تاثیر کربوهیدرات، جیبرلیک اسید، ایندول بوتیریک اسید، فلوروگلوسینول، نحوه قرارگیری ریزنمونه در محیط و حجم ظروف کشت در بهینه سازی تکثیر درون شیشه ای پایه M.9 سیب

• **سید مهدی میری**، کارشناس ارشد علوم باغبانی
• **بهزاد واعظ لیواری**، سازمان پژوهشهای علمی و صنعتی ایران
• **احمد خلیقی**، دانشگاه آزاد اسلامی- واحد علوم و تحقیقات
• **سید علی قائم مقامی**، سازمان پژوهشهای علمی و صنعتی ایران

تاریخ دریافت: اردیبهشت ماه ۱۳۸۲ تاریخ پذیرش: مهرماه ۱۳۸۲

چکیده

در این پژوهش، به منظور بهینه سازی پرآوری درون شیشه ای شاخساره های پایه M.9 سیب، فاکتورهای کربوهیدرات (ساکارز و سوربیتول)، اسید جیبرلیک (GA_3)، ایندول بوتیریک اسید (IBA)، فلوروگلوسینول (PG)، نحوه قرار گیری ریزنمونه در محیط کشت (عمودی، افقی و وارونه) و همچنین حجم ظروف کشت مورد بررسی قرار گرفت. محیط کشت پایه مورد استفاده MS حاوی $1/5\ mg.l^{-1}$ BA و $1\ mg.l^{-1}$ Kin بود و جهت آزمایشات از شاخساره های یک سانتیمتری درون شیشه ای استفاده شد. نتایج این پژوهش نشان داد که سوربیتول کربوهیدرات مناسب تری برای پرآوری در مقایسه با ساکارز می باشد. GA_3 و PG تاثیری روی تعداد شاخساره نداشتند اما در افزایش طولشان موثر بودند. کاربرد IBA تاثیری روی پرآوری نداشت. نحوه قرار گیری ریزنمونه در محیط کشت تاثیر معنی داری بر پرآوری داشت و با قرار دادن شاخساره ها به صورت عمودی، پرآوری بهتری نسبت به وضعیت قرارگیری وارونه بدست آمد. افزایش حجم ظرف از ۲۵ میلی لیتر به ۱۲۵ میلی لیتری، تاثیری بر پرآوری شاخساره های M.9 نداشت. با توجه به نتایج بدست آمده می توان پیشنهاد کرد که برای بهبود پرآوری M.9 از محیط کشت پایه (MS دارای $1/5\ mg.l^{-1}$ BA و $1\ mg.l^{-1}$ Kin و ۸ $mg.l^{-1}$ آگار) حاوی ۳۰ $g.L^{-1}$ سوربیتول، GA_3 $0/1\ mg.l^{-1}$، $162\ mg.l^{-1}$ PG استفاده و همچنین شاخساره ها را بصورت عمودی در محیط کشت قرار داد.

کلمات کلیدی: سیب، پرآوری، کربوهیدرات، جیبرلیک اسید، ایندول بوتیریک اسید، فلوروگلوسینول، نحوه قرارگیری ریزنمونه، حجم ظرف کشت

Pojouhesh & Sazandegi No:59 pp:31-37

Effect of carbohydrate, gibberellic acid, indolebutyric acid, phloroglucinol, explant orientation and culture vessels volume on optimizing *in vitro* propagation of M.9 apple rootstock

by: S. M. Miri, MSc of Horticultural Science
B. Vaez Livari, Iranian Research Organization for Science and Technology
A. Khalighi, Islamic Azad University, Science and Research Branch
S. A. Ghaem maghami, Iranian Research Organization for Science and Technology

In this research, with the purpose to optimize *in vitro* shoot proliferation of M.9, the factors of carbohydrate, gibberellic acid (GA_3), indolebutyric acid (IBA), phloroglucinol (PG), explant orientation and culture vessels volume were studied. The basal medium was MS supplemented with 1.5 $mg.l^{-1}$ BA and 1 $mg.l^{-1}$ Kin. Shoot explants 1 cm in length were taken from *in vitro* samples. The results showed that sorbitol was more suitable as a carbohydrate for multiplication than sucrose. GA_3 and PG had no effect on number of shoots, but affected length of shoots. Application of IBA had no effect on proliferation. Explant orientation has significant effect on proliferation and the best resutls were obtained with vertical orientation. Increase in vessel volume from 25 ml to 125 ml had no effect on shoots proliferation of M.9. On the basis of the results, is suggested for improving of M.9 proliferation were used from basal medium culture (MS with 1.5 $mg.l^{-1}$ BA, 1 mg.l-1 Kin and 8 $g.l^{-1}$ agar) containing 30 $g.l^{-1}$ sorbitol, 0.1 $mg.l^{-1}$ GA_3, 162 $mg.l^{-1}$ PG. Also, shoots put in meduim vertically.

keywords: Apple, Proliferation, Carbohydrate, Gibberellic acid, Indole-3-butyric acid, Phloroglucinol, Explant Qrientation, Culture Vessel

