بررسی اثر سن و ژنوتیپ بر نحوه تکثیرگیلاس وحشی(*Prunus avium*) از طریق کشت درون شیشه‌ای

• معصومه ایزدپناه، عضو هیأت علمی‌موسسه تحقیقات جنگلها و مراتع

تاریخ دریافت : شهریور ماه ۱۳۸۲ تاریخ پذیرش: اسفندماه ۱۳۸۲

چکیده

از آنجا که ژنوتیپهای مختلف گیاهان چوبی در کشت درون شیشه‌ای تفاوتهای عمده‌ای نشان می‌دهند و همچنین سن و مرحله رویشی گیاه بر قدرت تکثیر این گیاهان تاثیر به‌سزایی دارد، برای بررسی این تفاوتها و یافتن روشی که مناسب تکثیر ژنوتیپ‌های مختلف گیلاس وحشی باشد پژوهش حاضر انجام شد. عوامل موثر بر شاخه‌زایی، طویل شدن شاخه، شیشه‌ای شدن و ریشه زایی چهار ژنوتیپ بالغ گیلاس وحشی (*Prunus avium*) مورد بررسی قرار گرفت. سن درختان انتخاب شده به ترتیب ۴۵، ۱۰۰، ۱۰۰ و بیش از ۱۵۰ سال بود و همگی بالغ بودند. جوانه های جانبی و انتهایی پایه های مختلف در زمستان تهیه شد و در محیط DKW حاوی غلظتهای مختلف BA و IBA کشت گردید. بین ژنوتیپ‌های مختلف از نظر شاخه زایی و ریشه‌زایی تفاوتهای مشخصی وجود داشت اما سن گیاهان در تغییر شاخصهای رشد موثر نبود. بهترین غلظت هورمون BA برای شاخه زایی ۱ تا ۲ میلی گرم در لیتر بود. ژنوتیپ ۴ (مسن ترین درخت) بالاترین قدرت تکثیر را نشان داد. برای طویل شدن شاخه‌ها استفاده از غلظتهای پایین BA یا محیط کشت بدون هورمون مناسب بود. درصد ریشه‌زایی ژنوتیپ‌های مختلف متفاوت بود. ژنوتیپ ۳ با سن تقریبی ۱۰۰ سال بیشترین درصد ریشه‌زایی را نشان داد . در بررسی درصد شیشه‌ای شدن نمونه ها جوانه‌های دو ژنوتیپ ۳ و ۴ بر روی سه محیط WPM ، MS و DKW کشت گردید. ژنوتیپ ۴ تقریباً در همه موارد میزان شیشه‌ای شدن کمتری را نشان داد و در محیط کشت DKW کمترین میزان شیشه‌ای شدن مشاهده شد.

کلمات کلیدی :ریز ازدیادی، کشت درون شیشه ای، کشت بافت، گیلاس وحشی، درختان بالغ، ژنوتیپ، سن.

Pajouhesh & Sazandegi No:64 pp: 63-70

In vitro Propagation of mulbery (Morus alba) Through nodal Segments.

By: M. Izadpanah.,Research Institute of Forests and Rangelands.Tehran.

The effects of age and growth phase on micropropagation of *Prunus avium* was investigated. Axillary and apical buds of 4 genotypes of *Prunus avium* collected in winter from north forests of Iran and cultured on DKW medium supplemented with different concentrations of BA and IBA. All of the trees were in adult phase at approximate ages of 45, 100, 100 and 150 years. Shoot proliferation and elongation, vitrification and rooting were investigated.Genotype of the trees strongly influenced shooting and rooting ability and vitrification of the explants, while age of the plants

Archive of SID
Pajouhesh & Sazandegi
www.SID.ir

did not play an important role. The best hormone concentration for shooting was 1 to 2 mg/L BA. The oldest tree showed the highest multiplication rate. Lower concentrations of BA were more suitable for shoot elongation. Genotype 3 (100-year-old tree) showed the highest rooting percentage. Genotype 4 showed the lowest percentage of vitrification and the lowest number of vitrified shoot was observed on DKW medium.Although there are significant differences between different genotypes but it seems that this propagation method can be used for all different genotypes of adult and juvenile *Prunus avium* plants.

Key words: Micropropagation, In vitro,*Prunus avium*,Adult tree,Genotype,Age,Tissue culture

