‌زایی و طول شاخه‌های این ارقام سیب بررسی شد.

زغال فعال به میزان 1000 میلی‌گرم در لیتر، فلوروگلوسینول به میزان 80 میلی‌گرم در لیتر و جیبرلین 2 میلی‌گرم درلیتر به‌کار رفتند. تمام کشت‌ها درون شیشه‌های 250 میلی‌لیتری، با 35 میلی‌لیتر محیط کشت، کشت شدند. نمونه‌ها بعد از کشت به محیط‌های رشد با شرایط رشدی ذیل شامل دمای محیط برابر 2±25 درجه سانتی‌گراد، با دوره نوری 16 ساعت روشنائی و 8 ساعت تاریکی و شدت نور 4000 لوکس منتقل شدند. جوانه‌های موجود در گره‌ها پس از مدتی شروع به رشد کردند. در پایان تعداد جوانه‌های رشد کرده و هم‌چنین اندازه شاخه‌ها محاسبه گردید. نتایج حاصل، یک ماه بعد از کشت ریز نمونه‌ها (شاخه‌ها) بر روی محیط کشت ثبت شد. برای انجام آزمایش برای هر تیمار 4 تکرار و در هر تکرار 3 شاخه کشت گردید. طرح آماری به‌صورت آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملا تصادفی انجام گرفت. به این‌صورت که دو عامل نوع محیط کشت و نوع ترکیبات بیوشیمیایی بررسی شد. نوع محیط کشت در دو سطح (محیط کشت N6 و MS) و نوع ترکیبات بیوشیمیایی در سه سطح (جیبرلین mg/l 2، فلوروگلوسینول mg/l 80 و زغال فعال 1/l) در نظر گرفته شد. نتایج با استفاده از نرم افزار آماری MSTATC تجزیه واریانس گردیدند. مقایسه میانگین-ها بر اساس آزمون دانکن در سطح احتمال 5% انجام گرفت.

نتایج

در آزمایش‌های پر آوری در هر تکرار تعداد جوانه‌های جانبی (موجود در کنار برگ‌ها) فعال شده یا رشدکرده (روی شاخه‌های کشت شده در محیط کشت) و هم‌چنین طول این شاخه‌ها بر حسب سانتی‌متر معین شد و در نرم افزار MSTAT-C وارد گردید (شاخه‌هایی که کم‌تر از 0/5 سانتی-متر رشد کرده بودند و بعداً رشدشان متوقف شده بود در نظر گرفته نشدند). نتایج به‌دست آمده از این آزمایش بااستفاده از نرم‌افزار MSTAT-C تجزیه و تحلیل شد و مشخص شد که میانگین تعداد شاخه‌های رشد کرده در هر تکرار در محیط MS (6/1) نسبت به محیط N6 (3/5) بیشتر بود (شکل 2، بالا). ارتفاع شاخه‌ها نیز در محیط MS (1/9) بیشتر از محیط N6 (1/1) بود. نتایج به‌دست آمده از نظر آماری در سطح احتمال 5 درصد اختلاف معنی‌دار نشان دادند (شکل 2، پایین). از بین مواد مختلفی که در محیط کشت استفاده شد، محیط کشت حاوی زغال فعال هیچ تاثیری روی پرآوری شاخه نداشت. در عوض محیط کشت حاوی جیبرلین به اضافه فلوروگلوسینول بیش‌ترین جوانه فعال شده را داشت، ولی این اختلاف از نظر تعداد شاخه تولید شده (جوانه‌های فعال شده و رشد کرده) از نظر آماری با محیط کشتی که حاوی جیبرلین بود تفاوت نداشت (شکل 3).