Archive of SID
www.SID.ir

مقدمه

پایه M.9 سیب (*Malus pumila* Mill.) از پایه های رویشی می باشد که به دلیل پاکوتاهی، زودباردهی و افزایش تولید و عملکرد به میزان زیادی در کشت باغات متراکم سیب استفاده می شود (۹). روش معمول تکثیر این پایه خوابانیدن کپه ای می باشد و گاهی نیز از خوابانیدن شیاری استفاده می شود (۱). از حدود ۲ دهه پیش علاوه بر این دو روش، از ریزازدیادی[1] نیز برای تکثیر این پایه استفاده شده است (۲۳، ۳۵). در اکثر آزمایشات انجام شده، سایتوکینین ها مورد بررسی قرار گرفته و کمتر به سایر مواد و تنظیم کننده های رشد و همچنین عوامل فیزیکی موثر در پرآوری توجه شده است. بهمین منظور این پژوهش، تاثیر کربوهیدرات، GA_3[2]، نحوه قرارگیری ریزنمونه در محیط کشت و حجم ظروف کشت جهت بهینه سازی پرآوری درون شیشه ای شاخساره های M.9 مورد بررسی قرار گرفته است.

قند جزء بسیار مهمی از محیط کشت است و در اکثر شرایط رشد معمولاً برای فتوسنتز کافی نیست، اضافه کردن آن به محیط ضروری است. قند معمول در کشت درون شیشه ای، ساکارز می باشد (۲۲) اما بعضی گیاهان به سایر قندها (همانند گلوکز و فروکتوز) پاسخ بهتری می دهند (۶). در مورد سیب نیز بیشتر محققین از ساکارز با غلظت ۳-۲٪ به عنوان منبع انرژی ریزنمونه ها استفاده کرده اند (۳۳). اما بعضی آزمایشات نشان داده است که سوربیتول منبع کربن مناسبتری برای پرآوری درون شیشه ای سیب در مقایسه با سایر قندها می باشد (سوربیتول فرآورده اصلی فتوسنتز و فرم انتقالی کربوهیدرات در بافت های آوندی سیب و چندین جنس از تیره Rosaceae می باشد (۷، ۱۸، ۱۹، ۳۰ ، ۳۱، ۳۳، ۳۷).

جیبرلین ها موجب رشد طولی میانگره ها و رشد مریستم یا جوانه می شوند. در بین جیبرلین ها، GA_3 بیشتر از همه مورد استفاده قرار می گیرد (۲۳). گزارشاتی از تاثیر مثبت یا منفی جیبرلین ها روی تشکیل ساقه نابجا وجود دارد که این اختلافات ممکن است ناشی از این باشد که جیبرلین ها روی القاء مریستموئید اثر بازدارنده دارند اما برای رشد و نمو اندام های از پیش تشکیل شده مفید هستند (۱۱).

اکسین ها (عموماً IBA[4]) بوسیله بعضی از محققین در مرحله پرآوری (همراه با سایتوکینین) استفاده شده است. اما وجود آن در محیط کشت ضروری نیست و در بعضی از غلظت ها نیز از رشد شاخساره جلوگیری می کند (۲۴). James و Thurbon (۱۵،۱۴)، Radojevic Golosin (۱۲)، Jones, webster (۳۵) و Singer (۳۰، ۳۱) از IBA $0/1 mg.l^{-1}$ در مرحله پرآوری پایه M.9 استفاده کردند.

فلوروگلوسینول[5] جزء ترکیبات فنلی و از مشتقات فلوریدزین[6] می باشد. کاربرد اصلی PG در ریشه زایی است (۵) اما گاهی روی پرآوری نیز موثر است (۱۶، ۳۲، ۳۶). Webester و Jones (۳۶) گزارش کردند که PG در غلظت $162 mg.l^{-1}$ می تواند موجب افزایش تولید شاخساره در پایه های $P._2$ و $B.^9$ شود. Sharma و همکاران (۳۲) نیز مشاهده کردند که کاربرد PG $100 mg.l^{-1}$ موجب افزایش پرآوری ریزنمونه های MM.۱۰۶ سیب می گردد.

ریزنمونه ها را می توان به صورت های عمودی، افقی و یا وارونه روی محیط کشت قرار داد. در این رابطه، آزمایشات چندی صورت گرفته و گزارش شده است که قراردادن شاخسارها بصورت وارونه و افقی، موجب افزایش پرآوری در مقایسه با حالت عمودی می شود (۲، ۱۲، ۳۴، ۳۸، ۳۹).

بین رشد و نمو ریزنمونه ها با حجم ظروف کشت نیز تا حدی ارتباط وجود دارد و گزارشاتی از رشد و نمو بهتر ریزنمونه های گیاهی در ظروف بزرگتر شده است (monet[illegible]) (۲۸) در آزمایشی روی انگور گزارش کرد که شاخساره های بیشتر و طویل تری با کشت آنها در ظروف بزرگتر بدست می آید.