مقدمه

تکثیر انبوه ژنوتیپهای برتر درختان مورد توجه دست اندرکاران احیاء و توسعه جنگلها قرار دارد. ولی تکثیر غیر جنسی این درختان به دلیل سن زیاد آنها با مشکلات عدیده‌ای روبروست. در همین رابطه امکان تکثیر گیلاس وحشی (*Prunus avium*) از طریق کشت بافت مورد بررسی قرار گرفته و دستور العمل کلی آن توسط نگارنده همین مقاله به چاپ رسیده است(۲). از آنجا که در ژنوتیپ‌های مختلف گیاهان چوبی تفاوتهای کاملاً آشکاری در شرایط درون شیشه‌ای گزارش شده و با توجه به اینکه گیلاس‌های وحشی ایران از نظر ژنتیکی تنوع زیادی دارند(۳)، تکثیر ژنو تیپ‌های مختلف این گیاه مورد بررسی قرار گرفت تا مشخص گردد که آیا روش بدست آمده قابل استفاده برای کلیه ژنوتیپ های آن می‌باشد یا اینکه برای تکمیل آن باید نکات جدیدی مد نظر قرار گیرد. قبل از این برای یافتن عوامل موثر در تکثیر این گیاه، محققین آزمایشات مختلفی بر روی گیلاس وحشی و خوراکی انجام داده‌اند، البته بیشتر این آزمایشات بر روی گیلاس‌های خوراکی و گیاهان جوان رشد یافته در شرایط کنترل شده(گلخانه‌ای) انجام شده است. این آزمایشات بر روی ژنوتیپهای گیلاس وحشی موجود در ایران و گیاهان بالغ رشد یافته در شرایط طبیعی صورت گرفته است. از میان آزمایشاتی که تا کنون انجام شده می‌توان به این موارد اشاره کرد : Sauer در ۱۹۸۳ (۲۲)شانزده ژنوتیپ مختلف این گیاه را بررسی کرد و تفاوتهای عمده ای را بین ژنوتیپهای مختلف آن گزارش کرد،Quirin و Lepovier در ۱۹۷۷ (۲۱) برای یافتن ترکیب مناسب محیط کشت آزمایشاتی انجام دادند و مقدار Cu مناسب در محیط کشت را بررسی کردند ، Shuller در۱۹۷۷ (۲۴) عوامل موثر در کاهش شیشه ای[1] شدن را مورد توجه قرار داد، ریشه زایی گیاه و اثر هورمونهای مختلف بر آن توسط Punchia در۱۹۹۲(۲۰) ، Corno و Chaix در۱۹۸۱(۸) و Chuojka و همکاران در ۱۹۸۶ (۶) بررسی شد و بالاخره شرایط انتقال به زمین و عوامل موثر بر استقرار و رشد گیاهان بدست آمده از کشت بافت را Driver و Suttle در ۱۹۷۸(۱۰) مورد توجه قرار دادند.

مواد و روشها

چهار درخت بالغ گیلاس وحشی به عنوان ژنوتیپ‌های ۱ تا ۴ از مناطق مختلف جنگلهای واز در مازندران و شفا رود در گیلان انتخاب شدند . سن تقریبی این درختان به ترتیب ۴۵، ۱۰۰، ۱۰۰ و ۱۵۰ ساله بود(عکس ۱) . جوانه‌های انتهایی و جانبی در فصل زمستان برای آزمایش برداشت شده و بعد از ضد عفونی کردن با محلول ۱/۵ در صد هیپوکلریت سدیم به مدت ۲۰ دقیقه(۲) بر روی محیط(۹) DKW کشت شد. pH محیط قبل از اتو

عکس ۱: درخت گیلاس وحشی انتخاب شده به عنوان ژنوتیپ ۱

www.SID.ir

کلاو روی ۵/۶ تنظیم شد، شکر به میزان ۳۰ گرم در لیتر و آگار به مقدار ۷ گرم در لیتر اضافه گردید. فاصله بین دو بازکشت ۴ هفته بود. ظروف حاوی نمونه‌های کشت شده در درجه حرارت ۳± ۲۵ درجه سانتی‌گراد و طول روز ۱۶ ساعت نگه‌داری شدند.

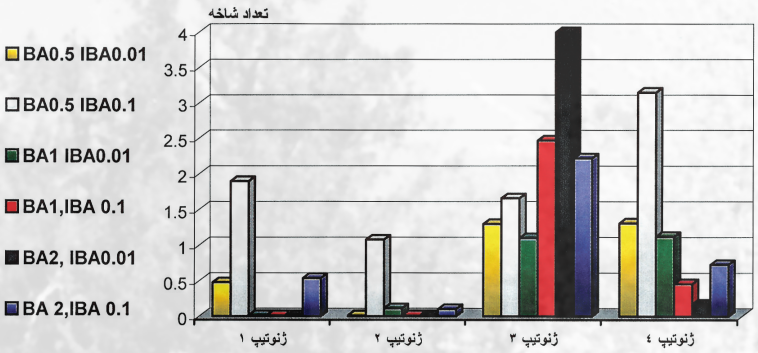
برای شاخه‌زایی از هورمون BA بین ۰/۱ تا ۲ میلی‌گرم در لیتر و IBA به مقدار ۰/۱ و ۰/۰۱ میلی‌گرم در لیتر استفاده شد. شاخه‌های بوجود آمده برای ریشه زایی بر روی محیط کشت DKW کامل یا محیط DKW حاوی نصف مقدار نمک‌های تو صیه شده کشت شدند. همچنین غلظتهای مختلف هورمونهای IBA، NAA یا تلفیق هر دو مورد بررسی قرار گرفت. از آنجا که تعدادی از شاخه‌ها شیشه‌ای می‌شدند و این پدیده منجر به کاهش توان تکثیر و تولید شاخه‌های نرمال می‌شد، برای بررسی عوامل شیمیایی موثر بر شیشه ای شدن جوانه‌های دو ژنوتیپ ۳ و ۴ در سه محیط (۱۶) WPM، (۱۷) MS و DKW(۹)کشت شد.