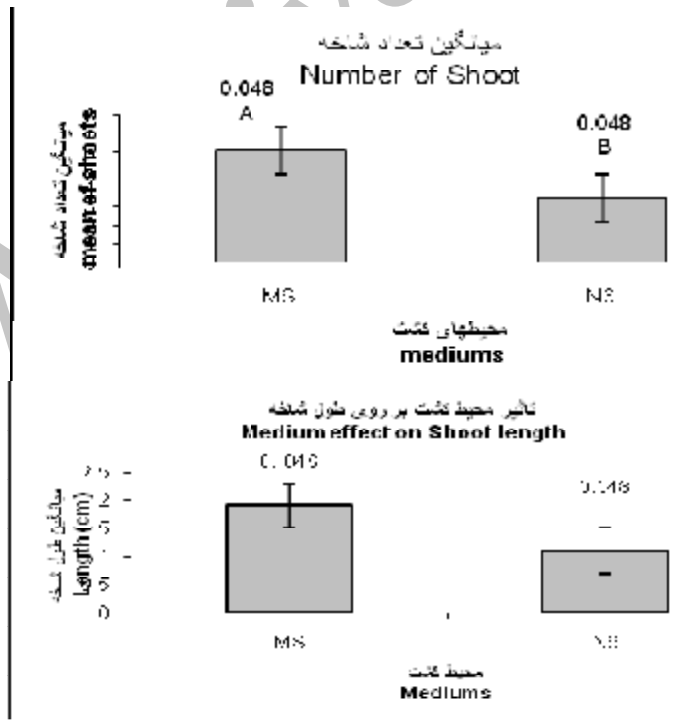
1. Jones
2. Oliveira *et al.*
3. Rocha *et al.*
4. Inder Pal *et al.*
5. Siriskandarajah and Goodwin

www.SID.ir

جدول 1: ترکیبات محیط کشت‌های MS و N6

Table 1: Components of MS and N6 mediums

(mg/l) MS (موراشیگ واسکوگ)	(mg/l) N6 (تغییر یافته به‌وسیله ولاندر)	ترکیبات (Components)
NH4NO3	-	1650
(NH4)2SO4	463	-
KNO3	2830	1900
CaCl2.2H2O	166	440
MgSO4	185	370
KH2PO4	400	170
Na2EDTA	37.5	37.5
FeSO4	27.8	27.8
MnSO4.4H2O	22.3	22.3
ZnSO4.7H2O	8.6	8.6
H3BO3	6.2	6.2
KI	0.83	0.83
Na2MoO4.2H2O	0.25	0.25
CuSO4.5H2O	0.025	0.025
CoCl2.6H2O	0.025	0.025
Niconitic acid	0.5	0.5
Thiamin.HCl	0.1	0.1
Pyrodoxine	0.5	0.5
Glycine	2.0	2.0
Myo_inositol	100	100
Sucrose	30000	30000
Agar_Agar	7000	7000



شکل2 : تاثیر دو محیط کشت MS و N6 بر تعداد شاخه‌های تولید شده (بالا) وطول شاخه‌ها (پایین)

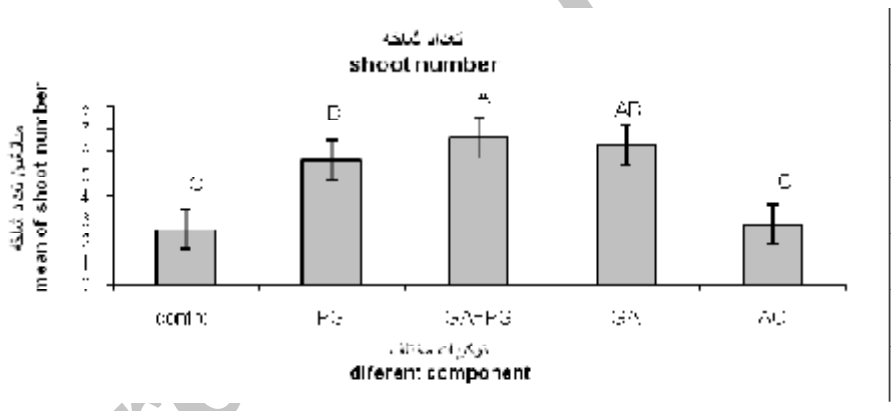
Fig 2: Effect of two MS and N6 medium on: Shoot production (above) Shoot length(blow)

Columns with the same letters are not significantly different at 1% level of probability using DMRT

