Archive of SID

اثر چند نوع محیط کشت، تیمار ضد عفونی و هورمونی بر ریز ازدیادی برخی پایه‌های سیب (*Mallus domestica* Borkh.)

نجمه محمد زاده مقدم[۱]، اکبر صفی پور افشار*[۲] و فاطمه سعید نعمت پور[۲]

[۱] ایران، مشهد، مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی، خراسان رضوی

[۲] ایران، نیشابور، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد نیشابور، گروه زیست شناسی

تاریخ دریافت: ۹۶/۱۱/۱۲ تاریخ پذیرش: ۹۷/۲/۱

چکیده

ریزازدیادی سیب نقش مهمی در ایجاد گیاهان سالم، فاقد بیماری و در تکثیر سریع پایه‌های دارای صفات مناسب دارا است. در این تحقیق اثر شرایط ضدعفونی، نوع محیط کشت و تیمارهای مختلف هورمونی بر میزان آلودگی، تعداد شاخه جانبی، طول ساقه، کالوس زایی و تعداد برگ سه پایه رویشی M106، M111 و B9 با استفاده از آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار مطالعه شد. ریز نمونه‌ها پس از شستشوی سطحی با غلظت‌های مختلف کلرید جیوه و هیپوکلریت سدیم ضدعفونی شده و سپس در محیط‌های کشت MS تغییریافته، WPM و DKW کشت شدند. کمترین آلودگی با استفاده از کلرید جیوه ۰/۱ ٪ و اتانول ۷۰٪ به ترتیب به مدت ۳ دقیقه و ۳۰ ثانیه حاصل شد. در این آزمایش، محیط کشت MS تغییریافته همراه با ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر هورمون بنزیل آدنین با بیشترین رشد، استقرار موفق‌تری داشت. مقایسه میانگین‌ها نشان داد که پایه رویشی M106 از نظر کلیه صفات مورد مطالعه با سایر پایه‌های رویشی تفاوت معنی داری دارد به طوری که بالاترین طول ساقه، کالوس زایی و تعداد برگ در این پایه مشاهده شد. بیشترین شاخه زایی از تیمار هورمونی ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر IBA و ۲ میلی‌گرم در لیتر BAP حاصل شد. نتایج نشان داد که عکس‌العمل ژنوتیپ‌ها به شرایط محیط کشت متفاوت است به‌طوری‌که پایه رویشی B9 پاسخ بهتری نسبت به سایر ژنوتیپ‌ها در صفت شاخه زایی نشان داد.

واژه های کلیدی: سیب، پایه رویشی، کشت درون شیشه‌ای، استقرار و شاخه زایی

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۵۱۴۲۶۱۳۹۰۵ ، پست الکترونیکی: asafshar@iau-neyshabur.ac.ir

مقدمه

سیب از گونه‌های وحشی موجود در آسیا و اروپا بوده و قدمت کشت و پرورش آن به ماقبل تاریخ می‌رسد. از زمان تئوفراستوس دانشمند گیاه‌شناس روم قدیم (حدود ۲۲۵ سال قبل از میلاد) ارقام متعددی از سیب در روم مورد ازدیاد قرار می‌گرفته است. اولین بوته‌ها یا دانه‌های سیب به‌وسیله مهاجرین اولیه در طی قرون ۱۶ و ۱۷ میلادی به آمریکا برده شده است (۱۱). گیاه سیب متعلق به تیره گل‌سرخیان (Rosaceae) زیر تیره سیبیان (Pomoiedeae) است و با نام علمی *Malus domestica* Brokh مشهور است. درخت سیب ازجمله درختان سردسیری معتدل و برگ‌ریز یا خزان کننده است. این میوه خوش عطر و طعم حاوی مقدار زیادی پتاسیم، سدیم، کلسیم، برم، فسفر و مقادیر زیادی ویتامین آ و ب است (۲۰).