آزمایشات مربوط به شاخه‌زایی در قالب طرح بلوکهای کاملاً تصادفی با شش تکرار انجام شد که در هر تکرار ۳۰ شاخه مورد بررسی قرار گرفت. نتایج از طریق آزمایش فاکتوریل (غلظت هورمون IBA به عنوان فاکتور A ، غلظت هورمون BA به عنوان فاکتور B و ژنوتیپ به عنوان فاکتور C) تجزیه و تحلیل شد. از آنجا که در زمان یادداشت برداری تعدادی از جوانه‌های تولید شده در اثر طویل شدن به صورت شاخه در می‌آمدند و تعدادی به صورت جوانه باقی می‌ماندند و از آنجا که شاخه‌هایی که بوجود می‌آمدند توانایی ریشه زایی و تبدیل به گیاه کامل را داشته ولی جوانه‌ها می‌بایست بعد از طی مراحلی وادار به رشد طولی شوند،تعداد شاخه به طور مجزا مورد بررسی قرار گرفت و مجموع شاخه‌ها و جوانه‌ها به عنوان شاخص تکثیر نمونه‌ها بررسی شد، علاوه بر این به دلیل آنکه طول شاخه‌ها باید به اندازه خاصی می‌رسید تا توانایی ریشه زایی می‌یافتند، طول شاخه‌ها نیز مورد بررسی آماری قرار گرفت. بررسی‌های مربوط به ریشه‌زایی و شیشه‌ای شدن با تعیین درصد شاخه‌های ریشه‌دار شده یا شیشه ای شده انجام شد. گیاهچه‌های کامل بعد از انتقال به گلدان و طی مراحل سازگاری که چهار هفته طول می‌کشید ابتدا به گلخانه و سپس به مزرعه انتقال یافتند.

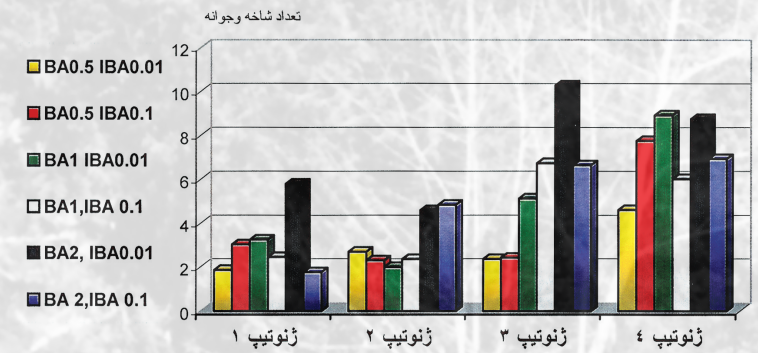
نتایج

شاخه‌زایی و جوانه‌زایی

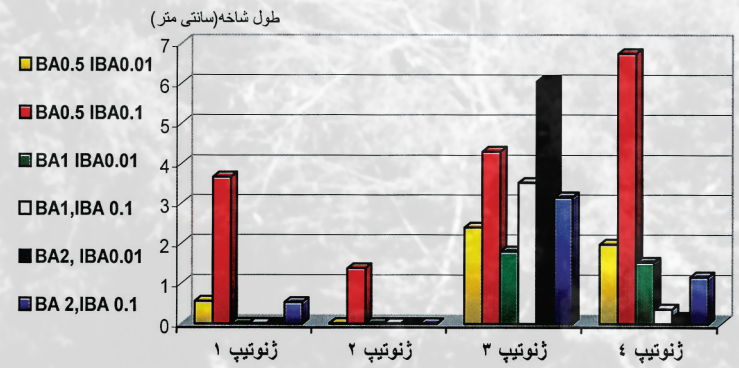
همانطور که از مقایسه دو نمودار ۱ و ۲ پیداست ،تکثیر در اکثر موارد به صورت جوانه‌زایی صورت گرفته، به‌ویژه در ژنوتیپهای ۱و۲ تعداد شاخه های به‌وجود آمده در بعضی تیمارها حتی به صفر می‌رسید(عکس ۲) اما در ژنوتیپهای ۳و ۴ شاخه های بیشتری مشاهده شد(عکس ۳). ژنوتیپ‌های ۳ و ۴ که به ترتیب ۱۰۰ و ۱۵۰ ساله بودند



نمودار ۱= اثر فاکتورهای مختلف بر تعداد شاخه‌های بوجود آمده در کشت درون شیشه‌ای گیلاس وحشی(*prunus avium*).



نمودار ۲= اثر فاکتورهای مختلف بر تکثیر (مجموع شاخه و جوانه) در کشت درون شیشه‌ای گیلاس وحشی (*prunus avium*).

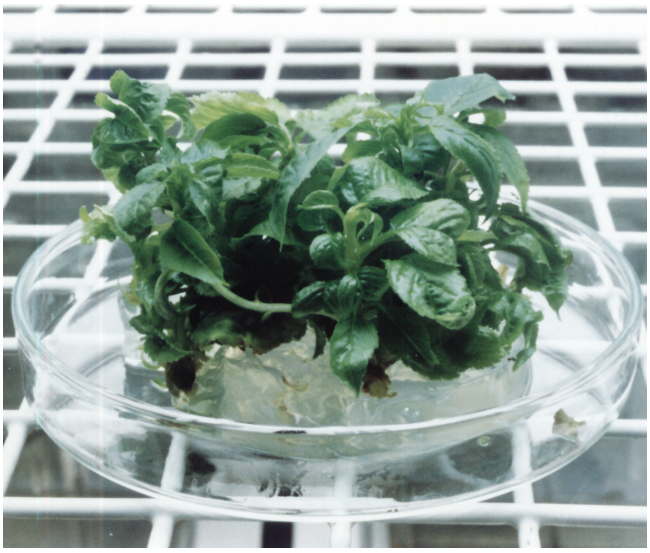


نمودار ۳= اثر فاکتورهای مختلف بر میانگین طول شاخه‌های بوجود آمده در کشت درون شیشه‌ای گیلاس وحشی (*prunus avium*).