مواد و روشها

در این آزمایشات، از شاخساره های یک سانتیمتری M.9 که در محیط ms[7] (۲۹) حاوی $1 mg.L^{-1}$ kin[9]، $1/5 mg.L^{-1}$ BA[8] و $8 g.L^{-1}$ **آگار** آگار (محیط کشت پایه) بطور ماهیانه واکشت می شدند، استفاده شد (۳). ریزنمونه ها جهت آزمایش به شیشه های مک کارتی ۲/۵×۸/۵ سانتیمتر حاوی ۸ میلی لیتر محیط منتقل شده و در اتاقک رشد با دمای $25\pm2^{\circ}C$، طول روز ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی و شدت نور حدود ۲۵۰۰ لوکس نگهداری شدند و تاثیر کربوهیدرات (سوربیتول و ساکارز در دو غلظت،

FBA (۰/۱ و ۰ mg.L)، PG (۰، ۸۱، ۱۶۲، ۲۴۳ $mg.L^{-1}$)

($g.L^{-1}$ ۳۰ و ۲۰)، GA_3 (۱ و ۰/۵، ۰/۱، ۰ mg.)،

نحوه قرارگیری ریزنمونه در محیط کشت (عمودی[10] یا ایستاده، افقی[11] یا خوابیده و وارونه[12]) و حجم ظرف کشت (۲۵ و ۱۲۵ میلی لیتر) مورد بررسی قرار گرفت.

در این بررسی از طرح کاملاً تصادفی با ۱۶ تکرار استفاده شد و مقایسه میانگین بر اساس آزمون دانکن در سطح ۰/۰۵ $P>$ انجام گرفت.

نتایج و بحث

همانطوریکه در جدول شماره ۱ دیده می شود، کربوهیدرات اثر معنی داری در سطح ۵٪ روی پرآوری داشته است. مقایسه پرآوری شاخساره های M.۹ در محیط حاوی سوربیتول و ساکارز نیز نشان داد که سوربیتول منبع قند مناسب تری نسبت به ساکارز می باشد و با غلظت $30 g.l^{-1}$ سوربیتول، نتیجه بهتری در مقایسه با $20 g.l^{-1}$ حاصل شد (نمودار شماره ۱). Marino و همکاران (۲۶،۲۵) و Kadota و همکاران (۱۷) در تحقیقی روی زردآلو و گلابی ژاپنی (*N. Prunus armeniaca* L. و *Pyrus pyrifolia*. از تیره Rosaceae) نیز پرآوری بیشتری را با سوربیتول در مقایسه با سایر قندها بدست آوردند.

در آزمایش تاثیر GA_3 روی پرآوری M.9 مشاهده شد که کاربرد آن تاثیر معنی داری روی مجموع تعداد شاخساره ها ندارد، اما روی تعداد شاخساره های بزرگتر از ۵ میلی متر موثر است (جدول شماره ۱)، هر چند

Archive of SID
www.SID.ir

کـه بین غلظت هـای بکار رفته اختلاف معنی داری وجود نداشـت (نمودار شماره ۲). با افزایش غلظت GA_3 از ۰/۱ به GA_3 ۱mg.l^{-1}، مجموع تعداد شاخسـاره ها کاهش و تعداد شاخسـاره ها ی بزرگتر از ۵ میلی متر افزایش غیر معنی داری داشتند. Lundergan و Janick (۲۴) در آزمایشی دریافتند کـه کاربـرد GA_3 ۰/۱ mg.l^{-1} اثـری روی پرآوری شاخسـاره های رقم Golden Delicious سـیب ندارد، اما در این آزمایش کاربرد GA_3 موجب افزایش تعداد شاخسارهای بزرگتر از ۵ میلی متر شد. با افزایش غلظت GA_3 تعداد شاخسـاره کاهش ولی طولشـان افزایش یافت (این کاهش و افزایش غیر معنی دار بود).

کاربـرد IBA در غلظـت ۰/۱ mg.l^{-1} تاثـیر معنـی داری روی پرآوری نداشـت (جدول شماره ۱ و نمودار شـماره ۱). در آزمایش دیگری که با پایه M.26 انجام گرفت نیز نتیجه مشـابهی بدسـت آمد (۳). Marn(۲۷) در تحقیقی روی ارقام Majda و *Golden Delicious* سیب گزارش کرد که افزودن IBA ۰/۱ mg.l^{-1} به محیط کشت حاوی BA ۱ mg.l^{-1} نمی تواند موجب بهبود معنی دار رشد و تکثیر دو رقم مذکور شود.

نتایج تاثیر PG روی پرآوری ریزنمونه های M.9 در جدول شـماره ۱ آورده شده است. همانطوریکه مشاهده می شود، PG تاثیر معنی داری روی مجموع تعداد شاخسـاره ها ندارد، اما روی تعداد شاخسـاره های بزرگتر از ۵ میلی متر در سطح ۵٪ موثر بوده و بیشترین میزان آن با غلظت PG ۱–۱۶۲ mg.l بدست آمد (نمودار شماره ۴). تاثیر مثبت PG روی پرآوری می تواند به دلیل اثر آن در رفع شیشه ای شدن[۱۳] ریزنمونه ها باشد. کاربرد PG در محیط کشـت از روش هایی اسـت که در جلوگیری از شیشه ای شدن استفاده می شود (۱۰). در این بررسی، ریزنمونه هایی که در محیط حاوی PG بودند کیفیت بهتری نسـبت به کشـت های بدون PG داشتند. Aklan و همکاران (۴) نیز برای برطرف کردن شیشـه ای شـدن ریزنمونه های Mm.106 از PG ۸۱mg.l^{-1} استفاده کردند.