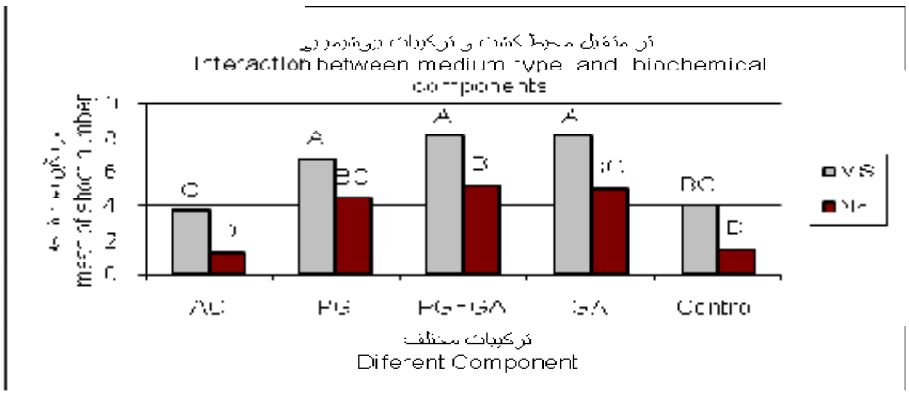
Archive of SID

www.SID.ir

وقتی میزان تاثیر ترکیبات مختلف به‌طور جداگانه در دو محیط‌کشت MS و N6 بررسی شد، در طی یک ماه اول بعد از کشت مشخص گردید که سه تیمار GA+PG، PG و GA از نظر میزان تولید شاخه روی هر محیط کشت با هم اختلاف دارند ولی این اختلاف از نظر آماری معنی‌داری نیست. ولی این محیط‌های کشت نسبت به محیط کشت شاهد و محیط‌کشت حاوی زغال فعال بهتر بودند و این موضوع از نظر آماری هم معنی‌دار بود (شکل 4). طول شاخه‌ها در محیط حاوی جیبرلین به‌اضافه فلوروگلوسینول (PG+GA) بیشتر از بقیه محیط‌ها بود (شکل 5، بالا). در بررسی نتایج تفکیکی طول شاخه، مربوط به هر محیط کشت (اثر متقابل)، مشخص شد که اختلاف بین ترکیب جیبرلین به اضافه فلوروگلوسینول (PG+GA) با ترکیب جیبرلین در روی محیط MS از نظر آماری معنی‌دار نیست، هم‌چنین اختلاف بین محیط حاوی جیبرلین و فلوروگلوسینول هم معنی‌دار نیست. بر روی محیط N6، طول شاخه‌ها در محیط حاوی جیبرلین به اضافه فلوروگلوسینول بیشتر از بقیه محیط‌ها بود ولی از نظر آماری بین ترکیبات جیبرلین، فلوروگلوسینول و جیبرلین به اضافه فلوروگلوسینول اختلاف معنی‌داری وجود نداشت (شکل 5، پایین). رشد شاخه‌ها در محیط حاوی فلوروگلوسینول فقط در مراحل اولیه و یک ماه اول سریع بود و بعد از این مدت، رشد شاخه‌ها کم و یا متوقف شد. اما در محیط‌های حاوی جیبرلین رشد شاخه‌ها مداوم بود و ارتفاع شاخه‌ها بعد از 6 هفته خیلی بیشتر از شاخه‌های رشد کرده در محیط فلوروگلوسینول بود. در محیط‌های حاوی فلوروگلوسینول، شیشه‌ای شدن نمونه‌ها تا حد زیادی کاهش یافته و یا به کلی بر طرف شد. زغال فعال نیز تا حدی این ویژگی را داشت. وجود جیبرلین در محیط کشت باعث تداوم رشد در مدت زمان بیشتری شد و تاثیر طولانی‌تری نسبت به فلوروگلوسینول داشت. برگ‌ها در حضور فلوروگلوسینول رشد بهتر و طبیعی‌تری داشتند و گسترده تر یا پهن‌تر بودند، در حالی‌که در مورد جیبرلین بعد از یک ماه برگ‌ها ریزتر و کوچک‌تر بودند و فاصله میانگره‌ها هم بیشتر بود.