بیشترین تکثیر (مجموع جوانه و شاخه) را نشان دادند(نمودار ۲) همین ژنوتیپ‌ها طویل ترین شاخه‌ها را به‌وجود آوردند (نمودار ۳). با افزایش BA از میزان شاخه‌های بوجود آمده در کلیه ژنوتیپ‌ها به‌جز ژنوتیپ ۳ کاسته شد(نمودار ۱) اما به علت جوانه‌زایی بیشتر، تکثیر در مجموع افزایش یافت(نمودار ۲). در حضور IBA بیشتر و BA کمتر در اکثر ژنوتیپ‌ها

www.SID.ir

عکس ۲: تولید جوانه و عدم تولید شاخه ژنوتیپ۲ گیلاس وحشی
در محیط DKW حاوی ۱ میلیگرم در لیتر BA و ۰/۰۱ میلیگرم در لیترIBA



عکس ۳ : رشد طولی جوانه‌ها و تولید شاخه ژنوتیپ ۳ گیلاس وحشی
در محیط DKW حاوی ۱ میلیگرم در لیتر BA و ۰/۰۱ میلیگرم در لیترIBA

شـاخه های طویل‌تری به‌وجـود آمدند(نمودار ۳). به‌طور کلـی ژنوتیپ ۳ بالاترین شـاخه‌زایی و طول شاخه و ژنوتیپ ۴ بیشترین تکثیر را نشان داد. ژنوتیپ‌هـای ۱ و ۲ در همه موارد مانند هم عمل کردند(جدول ۱). جداول آنالیـز و واریانس(جداول ۲، ۳،۴) نیز نشـان می‌دهند که در همه موارد اثر ژنوتیـپ و هورمون BA معنی دار بوده ولـی IBA در مجموع بر تکثیر اثر معنی‌داری نداشـته اگر چه که در شـاخه‌زایی و طویل شدن شاخه‌ها موثر بوده است.

ریشه زایی

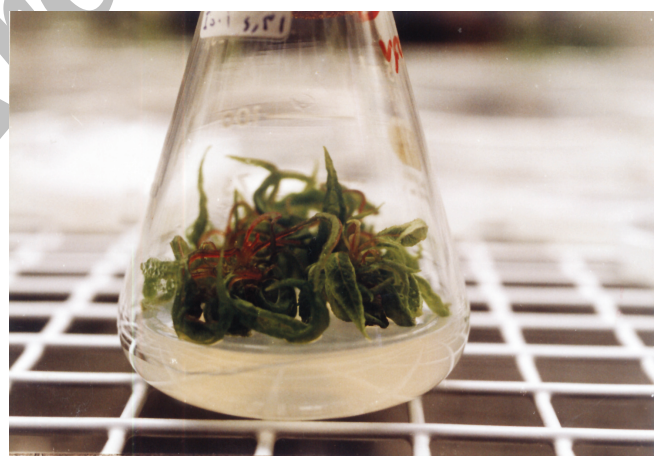
بین ژنوتیپ های مختلف از نظر ریشـه زایی نیز تفاوت محسوسـی وجود داشـت. ژنوتیپ ۲ کمترین میزان ریشـه زایی و ۳ بالاترین ریشـه زایی را نشـان داد (جدول ۵). IBA به تنهایی کمترین درصد ریشـه‌زایی را باعث شـد و اسـتفاده از NAA به تنهایی یاهمراه‌باIBAبـه‌طـور تـوأم، دراکثـرمـوارد،باعـث‌افزایـش چشمگیر ریشـه‌زایی شـد(جدول ۵) اما ریشـه‌های بدسـت آمده در حضـورIBAدرهمـه‌ژنوتیپ‌هـا طبیعی تر از ریشـه‌های به‌وجود آمـده در حضور NAAبودنـد. در محیط DKW حاوی نصف مقـدار نمکهـای پر مصرف نیز ژنوتیـپ ۳ بالاترین مقدار ریشه‌زایی را نشـان داد (جدول ۶). به‌طور کلی تقلیـل مقـدارنمـک‌موجـوددرمحیـط دراکثـرمـواردباعـث‌افزایـش ریشـه‌زایی‌شـد(جدول۶).

شیشه‌ای شدن

پدیده شیشـه‌ای شدن در محیط های کشـت MS و WPM شایع تر از DKW بـود و ژنوتیـپ ۴ تقریباً همیشـه کمتر از ژنوتیپ ۳ شیشـه‌ای می‌شـد(جدول ۷) . شـاخ و برگها در نمونه های شیشـه‌ای شده شکننده، آبـدار، متـورم و قرمز رنگ بود(عکـس۴). در غلظتهای بالاتـر هورمونهای شـاخه‌زا (BA) و تراکم بیش از حد شـاخ و برگ این پدیده بیشـتر دیده می‌شـد. در حالیکه در دو محیط MS و WPM نمونه ها حتماً باید بعد از ۴ هفته باز کشـت می‌شدند و طولانی شدن فاصله باز کشتها باعث افزایش چشمگیر این پدیده می‌شد، در محیط DKW حتی بعد از گذشت ۶ هفته نمونه‌ها کاملاً سالم و طبیعی بودند.