نحوه قرارگیری ریزنمونه در محیط کشـت اثر معنی داری در سـطح ۵٪ روی پرآوری داشـته اسـت (جدول شـماره ۱). میـزان پرآوری شاخسـاره های M.9 که بصورت عمودی قـرار گرفته بودند افزایش معنی داری نسـبت به شاخساره های افقی نداشت (نمودار شماره ۵). کمتریـن میزان پرآوری کـه با دو وضعیت عمـودی و افقی اختلاف معنی دار داشـت نیز با شاخسـاره هایی بدست آمد که بصورت وارونه روی محیط کشت قرار داشتند. *Zimerman* و *Fordham* (۳۹) و در آزمایش مشابهی روی رقم Delicious و چند استرین آن دریافتند که میزان شاخه زایی در موقعیـت وارونه، ۳–۲ برابر موقعیت عمودی می باشـد و تعداد شاخسـاره های بزرگتر از ۵ میلی متر نیز تقریباً به همین میزان افزایش نشـان می دهد. همچنین آنها دریافتند که شاخساره هایی که به صورت افقی قرار داشـتند، نسبت به وضعیت عمودی شاخه زایی بیشتری دارند، هر چند که اختلاف معنی داری بین این دو وجود نداشـت. *Golosin* و *Radojevic* (۱۰) و همکاران (۳۸)، Turov staye (۳۴) و حسـینی مقدم (۲) نیز گزارش کردند که قرار دادن شاخساره ها بصورت افقی، موجب افزایش پرآوری در مقایسـه با حالت عمودی می شود. آنها علـت این امـر را افزایش میزان سـطح جذب ریزنمونـه در حالت افقی ذکر کردند. نتایجی که در این آزمایشـات بدسـت آمـد، عکس نتایج *Zimerman* و *Fordham* بود و شاخساره هایی که به صورت عمودی و افقی قرار گرفته بودند بیشـترین و شاخسـاره های وارونه کمترین پرآوری را داشـتند. آزمایش مشابهی نیز روی رقم Red Delicious انجام شد و همین نتایج بدست آمد (۳). در حالت وارونه، شاخساره های جدید حاصل از پرآوری، ابتدا رو به پایین رشـد کرده و سـپس به سـمت بالا متمایل شدند. در نتیجه قسمت بیشتر طول شاخساره ها درون محیط کشت قرار داشته و طبیعتاً سطح جذب عناصر غذایی توسط ریزنمونه افزایش یافت. این افزایش سطح جذب منجر به شیشه ای شدن شدید ریزنمونه ها شد و نتیجتاً میزان پرآوری نیز کاهش یافت. در حالت افقی نیز همین مسئله با شدت کمتری وجود داشت. بدین صورت که شاخساره های جدیداً بوجود آمده کمتر در محیط فرو رفته بودند و شدت شیشه ای شدن در آنها کمتر بود ولی همین میزان نیز موجب کاهش غیر معنی دار پرآوری در مقایسـه با

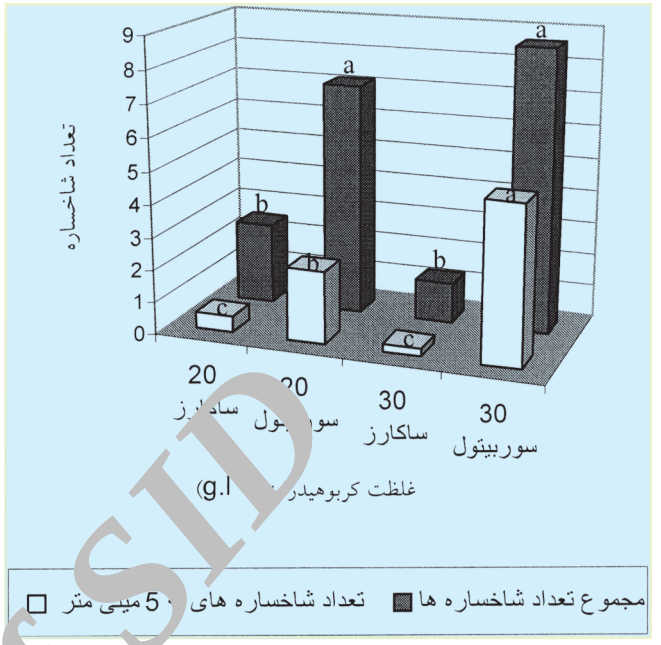
جدول شماره ۱- نتایج تجزیه واریانس اثر کربوهیدرات، اسید جیبرلیک، اندول، تیریک اسید، فلوروگلوسینول، نحوه قرارگیری ریزنمونه در محیط کشت، حجم ظروف کشت بر پرآوری شاخساره های M.9

منابع تغییر	درجه آزادی	میانگین مربعات مجموع تعداد شاخساره ها	میانگین مربعات تعداد شاخساره های بزرگتر از ۵ mm
کربوهیدرات	۳	۰/۲۷*	۰/۷۱*
خطا	۲۷	۰/۱۸	۰/۰۸
ضریب تغییر		۱۹/۹۸	۱۹/۸۵
GA_3	۳	۰/۱۴ns	۹/۹۸*
خطا	۲۶	۳/۵۴	۰/۰۳
ضریب تغییر		۲۲/۶۹	۷/۷۳
IBA	۱	۰/۰۰۰۰۷ns	۰/۰۱ns
خطا	۲۹۷	۰/۴۰	۰/۲۳
ضریب تغییر		۲۸/۱۱	۳۲/۵۲
PG	۳	۰/۰۷ns	۰/۰۳*
خطا	۲۷	۰/۱۱	۱/۶۳
ضریب تغییر		۱۱/۴۹	۱۱/۴۹
حوه قرارگیری ریزنمونه در محیط کشت	۲	۱/۰۳*	۱/۳۳*
خطا	۱۸	۱/۷۷	۰/۰۹
ضریب تغییر		۲۳/۶۵	۱۸/۱۶
حجم ظروف کشت	۱	۰/۰۲ns	۱/۹۴ns
خطا	۱۲	۳/۰۸	۰/۰۳
ضریب تغییر		۲۰/۱۱	۸/۱۶