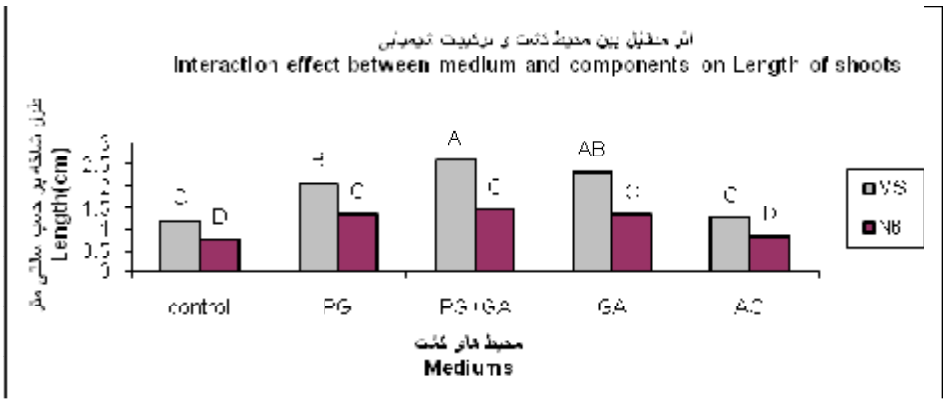


شکل 3: تاثیر ترکیبات مختلف بر روی شاخه‌زایی
Fig3: Effect of different component on shoot production mean



شکل 4: اثر متقابل ترکیبات مختلف و محیط کشت بر روی شاخه زایی
Fig 4: Interaction effect of different components and medium type on shoot mean
Columns with the same letters are not significantly different at 1% level of probability using DMRT

www.SID.ir



شکل 5: اثر ترکیبات مختلف در میانگین طول شاخه‌ها (بالا)، اثر همان ترکیبات به تفکیک روی هر دو محیط (پایین)
Fig 5: Interaction effect of different components and medium type on shoot length mean
Columns with the same letters are not significantly different at 1% level of probability using DMRT

بحث

بهبود انجام ریزازدیادی با استفاده از اسید جیبرلیک و فلوروگلوسینول قبلا گزارش شده است (*گاسپار* و همکاران، 1996 و *شارما* و همکاران، 2000). برای نیل به این هدف از دو محیط کشت پایه و سه ماده دیگر در ترکیب با آن‌ها استفاده گردید. در محیط MS میزان یون‌های نیتروژن کل بیشتر از محیط N6 است. میزان نیتروژن به‌طور مستقیم بر رشد شاخه‌ها تاثیر می‌گذارد (احمدی و سی‌و سه‌مرده، 1380). به‌نظرمی‌رسد که این موضوع یکی از عوامل رشد زیاد شاخه‌ها در محیط MS نسبت به N6 است.

جیبرلین به‌عنوان هورمونی که باعث رشد طولی شاخه‌ها می‌شود، در این مورد نیز باعث رشد سریع‌تر و طویل شدن آن‌ها گردید. جیبرلین‌ها می‌توانند موجب رشد واریته‌های پاکوتاه به صورت پا بلند گردند (احمدی و سی‌و سه‌مرده، 1380). با توجه به این‌که یک هورمون فقط در صورتی موجب افزایش طول می‌گردد که کمبود آن هورمون در بافت وجود داشته باشد، این داده‌ها منعکس کننده وضعیت پایین غلظت این هورمون در این بافت‌ها است (احمدی، 1380). جوانه‌های رشد کرده در محیط حاوی جیبرلین، دارای برگ‌های کوچک‌تر و شاخه‌های کشیده بودند که این موضوع در هنگام استفاده از جیبرلین معمولا مشاهده می گردد. (احمدی و سی‌و سه‌مرده، 1380) در این تحقیق نیز این هورمون باعث رشد سریع‌تر و طویل شدن شاخه‌ها گردید.