بحث

بـا وجودی‌کـه بیـن ژنوتپ ۱ کـه جوانترین ژنوتیپ اسـت (۴۵ سـاله) و ژنوتیـپ ۴ (۱۵۰ سـاله) تفـاوت زیادی از نظر سـن درخت وجود داشـت ولی ژنوتیـپ جوانتر توانایی تکثیر بیشـتری نسـبت به بقیـه نداشـت و بر خـلاف انتظار پیرتریـن ژنوتیپ بالاتریـن تکثیر را نشـان داد، بنابر این این سـن و سال گیاه نیسـت که تعیین کننده قدرت تکثیر اسـت بلکه فاز رویشی گیـا ه عامـل اصلی اسـت چون به طور معمـول تغییر در قدرت تکثیر گیاه به محض ورود به فاز زایشـی



عکس ۴: نمونه‌های شیشه‌ای شده گیلاس وحشی
در محیط MSحاوی ۱ میلیگرم در لیتر BA و ۰/۰۱ میلیگرم در لیترIBA

Archive of SID
www.SID.ir

جدول ۱: بررسی آماری اختلاف ژنوتیپ‌های مختلف گیلاس وحشی (*Prunus avium*) در شاخص‌های رشد در کشت درون شیشه‌ای

ژنوتیپ	تکثیر(تعداد جوانه و شاخه) LSD=۰/۲۳۸۵	شاخه زایی(تعداد) LSD=۰/۱۴۳۱	میانگین طول شاخه LSD=۰/۲۲۱۵
۱	۲/۰۳c	۰/۹۵c	۱/۰۳۶c
۲	۱/۸۸c	۰/۸۲c	۰/۸۴c
۳	۲/۳۹b	۱/۶۱a	۱/۹۸c
۴	۲/۷۵b	۱/۲۴b	۱/۴۵b

-اعدادجدول میانگین داده های بدست آمده در غلظتهای مختلف هورمونهای BA و IBA برای هر ژنوتیپ است

جدول ۲: جدول آنالیز و واریانس اثر غلظتهای مختلف هورمونهای BA و IBA بر تکثیر (مجموع شاخه‌زایی و جوانه‌زایی) چهار ژنوتیپ گیلاس وحشی (*Prunus avium*)

منابع تغییرات	درجه آزادی	مجموع مربعات	میانگین مربعات	f
تکرار	۵	۲/۵۲۹	۰/۵۰۶	۲/۳۴۴^{ns}
فاکتور A(غلظت IBA)	۱	۰/۰۱۹	۰/۰۱۹	۰/۰۸۶۳^{ns}
فاکتور B(غلظت BA)	۲	۱۳/۷۱	۶/۰۱۵۵	۳۱/۷۷۷۹**
AB	۲	۱/۰۷۳	۰/۵۳۷	۲/۴۸۷۵**
فاکتور C(ژنوتیپ)	۳	۱۶/۲۳۹	۵/۴۱۳	۲۵/۰۹۳۳**
AC	۳	۰/۱۶۴	۰/۰۵۵	۰/۲۵۳۹^{ns}
BC	۶	۴/۷۶۱	۰/۷۹۴	۳/۶۷۸۸**
ABC	۶	۳/۰۹۴	۰/۵۱۶	۲/۳۹۰۷*
خطا	۱۱۵	۲۴/۸۰۷	۰/۲۱۶	
مجموع	۱۴۳	۶۶/۳۹۷		

جدول ۳: جدول آنالیز و واریانس اثر غلظتهای مختلف هورمونهای BA و IBA بر شاخه زایی چهار ژنوتیپ گیلاس وحشی (*Prunus avium*)

منابع تغییرات	درجه آزادی	مجموع مربعات	میانگین مربعات	f
تکرار	۵	۰/۰۵۵	۰/۰۱۱	۰/۱۱۷^{ns}
فاکتور A(غلظت IBA)	۱	۱/۰۱۷	۱/۰۱۷	۱۰/۸۶۲۸**
فاکتور B(غلظت BA)	۲	۲/۳۰۶	۱/۱۵۳	۱۲/۳۲۲۶**
AB	۲	۱/۴۲۴	۰/۷۱۲	۷/۶۰۸**
فاکتور C(ژنوتیپ)	۳	۱۳/۳۳۴	۴/۴۴۵	۴۷/۴۹۴۷**
AC	۳	۰/۳۶۴	۰/۱۲۱	۱/۲۹۵۸^{ns}
BC	۶	۴/۹۱۶	۰/۸۱۹	۸/۷۵۵۶**
ABC	۶	۲/۳۵۳	۰/۳۹۲	۴/۱۹۰۱**
خطا	۱۱۵	۱۰/۷۶۲	۰/۰۹۴	
مجموع	۱۴۳	۳۶/۵۳۱		