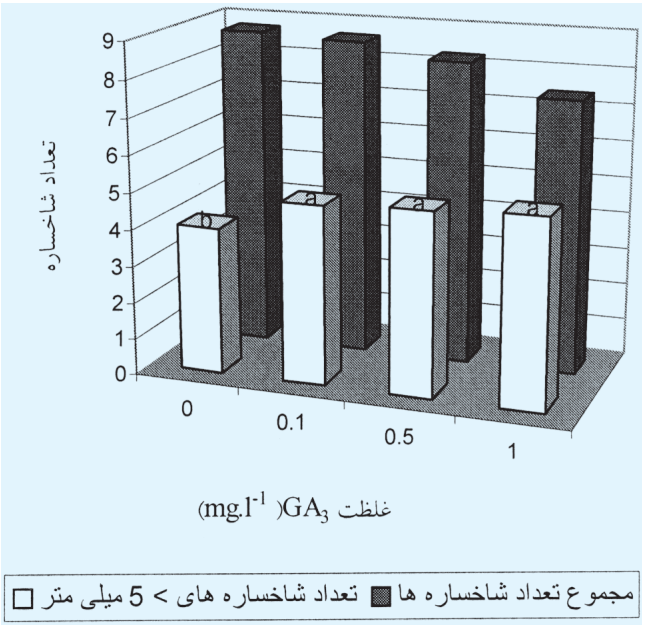
*: معنی دار در سطح احتمال ۵٪ ns: غیر معنی دار

Archive of SID

www.SID.ir



نمودار شماره ۱- مقایسه میانگین تاثیر کربوهیدرات بر پرآوری شاخساره های M.۹ (ستون های با رنگ مشابه دارای حروف مشترک در سطح احتمال ۵٪ اختلاف معنی دار ندارند)



نمودار شماره ۲- مقایسه میانگین تاثیر GA۳ بر پرآوری شاخساره های M.۹ (ستون های دارای حروف مشترک در سطح احتمال ۵٪ اختلاف معنی دار ندارند)

شاخساره های عمودی که رشد طبیعی و کیفیت خوبی داشتند شد. علت این نتایج متناقض می تواند به خاطر شرایط متفاوت کشت باشد و در صورت جلوگیری یا کاهش شیشه ای شدن شاخساره ها، نتایجی مشابه محققین مذکور بدست آورد.

افزایش حجم ظرف تاثیر معنی داری روی پرآوری شاخساره های M.9 نداشت (جدول شماره ۱ و نمودار شماره ۶). با این حال کیفیت شاخساره ها در ظروف کشت ۱۲۵ میلی لیتری بهتر از ظروف ۲۵ میلی لیتری بود و این شاخساره ها حالت شیشه ای شدن کمتری داشتند. Monette (۲۸) در آزمایشی روی انگور گزارش کرد که شاخساره های بیشتر و طبیعی تری با کشت آنها در ظروف بزرگتر بدست می آید. علت رشد و نمو بهتر می تواند به خاطر کاهش تراکم گازهای متصاعد شده از ریزنمونه ها (عمدتاً CO_2 و اتیلن)، میزان رطوبت و افزایش میزان مواد غذایی در دسترس باشد. CO_2، اتیلن و بخار آب موجب تحریک و تشدید شیشه ای شدن ریزنمونه ها و کاهش رشدشان می شود (۸، ۱۰، ۲۰). هر چند در این آزمایش افزایش حجم ظرف تاثیری بر پرآوری شاخساره های M.9 نداشت، اما در آزمایش مشابهی که روی پایه M.26 انجام شد طول شاخساره ها افزایش معنی داری در ظروف کشت ۱۲۵ میلی لیتری نسبت به ظروف ۲۵ میلی لیتری داشتند (۳). اینافزایش طول شاخساره ها ی M.26 در مقایسه با M.9 می تواند مربوط به حساسیت بیشتر ریزنمونه های M.26 به پدیده شیشه ای شدن باشد. شاخساره های هر دو پایه (خصوصاً M.26) در ظرف ۱۲۵ میلی لیتری کیفیت بهتری داشتند.

نتیجه گیری

با توجه به مجموع آزمایشات انجام شده می توان نتیجه گرفت که استفاده از محیط کشت پایه (MS دارای BA ۱/۵ mg.l^{-1} و Kin ۱ mg.l^{-1} و ۸ g.l^{-1} آگار) حاوی ۳۰ g.l^{-1} سوربیتول، GA_3 ۰/۱ mg.l^{-1}، PG ۱۶۲ mg.l^{-1} و همچنین قرار دادن شاخساره ها بصورت عمودی در محیط کشت، موجب بهبود پرآوری پایه M.۹ می شود. کاربرد IBA ۰/۱ mg.l^{-1} به همراه سایتوکینین ها به دلیل عدم تاثیرش روی پرآوری مورد لزوم نیست. هرچند در این آزمایش افزایش حجم ظرف تاثیری روی پرآوری نداشت اما به دلیل کیفیت بهتر شاخساره ها (که در مرحله ریشه زایی فاکتور بسیار مهمی است) در ظرف بزرگتر، استفاده از آن پیشنهاد می گردد.