دمیرالی[1] در سال 1998 نشان داد که کشت‌های *Ficus Carica* بر روی محیط کشت حاوی 89 میلی‌گرم در لیتر فلوروگلوسینول یا زغال فعال بیش‌ترین درصد تشکیل شاخه (51%) را دارند. کاربرد اصلی فلوروگلوسینول در ریشه‌زایی است (*باسوک*[2] و همکاران، 1981)، اما گاهی روی پرآوری نیز موثر است (میری و همکاران، 1382). *وبستر*[3] و جونز (1989) گزارش کردند که فلوروگلوسینول در غلظت 162 میلی‌گرم در لیتر می‌تواند موجب افزایش تولید شاخساره در پایه‌های P_2 و B9 سیب شود. *شارما* و همکاران (2000) مشاهده کردند که کاربرد 100 میلی‌گرم در لیتر فلوروگلوسینول موجب افزایش پرآوری ریزنمونه‌های MM106 سیب می‌گردد. فلوروگلوسینول در غلظت‌های بالاتر از 80 میلی‌گرم درلیتر نیز در پژوهش‌های مربوط به کشت پایه M106 و M9 اضافه شد، ولی میزان رشد اختلاف چندانی با غلظت 80 میلی‌گرم در لیتر نداشته است (میری و همکاران، 1381). در آزمایش‌های انجام گرفته بر روی سیب پایه گمی‌الماسی، این ماده در غلظت 80 میلی‌گرم در لیتر در ماه اول سبب رشد مناسب طول شاخه‌ها گردید، هرچند این رشد با ادامه کشت، کاهش یافت. هم‌چنین این ماده اثر مثبتی بر رشد برگ‌ها از خود نشان داد. فلوروگلوسینول هم‌چنین باعث کاهش شیشه‌ای شدن شاخه‌ها در نمونه‌های مورد آزمایش شد. تاثیر فلوروگلوسینول بر افزایش پرآوری با اثر آن روی کاهش شیشه‌ای شدن همراه است. بیوسنتز استوفلوروگلوسینول که به‌وسیله خوشه ژنی *phlACBDE* در *Pseudomonas fluorescens* Pf5 کد می‌شود، کشف شده است. هم‌چنین مشخص شده است که فلوروگلوسینول فعالیت آنزیم کاتالاز و بیان پروتئینی آن را افزایش می‌دهد.

1. Demiralay

2. Bassuk *et al.*
3. Webster and jones

Archive of SID
www.SID.ir

به‌علاوه، کاتالاز اثر حفاظتی فلوروگلوسینول در برابر تخریب سلولی ناشی از H_2O_2 را از بین می‌برد. هم‌چنین فلوروگلوسینول فسفریلاسیون سیگنال خارج سلولی تنظیم کننده کیناز(ERK) را افزایش می‌دهد. پس در نتیجه فلوروگلوسینول یک ماده موثر برای کاهش تنش اکسیداتیو و اثرات ناشی از آن و تخریب سلول‌ها است که این کار با تلفیق تحریک فعالیت کاتالاز سلولی و مسیر سیگنال ERK انجام می‌گیرد. در نتیجه کاهش تنش اکسیداتیو موجب کاهش شیشه‌ای شدن کشت‌ها می‌گردد. (*کانگ* و همکاران 2006).

همان‌طور که قبلاً اشاره شد، وجود جیبرلین در محیط کشت باعث رشد سریع‌تر شاخه‌ها شد ولی این رشد سریع اثر خود را دیرتر از اثر فلوروگلوسینول نشان داد. به‌طوری‌که گیاهانی که در محیط کشت فلوروگلوسینول تنها کشت شده بودند زودتر از گیاهانی که در محیط کشت جیبرلین تنها کشت شده بودند، شروع به رشد کردند. ولی این رشد کوتاه مدت بود و بعد از مدتی متوقف شد. این پدیده در نتایج قبلی گزارش نشده و یا مورد بررسی قرار نگرفته است. علت آن را می‌توان به اثر زود هنگام و زود گذر در بیان ژن‌های موثر در رشد طولی شاخه نسبت داد، لذا باید الگوی بیان این ژن‌ها بررسی گردد و تحقیقات بیشتری دراین زمینه و در سطح بیان ژن‌ها صورت گیرد.

با توجه به نتایج به‌دست آمده در این پژوهش، محیط کشت MS به همراه ترکیب فلوروگلوسینول با غلظت 80 میلی‌گرم در لیتر و 2 میلی‌گرم در لیتر جیبرلین برای تکثیر درون شیشه‌ای و رشد سریع پیشنهاد می‌شود. هم‌چنین در این پژوهش فلوروگلوسینول ترکیب مناسبی برای برطرف کردن حالت شیشه‌ای شاخه‌ها و زیر کشت‌ها به‌دست آمد و بر خلاف نتایج *دمیرالی* و همکاران (1998) زغال فعال تاثیری بر پرآوری شاخه‌ها نداشت.