www.SID.ir

اتفـاق می‌افتـد. در گیاهان چوبی ایـن تغییر در قدرت باززایی بسـیار فاحش اسـت به‌طوری‌که در راش اروپا (*Fagus sylvatica L.*) به محض بالغ شـدن گیاه و حتی در گیاهان ۱۰ تا ۱۲ ساله قدرت تکثیر به شدت افت پیدا می‌کند و نزدیک به صفر می‌شـود (۱۹،۱۸) بنابر این می‌توان نتیجه‌گیـری کردکـه، چـون کلیه درختان گیلاس وحشـی کـه مورد آزمایش قرار گرفتند در فاز زایشـی بودند، سن گیاه عامل تعیین کننده نبوده اسـت. نتایج آزمایشـاتی که بر روی گیاه ملچ در همین آزمایشگاه انجام شـده نیزمؤید این نظریه است، در این آزمایشات گیاه ملچ جوانی کـه در فاز رویشـی بود بالاترین تکثیر را نشـان داد ولی سـن گیاه در ژنوتیپ‌هـای بالـغ تعیین کننده نبود (۱) .در همین زمینه بررسـی‌های وسـیعی توسـط محققین انجام گرفته و مشخص گردیده که در بسیاری از مـوارد بین ژنوتیپ هـای مختلف گیاهان چوبـی تفاوتهای واضحی از نظـر قدرت تکثیر وجود دارد. به‌طـور مثال(۱۱) Danstanو همکاران و همچنین Bonga و Pond (۵) حتی بین پروونانسـهای مختلف گیاهان چوبی نیز اختلاف در رشـد و تکثیر در کشـت بافت را گزارش کرده اند. Junker و Favre (۱۴) در بلـوط، Sharman و Thorp (۲۳) در گیاه تـوت (*Morus alba*) و Coleman و Ernst(۷) در مورد صنوبر تفاوت درژنوتیپ‌هـا را گـزارش کرده‌انـد.

تفاوت ژنوتیپها در ریشه‌زایی

درختان مختلف ریشـه‌زایی متفاوتی نشـان دادند همین امر در مورد گیاهان چوبی دیگری از جمله نوعی کاج نیز اثبات شده (۱۳). در ریشه‌زایی نیز سن گیاهان عامل اصلی تفاوتها نبود و دو ژنوتیپ ۲ و ۳ که هر دو حدود ۱۰۰ سـال سن داشتند یکی بیشـترین و یکی کمترین ریشه‌زایی را نشان داد. از آنجا که کلیه درختان مورد بررسـی در فاز رویشی بودند ومحرکهای ریشـه زایی به طور معمول بعد از ورود گیاه به فاز زایشـی تقلیل می‌یابند (۲۶،۱۲،۴) در اینجا نیز ژنوتیپ عامل تعیین کننده برتری بود. این موضوع در مورد درختان دیگری نیز اثبات شده از جمله ملچ (*Ulmus glabra*) (۳) .در آزمایشـات حاضر هورمون NAA به تنهایی یا تلفیق آن با IBA ریشه زایی بیشتری را باعث شد. آزمایشات انجام شده توسط Yang و Schmidt (۲۷) بـر روی چند رقم گیلاس نیز برتری NAA را بر IBA و IAa اثبات کـرده و همچنیـن Punchia بر روی گونه دیگـری از همین جنس برتری NAA را گـزارش کرده.طبیعی تر بودن ریشـه‌های بوجود آمده در حضور

جدول ۴: جدول آنالیز و واریانس اثر غلظتهای مختلف هورمونهای BA و IBA بر طول شاخه های بوجود آمده در چهار ژنوتیپ گیلاس وحشی (*Prunus avium*)

منابع تغییرات	درجه آزادی	مجموع مربعات	میانگین مربعات	f
تکرار	۵	۰/۱۹۴	۰/۰۳۹	۰/۱۷۲۹ns
فاکتور A(غلظت IBA)	۱	۲/۷۹۳	۲/۷۹۳	۱۲/۴۲۸۹**
فاکتور B(غلظت BA)	۲	۸/۳۶۱	۴/۱۸۱	۱۸/۶۰۳**
AB	۲	۵/۰۷۴	۲/۵۲۷	۱۱/۲۸۸۵**
فاکتور C(ژنوتیپ)	۳	۲۷/۵۲۶	۹/۱۷۵	۴۰/۸۲۷۶**
AC	۳	۰/۵۶۷	۰/۱۸۹	۰/۸۴۱۴ns
BC	۶	۶/۴۶۴	۱/۰۷۷	۴/۷۹۳۹ns
ABC	۶	۳/۷۸۸	۰/۶۳۱	۲/۸۰۹۱*
خطا	۱۱۵	۲۵/۸۴۴	۰/۲۲۵	
مجموع	۱۴۳	۸۰/۶۱۲		

جدول ۵ : اثر غلظتهای مختلف هورمونها بر ریشه دار شدن شاخه های بوجود آمده از کشت بافت ۴ ژنوتیپ مختلف در محیط کشتDKW