سپاسگزاری

بدین وسیله از زحمات و همکاری کلیه کارکنان پژوهشکده کشاورزی سازمان پژوهشهای علمی و صنعتی ایران که در این تحقیق یاری نمودند صمیمانه تشکر می گردد.

پاورقی‌ها

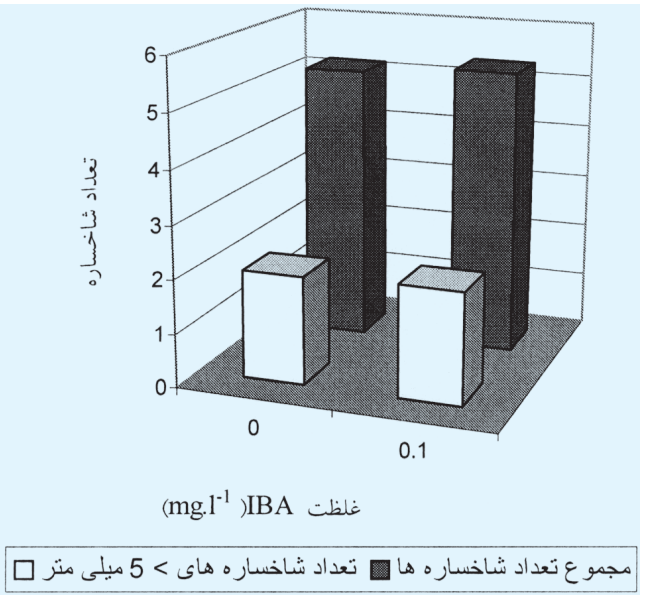
1-Micropropagation
2- Gibberellic acid
3-*In vitro* proliferation
4-Indole-3-butyric acid
5- Phloroglucinol
6- Phloridzin

Archive of SID
www.SID.ir

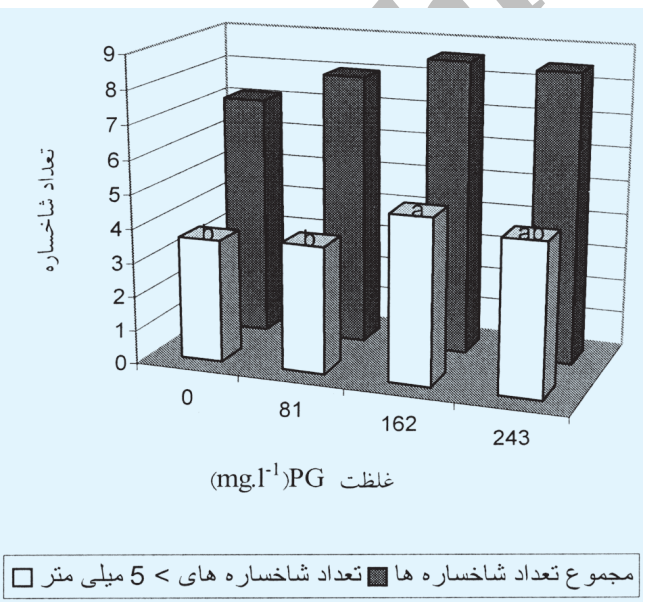
6- Belaizi, M. and P. Boxus, 1995. *In vitro* shoot multipilication of cork oak (*Quercus Suber* L.). Influenc of different carbohydrates. Bull. Rech. Agron. Gembloux. 30(1-2): 39-46.
7- Bieleski, R. L., 1982. Sugar alcohols. In: Encyclopedia of Plant Physiology, Vol. 13A. Bergmeyer, H. U. (ed). Springer-Verlag, Berlin. pp: 158-192.
8- Collin, H. A. and S. Edwards, 1998. Plant cell culture. BIOS Sci. Publ., Ltd. p: 131.
9- Feree, D. C. and R. F. Carlson, 1987. Apple rootstocks. In: Rootstocks for Fruit Crops. Rom, R. C.; Carlson, R. F. (eds.). New York, Wiley.
10- Gaspar, T., 1991. Vitrification in micropropagation. In: Biotechnology of Agriculture and Forestry, Vol. 17. Bajaj, Y. P. S. (ed.). Springer-Verlag Berlin Heidelberg. pp: 116-123.
11- Gaspar, T., C. Kevers, C. Penel, H. Greppin, D. M. Reid and T. A. Thorpe, 1996. Plant hormones and plant growth regolators in plant tissue culture. In vitro Cell. Dev. Bio. Plant. 32: 272-289.
12- Golosin, B. and L. Radojevic, 1987. Micropropagation of apple rootstocks. Acta Hort., 212: 589-594.
13- Graselle, R., C. Nicaise and P. Boxus, 1995. Regulation of *in vitro* shoot multiplication Persian walnut by different carbon source and by ammonium phosphate. Bull. Rech. Agron. Gembloux. 30(1-2): 47-53.
14- James, D. J. and I. J. Thurbon, 1979. Rapid *in*
7- Murashige and Skoog (1962)
8- 6-benzylaminopurine
9- Kinetin
10- Vertical
11- Horizontal
12- Inverted
13-Vitrification