Archive of SID

www.SID.ir

منابع

احمدی، ع. و سی و سه‌مرده، ع. 1380. فیزیولوژی گیاهان زراعی. انتشارات دانشگاه تهران. ص 340.

رادنیا، ح. 1375. پایه‌های درختان میوه. نشر آموزش کشاورزی، کرج، ص .637.

زاد شکویان، ح. 1371. معرفی یک نوع پایه سیب پاکوتاه محلی (گمی‌آلماسی). خلاصه مقالات پنجمین سمینار تحقیقات باغبانی کشور (مشهد)، ص 15-14.

میری، م.، واعظ لیواری، ب.، خلیقی، ا. و قائم مقامی، ع. 1382[a]. تاثیر کربوهیدرات، جیبرلیک اسید ، ایندول بوتیریک اسید، فلوروگلوسینول، نحوه قرارگیری ریزنمونه در محیط و حجم ظروف کشت در بهینه سازی تکثیر درون شیشه‌ای پایه M.9 سیب. پژوهش و سازندگی، شماره 59، ص 36-31.

میری، م.، واعظ لیواری، ب.، خلیقی، ا. و قائم مقامی، ع. 1382[b]. کاهش اکسیداسیون فنلی و پر آوری درون شیشه‌ای شاخساره‌های هم‌گروه‌های سیب M9 و M26. مجله علوم و فنون باغبانی ایران، ج 4، ص 154-145.

ناصری، ل.، جلیلی مرندی، ر. و قدیم‌زاده. م. 1385. مطالعه خصوصیات گیاه شناسی، فیزیولوژیکی و فنولوژیکی پایه سیب گمی‌آلماسی. گزارش نهایی طرح تحقیقاتی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه، ص 57.

Aklan, K., Cetiner, S., Aka-Kacar, Y. and Yalcin-Mendi, Y. 1997. In vitro multiplication of clonal apple rootstocks M.9 and M.26 and MM.106 by meristem culture. Acta Horticulture, 441: 325-327.

Bassuk, N. L., Hunter, L. D. and Howard, B. H. 1981. The apparent involvement of polyphenol oxidase and phloridzin in the production of apple rooting co-factors. Journal of Hortivultural Science, 56: 313-322.

Demiralay, A., Yalçin-Mendi, Y., Aka-Kaçar, Y. and Çetiner, S. 1998 in vitro propagation of *ficus carica* l. var. bursa siyahi through meristem culture I International Symposium on Fig, Izmir, Turkey, p:480

Gaspar, T. A., Kevers, C., Panel, C., Greppin, H. M., Reid, D. and Thorpe, T. A. 1996. Plant hormones and plant growth regulators in plant tissue culture. In vitro Cellular and developmental biology, 32: 272-289.

Inder Pal, M., Sandip, S., Bharate, B. and Bhutani, K. K. 2005. Anti-HIV natural products. Current Science, 89: 2-25.

Jones, O. P. 1976. Effect of phloridzin and phloroglucinol on apple shoots. Nature, 262: 392-393.

Kang, K. A., Lee, K. H., Chae, S., Zhang, R., Jung, M. S., Ham, Y. M., Baik, J. S., Lee, N.H. and Hyun, J. W. 2006. Cytoprotective effect of phloroglucinol on oxidative stress induced cell damage via catalase activation. Journal of Cellular Biochemistry, 97: 609–620.

Miri, M., Vaez Livari, B., Khaligi, A. and Ghaemmagami, A. 2003. Reduction of phenolic oxidation and in vitro propagation of M9 and M26 apple shoots. Iranian Journal of Horticulture science and technology, 4:145-154 (in Farsi).

Miri, M., Vaez Livari, B., Khaligi, A. and Ghaemmagami, A. 2003. Effect of carbohydrates, Giberlice acid, Indol butyric acid, phloroglusinol, explants direction in medium and vessel volume on in vitro propagation of M9 rootstock. Pajuhesh va Sazandegi, 59:31-36 (in Farsi)

Naseri, L., Jalili Marandi, R. and Ghadimzadeh, M. 2006. Study of botanical, physiological, and phonological of Gami Almasi apple. Final report of research plan, Agriculture faculty, Urmia university 57 pp (in Farsi).