	ژنوتیپ ۱		ژنوتیپ ۲		ژنوتیپ ۳		ژنوتیپ ۴	
غلظت هورمونی mg/l	تعداد شاخساره ها	درصد ریشه دار	تعداد شاخساره‌ها	درصد ریشه‌دار	تعداد شاخساره‌ها	درصد ریشه‌دار	تعداد شاخساره‌ها	درصد ریشه‌دار
IBA = ۰/۵	۲۹	۲۴	۲۹	۰	--	---	۲۱	.
NAA = ۰/۵ IBA = ۰/۲	۳۰	۵۳/۳	۳۱	۹/۶۷	---	---	۱۲	۵۸/۳
NAA = ۱	۲۰	۶۵	۳۶	۵/۸	۲۶	۹۶/۵	۳۳	۳۶/۲
NAA = ۲	۲۱	۸۱	۲۶	۱۱/۵	۲۶	۸۱/۸	۲۱	۴۲/۸

Archive of SID
www.SID.ir

جدول ۶: اثر کاهش نمک‌های پر مصرف بر ریشه زایی ژنوتیپ‌های مختلف گیلاس وحشی(*Prunus avium*) در محیط‌های حاوی ۱ میلیگرم در لیتر NAa پس از چهار هفته.
× در محیط DKW/۲مقدار نمک‌های پر مصرف به نصف تقلیل یافته است.

ژنوتیپ	تعداد شاخساره ها	محیط کشت DKW		تعداد شاخساره ها	محیط کشت *DKW/2	
		درصد ریشه دار	تعدادریشه		درصد ریشه دار	تعدادریشه
۱	۳۳	۴۶/۴	۴/۴۶	۱۸	۳۰	۸/۶
۲	۲۷	۳۰	۲	۴۵	۴۱/۶	۲/۶
۳	۴۴	۸۵	---	۴۳	۱۰۰	---
۴	۵	۳۵	۸/۲	۳۰	۴۶	۸

جدول ۷: اثر محیط کشت‌های مختلف بر درصد شیشه ای شد شاخه‌های بدست آمده از کشت درون شیشه‌ای در دو ژنوتیپ گیلاس وحشی (*Prunus avium*)

محیط کشت	ژنوتیپ	غلظت BA (میلیکرم در لیتر)		
		BA=۰/۲	BA=۰/۵	BA=۱
MS	۳	۳۲/۷۵	۲۵/۵۷	۳۲/۹
MS	۴	۶/۵۵	۵/۵	۱۸/۵
WPM	۳	۱۸/۸۵	۱۸/۵	۱۹/۶۵
WPM	۴	۱۰/۹	۹/۳	۲۹/۲۵
DKW	۳	--	۴/۹	۰
DKW	۴	۵/۵	۳/۷	۰

IBA را Vieitez و همکاران (۲۵) در مورد شاه بلوط عنوان کرده‌اند.

تاثیر محیط کشت بر شیشه‌ای شدن

در بررسی رابطه بین محیط کشت و شیشه ای شدن ژنوتیپ‌های مختلف نمونه‌های کشت شده در محیط DKW کمترین درصد شیشه‌ای شدن را نشان داد. با توجه به گزارشهایی که توسط محققین مختلف اعلام شده علت این موضوع ترکیب نمکهای موجود در محیط کشتهای مختلف است . Leteuzer و Duguin (۱۵)گزارش کرده اند که بالا بودن مقدار یون آمونیم (NH_4) نسبت به یون نیترات(NO_3) باعث افزایش شیشه ای شدن نمونه های گیلاس وحشی گردیده و همچنین در آزمایشاتی که توسط Shuler (۲۴) انجام شده کاهش میزان NH_4 سبب کاهش شیشه‌ای شدن شاخه‌ها شده است. از آنجا که مقدار یون NH_4 و نسبت آن به یون NO_3 در محیط DKW کمتر از سایر محیطهای دیگر است می‌توان نتیجه گرفت که بهترین دلیل برای کاهش شیشه ای شدن نمونه ها در این محیط همین موضوع است.

پیشنهادات

از آنجا که نتایج نشان می‌دهد دستورالعمل بدست آمده برای تکثیر از طریق کشت بافت برای کلیه پایه‌ها در هر سن و سال و با هر ژنوتیپی که باشند قابل اجراست ،پیشنهاد می‌شود در بررسی‌های بعدی گیاهان بدست آمده از کشت بافت پایه های برگزیده در چند ایستگاه در استانهای مختلف کشت شده و رشد و نمو آن مورد بررسی قرار گیرد. نهایتاً در صورت لزوم می‌توان از همین پایه‌ها که با شرایط طبیعی خو گرفته‌اند دوباره نمونه برداری کرده و اقدام به تکثیر نمود.

تشکر و قدردانی

بدینوسیله از همکاری و همراهی بی‌دریغ همکارانم خانمها مهندس سهیلا نراقی، مهندس میترا امام، مهندس شکوفه شهرزاد و جناب آقای مهندس محسن نصیری صمیمانه تشکر می‌کنم. همچنین از جناب آقای مهندس بابا خان جانی شیراز از ایستگاه پیلمبرا در استان گیلان که با کمک در شناسایی محل درختان و تهیه نمونه انجام این طرح را ممکن نمودند قدردانی می‌نمایم.

پاورقی‌ها

1-Vitrification

Archive of SID
www.SID.ir

منابع مورد استفاده

۱-ایزدپناه، معصومه،۱۳،۲. تکثیر ملچ (*Ulmus glabra*) از طریق کشت درون شیشه ای پژوهش و سازندگی، شماره۵۸ بهار ص ۷۴-۶۵.