منابع مورد استفاده

۱- بوذری، ناصر، ۱۳۷۴. بررسی و مقایسه روش های تکثیر رویشی (قلمه و خوابانیدن) پایه های سیب مالینگ و مالینگ مرتون (M.9، M.26، MM۱۰۶). پایان نامه کارشناسی ارشد باغبانی دانشگاه تربیت مدرس.
۲- حسینی مقدم ، حسین. ۱۳۷۴. بررسی تکثیر پایه های سیب از طریق کشت بافت. پایان نامه کارشناسی ارشد باغبانی دانشگاه تربیت مدرس.
۳- میری، سید مهدی، ۱۳۸۰. ریزازدیادی پایه های M.9 و M.26 دانشگاه آزاد اسلامی – واحد علوم و تحقیقات تهران.
4- Aklan, K., S. Cetiner, Y. Aka-Kacar and Y. Yalcin–Mendi, 1997. *In vitro* multiplication of clonal apple rootstocks M.9 and M.26 and MM.106 by meristem culture. Acta Hort., 441: 325-327.
5- Bassuk, N. L., L. D. Hunter and B. H. Howard, 1981. The apparent involvement of polyphenol oxidase and phloridzin in the production of apple rooting co-factors. J. Hort. Sci., 56: 313-322.



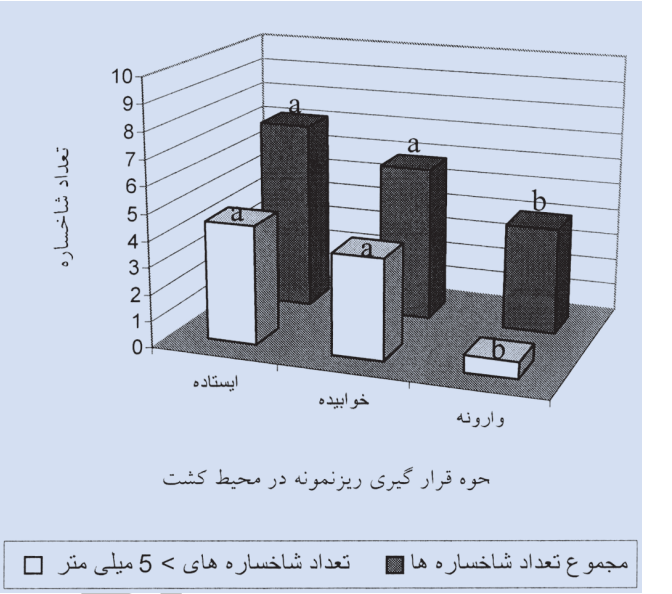
نمودار شماره ۳- تاثیر IBA بر پرآوری شاخساره های M.9



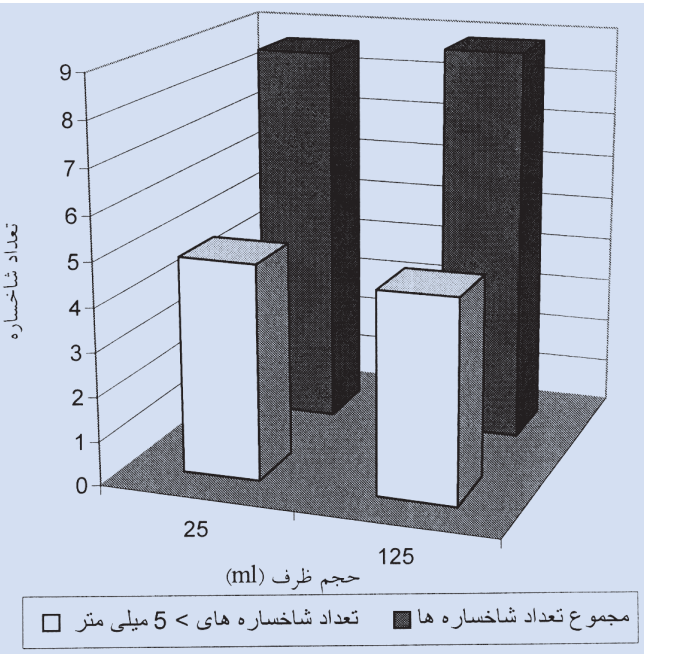
مودار شماره ۴- مقایسه میانگین تاثیر PG بر پرآوری شاخساره های M.9 (ستون های دارای حروف مشترک در سطح احتمال ۵٪ اختلاف معنی دار ندارند)