Oliveira, A. J. B., Carvalho, V. M., Ferreira, A. F. Y., Pires, F., and Machado. S. 2003. In vitro multiplication of *Tabernaemontana fuchsiaefolia* **L.** (Apocynaceae). R. Arvore, Vichosa-MG, 27: 421-425 .

Rocha, L., Marston, A. and Potterat, O. 1995. Antibacterial phloroglucinols and flavonoids from *Hypericum brasiliense*. Phytochemistry, 40: 1447-1452.

Sharma, M., Modgil, M. and Sharma, D.R. 2000. Successful propagation in vitro of apple rootstock MM106 and influence of phloroglusinol. Indian Journal Experimental Biotechnology. 38: 1236-1240.

Sriskandarajah, S. and Goodwin, v. 1998. Conditioning promotes regeneration and transformation in apple leaf explants. Pl. Cell Tiss.Org. Cult., 53: 1–11

Webster, C. A. and Jones, O. P. 1989. Micropropagation of apple rootstock M.9: effect of sustained subculture on apparent rejuvenation in vitro. Journal of Hort Science. Sci., 64: 421-428.

Welander, M. and Maheswaran, M. (1991). "Regeneration and transformation experiments in apple" In M.R. Ahuja "Woody plant biotechnology". Proceedings of a Workshop at the Institute of Forest Genetics, USDA Forest Service, October USA. 210:237-246.

Wilson, F. M. and James D. J. 2003. Regeneration and transformation of the Premier UK apple (Malus ×Pumola Mill) Cultivar Queen Cox . Journal of Horticultural Science & Biotechnology. 78:656-662.

Zadshakuyan, H. 1992. A new native dwarf apple rootstock introduction (Gami almasi), 5th National Horticulture Research seminar, Mashhad Iran pp14-15(in farsi).

Archive of SID

www.SID.ir

Effect of Medium Type and Some Biochemical Components on *in vitro* Proliferation of Dwarf Rootstock of Apple (*Malus Domestica* Borkh cv Gami Almasi)

Mohseniazar[1], M., Nazeri[2], S., Ghadimzadeh[3], M. and MALBOOBI[4], M. A.

Abstract

Proliferation of different plants is need for micropropogation and its *in vitro* studies. Optimizing and maximizing shoot proliferation is a basic objective of micropropagation and much attention has been focused on components that used in the culture medium and type of medium. Gami Almasi is a dwarf rootstock of apple (*Malus domestica* Borkh) that grow on North West of Iran and suitable for different cultivars of apple. In this study two different basal medium including N6 and MS salts with different biochemical components involve Phloroglucinol(PG), active charcoal(AC) and Gibberellic acid (GA), was tested on proliferation and shoot elongation. *In vitro* growing shoots were used for these experiments. Results showed MS medium was better than N6 in apple proliferation case. Active charcoal hasn't any effect on *in vitro* proliferation. Phloroglucinol as a phloridzin derivative had significant effect on proliferation. Phloroglucinol induced the transient proliferation in first month after culture and GA induced stable proliferation of shoots. The combine Phloroglucinol at 80 mg/l and GA at 2 mg/l had the best results in proliferation of apple shoots. Results from this experiments indicated enhanced proliferation of apple shoots and also the occurrence of hyperhydric shoots was lower in the Phloroglucinol medium. Active charcoal had no significant effect on proliferation of apple.

Keywords: Apple, *in vitro*, Gami Almasi, Medium, Phloroglosinol, Proliferation

Archive of SID

1. M.Sc of Biotechnology, Department of Horticulture, faculty of Agriculture, Urmia University, Urumieh.
2. Assistant Professor, Biotechnology department, faculty of Agriculture, Bu ali sina University, Hamedan.
3. Assistant Professor, Department of aGronomy and Plant Breeding, faculty of Agriculture, Urmia University. Urumieh.
4. Associated professor of National Institute of Genetic engineering and Biotechnology, Tehran.
∗: Corresponding author - Email: mohseniazar@gmail. com

www.SID.ir