۲- ایزدپناه، معصومه ،۱۳۸۰. ازدیاد گیلاس وحشی *Prunus avium* از طریق کشت درون شیشه‌ای. مجله پژوهش و سازندگی، شماره ۵۲ پاییز ۸۰ ص ۸۰-۶۸ .

۳- علی احمد کروری، سودابه، آزادفرد، داوود، ایرانمنش، یعقوب، ۱۳۸۱. استفاده از الگوهای پراکسیداز جهت تفکیک اکوتیپها و فنوتیپهای گونه‌های گیلاس وحشی و بارانک در رویشگاههای طبیعی خزر. خلاصه مقالات اولین کنفرانس علوم و تنوع زیستی گیاهی ایران تهران. ص ۱۲۴.

4-Sauer, A.,1983. In –vitro propagation of different genotupes of *Prunus avium* L. Garten Bauwissen Shaft 48(3): 124-127

5-Quoirin, M. and Lepoivre, P. H., 1977. Improved medium for in-vitro culture of Prunus sp. Acta. Hortic. 78: 437-442.

6-Shuller, M.I., 1982. In Vitro propagation of sweet cherry cultivar. Hort. Sci. 17: 192-193.

7-Punchia, G., 1992. Research on in vitro propagation of *Prunus laurocerasus* cv. Otto Luyken. Acta Hortic., 300:177-186.

8-Corno, C. and Chix, C.,1981. Multiplication pa culture in vitro de nierisiers adultes Prunus avium aplication a un large eventent de clones, In Proc. Iufro Sect. S2 ol5. Int workshope in-vitro cultivation for tree species, Fantaine bleau France. pp 71-79

9-Chuojka, I., Volfova, A., Revenska, V., Roslova, J. and Varova, M., 1986. Effect of phenyl acetic acid on root initiation in cherry (*Prunus avium L.*) cultivars. Colt. Explants Sboinik Urtiz, Zahrad Necti, 13(4):252-260.

10-Driver, J.A. and Suttle, G. R., 1978. Nursery handling propagules. In: Bonga, J. M., Durzan, J. (eds) Cell and Tissue Culture in Forestry Vol. 2 Specific principles and methods: Growth and development. Martinus Nijoff publishers pp 320-331.

11-Driver, J. A. and Kunyoki H., 1984. In vitro propagation of paradox walnut root stocks (*J. hindsii* x J. *rejea*), Hort Science 19:507-509.

12-Murashige T. and Skoog F., 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture, physiol. plant,15: 437-497.

13-Lloyd G. B. and Mc Cown B.H., 1980. Commercially feasible micropropagation of mountain lourel (Kalmia latifolia) by use of shoot tip culture, Proc. Inter. Plant Propotor, Soc. 30:421-437.

14-Nadel, B.L., Altman, A., Pleban, S. and Huttermann, A., 1991. In-vitro development of mature Fagus Sylvatica L. buds I. The effect of medium and growth regulators on bud growth and protein profiles. J. Plant. Physiol. 138:569-601.

15-Nadel, B.L., Altman, A., Pleban, S., kocks, R.and Huttermann, A., 1991. In vitro development of mature Fagus Sylvatica L. Π. Seasonal changes in the response to plant growth regulators, J. Plant. Physiol. 138: 136-114.

16-Dunstan, D. I., Bettune. T., Kikao, S. and Lapp, M. S., 1989. In -vitro shoot formation among 17- year old douglas fir provenances, can. J. for Res. 19:1299-1302.

17-Bonga J. M. and Pond, S. E., 1991. Adventitious shoot formation in cultures of 30-year- old *Larix decidua, L. leptolepis, L. leurolepis and L. laricina* trees, Plan Cell Tissue Org. Cult. 26:45-51.

18-Junker, B. and Favre J. M., 1989. Clonal effects in propagating oak trees via in -vitro culture, PlantCell Tissue Org. Cult. 19: 267-276.

19-Sharma, K. K. and Thorp, T., 1990. In vitro .

20-Coleman, G.D. and Ernst, S.G., 1989. In-vitro shoot regeneration of *Populus deltoides*; effect of cytokinin and genotype. Plant cell Rep. 8:459-462.

21-Horgan, K. and Holland, L., 1989 Rooting micropropagated shoots from mature radiata pine, Can. J. for Reas. 19:1309-1315.

22- Westwood, M. N. 1978. The role of growth regulators in rooting, Acta. Hort. 34: 89-92.

23-Hess, C. E., 1961. The physiologu of root initiation in easy and difficult- to- root cuttings. The Hormolog, 3: 3-6.

24-Ali, C. N. and Westwood, M. N., 1968. Juvenility as related to chemical content and rooting of stem cuttings of Pyrus species. Proc. Am. Sos. Hort. Sci. 93: 78-82.

25-Yang, H. Y. and Schmidit, H., 1994. Influence of different auxin on in -vitro rooting of sweet cherry cultivars, Garten Bauiwessen Shaft 59(1)45-47.

26-Vieitez, A. M., Ballester, A., Vieitez, M.L., Vieitez, E., 1983. In -vitro Plantlet regeneration of mature chestnut, J. Hortic. Sci. 58: 457–463.

27-Leteuzer, R. and Daguin, F., 1983. Manifestation spotane et aleaterce d une crassance anormalea colture in-vitro recheche de marqueues, Rev. Can. Biol. Exp. 42: 23-2.

Archive of SID

www.SID.ir