Archive of SID
www.SID.ir

vitro rooting of the apple rootstock M.9. J. Hort. Sci., 54(4): 309-311.
15- James, D. J. and I. J. Thurbon, 1981. Shoot and root initiation *in vitro* in the apple rootstock M.9 and the promotive effects of phloroglucinol. J. Hort. Sci., 56(1): 15-20.
16- Jones, O. P., 1976. Effect of phloridzin and phloroglucinol on apple shoots. Nature. 262: 392-393.
17- Kadota, M., K. Imizu and T. Hirano, 2001. Double-phase *in vitro* culture using sorbitol increases shoot proliferation and reduces hyperhidricity in Japanese pear. Sci. Hort., 89: 207-215.
18- Karhu, S. T., 1995. The quality of applied carbohydrates affects the axillary branching of apple microshoots. Bull. Rech. Agron. Gembloux. 30(1-2): 29-37.
19- Karhu, S. T., 1997. Sugar use in relation to shoot induction by sorbitol and cytokinin in apple. J. Ame. Soc. Hort. Sci., 122(4): 476-480.
20- Kataeva, N. V., I. G. Alexandrova, R. G. Butenko and E. V. Dragavtveva, 1991. Effect of applied and internal hormones on vitrification and apical necrosis of different plants cultured *in vitro*. Plant Cell Tiss. Org. Cult., 27(2): 149-154.
21- Kavanagh, K., A. P. Drew and C. Maynard, 1991. The effect of the culture vessel on micropropagation. In: Biotechnology in Agriculture and Forestry, Vol. 17. Bajaj, Y. P. S. (ed.). Springer-Verlag Berlin Heidelberg, pp: 202-211.
22- Khanna, V. K., 1999. Plant tissue culture practice. Kalyani Publ., New Delhi. 177 p.
23- Lane, W. D., 1992. Micropropagation of apple (*Malus domestica* Borkh.). In: Biotechnology in Agriculture and Forestry. Vol. 18. Bajaj, Y. P. S. (ed.). Speringer-Verlag Berlin Heidelberg. pp: 229-241.
24- Lundergan, C. A. and J. Janick, 1980. Regulation of apple shoot proliferation and growth *in vitro*. Hort. Res., 20: 19-24.
25- Marino, G., E. Magnanini, S. Battistini and B. Righetti, 1991. Effect of hormones and main carbon energy sources on *in vitro* propagation of apricot (Prunus *armeniaca* L.) cvs. 'San Castrese' and 'Portici'. Acta Hort., 293: 355-362.
26- Marino, G., G. Bertazza, E. Magnanini and A. D. Altan, 1993. Comparative effects of sorbitol and sucrose as main carbon energy sources in micropropagation of apricot. Plant Cell Tiss. Org. Cult., 34: 235-244.
27- Marn, M., 1988. Effect of phytohormones on *in vitro* multiplication and shoot lengthening in



نمودار شماره ۵- مقایسه میانگین نحوه قرار گیری ریزنمونه در محیط کشت بر پرآوری شاخساره های M.۹ (ستون های با رنگ مشابه دارای حروف مشترک در سطح احتمال ۵٪ اختلاف معنی دار ندارند)



نمودار شماره ۶- تاثیر حجم ظروف کشت بر پرآوری شاخساره های M.۹

Archive of SID
www.SID.ir

Heidelberg. pp: 183-198.
34- Turovstaye, N. I., 1994. *In vitro* micropropagation of apple and pear. Sadovodstvo i Vinorgradarstvo. 1: 10-12.
35- Webster, C. A. and O. P. Jones, 1989. Micropropagation of the apple rootstock M.9: effect of sustained subculture on apparent rejuvenation *in vitro*. J. Hort. Sci., 64(4): 421-428.
36- Webster, C. A. and O. P. Jones, 1991. Micropropagation of some cold-hardy dwarfing rootstocks for apple. J. Hort. Sci., 66(1): 1-6.
37- Welander, M., N. T. Welander and A. S. Brackman, 1989. Regulaton of *in vitro* shoot multiplication in *Syringa, Alnus* and *Malus* by different carbon source. J. Hort. Sci., 64(3): 361-366.
38- Yae, B. W., R. H. Zimmerman, I. Fordham and K. C. Ko, 1987. Influence of photoperiod, apical meristem, and explant orientation on axillary shoot proliferation of apple cultivars *in vitro*. J. Ame. Soc. Hort. Sci., 112(3): 588-592.
39- Zimmerman, R. H. and I. Fordham, 1989. Explant orientation affects axillary shoot proliferation of apple cultivars *in vitro*. Hort Sci., 24(2): 351-352.
the apple varieties Majda and Golden Delicious. Jugoslovensko Vocarstvo. 22(4): 417-422.
28- Monette, P. L., 1983. Influence of culture vessel on *in vitro* proliferation of grape in liquid medium. Plant Cell Tiss. Org. Cult., 2: 327-332.
29- Murashige, T. and F. Skoog, 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco cultures. Physiol. Plant., 15: 473-497.
30- Seingre, D., J. O'Rourke, S. Gavillet and C. Moncousin, 1991a. Influence of gelling agent and carbon source on the *in vitro* proliferation rate of apple rootstock EM.IX. Acta Hort., 289: 151-155.
31- Seingre, D., J. O'Rourke, S. Gavillet and C. Moncousin, 1991b. Influence of carbon source and type of vessel on the in vitro proliferation of the apple rootstock EM.IX. Acta Hort., 289: 157-159.
32- Sharma, M., M. Modgil and D. R. Sahrma, 2000. Successful propagation *in vitro* of apple rootstock MM.106 and influence of phloroglucinol. Ind. J. Exp. Bio., 38(12): 1236-1240.
33- Skirvin, R. M., M. Kouider, H. Joung and S. S. Korban, 1986. Apple (*Malus domestica* Borkh.). In: Biotechnology in Agriculture and Forestry, Vol. 1. Bajaj, Y. P. S. (ed.). Springer-Verlag Berlin

Archive of SID

www.SID.ir