به‌طور کلی برای ازدیاد گیاهان از دو روش جنسی و غیرجنسی استفاده می‌گردد، در روش ازدیاد جنسی که معمولاً بذرهای گیاهان مورد استفاده قرار می‌گیرند، با توجه به اینکه ژنتیک گیاه در بذرهای گیاهان تأثیر می‌گذارد، درنتیجه نهال‌های حاصل از این روش با یکدیگر

www.SID.ir

Archive of SID

یکسان نبوده و تفاوت‌های بسیار زیادی را دارند که درنهایت در انجام عملیات کشاورزی به‌صورت مکانیزه مشکل ایجاد می‌کنند (۶). لذا در سال‌های اخیر کشاورزان و باغداران به استفاده از روش‌های غیرجنسی(رویشی) برای ازدیاد رو آورده‌اند. از میان روش‌های تکثیر غیرجنسی، روش کشت بافت از چند دهه است که بسیار مورد توجه قرار گرفته است زیرا که سرعت تولید و دقت در این روش بسیار بالا است. از طرف دیگر از هر گیاه مادری می‌توان اقدام به تولید صدها قلمه در کمترین فضا نمود. علاوه بر این با توجه به شناخت و معرفی محیط‌های کشت متنوع در سال‌های اخیر، پیشرفت این علم بسیار افزایش یافته و با کاربرد هورمون‌ها در محیط کشت می‌توان اهداف خاصی از قبیل ریشه‌زایی یا شاخه زایی را دنبال کرده و سرعت رشد را بالا برد تا نمونه‌ها دچار آلودگی نشوند (۱۲).

وجود اقلیم‌های مختلف و در نتیجه مناطقی با شرایط اکولوژیک متفاوت در کشور ایران، اهمیت دست‌یابی به پایه‌های مناسب برای درختان میوه و تکثیر راحت آن‌ها را متناسب با شرایط مناطق دو چندان می‌نماید. از طرفی با توجه به نقش پایه در میزان رشد رویشی، زودرسی، میزان عملکرد و مقاومت در برابر بیماری‌ها، انتخاب پایه مناسب نقش بسزایی در برنامه مدیریت باغ خواهد داشت (۱۶).

قدمت تحقیق در مورد کشت بافت سیب به اواخر دهه ۱۹۶۰ و اوایل دهه ۱۹۷۰ برمی‌گردد هنگامی‌که جوانه‌های سیب در شرایط آزمایشگاهی کشت و رشد آن‌ها گزارش گردید (۱۹-۳۱). ازآن‌پس ژنوتیپ‌های متعدد سیب در شرایط محیط کشت تکثیر و روش‌های کشت گوناگونی توسعه یافت. به‌طور مثال در مطالعه‌ای به منظور بررسی رشد موتانت‌های درختان سیب پاکوتاه در شرایط *in vitro*، مریستم سه رقم سیب مکینتاش که عادت رشدی مشابه گونه والدین پاکوتاه داشتند استفاده شد. در این مطالعه از محیط کشت موراشیگ و اسکوگ مشتمل بر غلظت‌هایی از بنزیل آدنین جهت باززایی استفاده شد. همه ارقام در یک حد مطلوبی از غلظت بنزیل آدنین یعنی ۳-۶ میکرو مول دارای حداکثر شاخه زایی و افزایش رشد طولی بودند، گر چه تحمل به غلظت بالای سیتوکنین وابسته به عادت رشد بود (۲۲). در گزارشی دیگر و در بررسی ریز ازدیادی سیب از ساقه به‌عنوان ریز نمونه استفاده شد. محیط کشت بکار رفته برای شاخه زایی در این آزمایش محیط موراشیگ و اسکوگ به همراه هورمون‌های بنزیل آمینو پورین یا تی دی آزورون با غلظت ۴/۴ میکرو مول، ۰/۵ میکرو مول ایندول بوتریک اسید، ۱/۴ میکرو مول جیبرلیک اسید، ۸۷/۶ میکرو مول ساکارز و آگار در محیط کشت بود (۲۶).

توجه به اهمیت پایه‌های پاکوتاه سیب در افزایش عملکرد، کاهش هزینه‌هایی از قبیل هرس، مبارزه با آفات و امراض امروزه این پایه‌ها در باغداری مدرن اهمیت زیادی پیدا کرده‌اند (۲۸). هم اکنون باغ‌های سیب با پایه‌های پاکوتاه در اقصی نقاط دنیا به‌صورت اقتصادی وجود دارد. از خصوصیات مطلوب این پایه‌ها قابلیت تکثیر غیرجنسی آن‌ها از طریق کشت بافت است (۱۵).

در این مطالعه، مقایسه اثر تیمارهای مختلف ضد عفونی و هورمونی و تعیین مناسبترین تیمار برای تکثیر درون شیشه ای با هدف تعیین شرایط بهینه جهت تکثیر درون شیشه‌ای ژنوتیپ های پاکوتاه سیب که از مهمترین پایه‌های سیب می باشند، انجام شد.

مواد و روشها

در این تحقیق پایه‌های رویشی سیب (M106، M111 و B9) که طی آزمایش‌های مختلف در مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی خراسان رضوی به‌عنوان پایه‌های برتر شناسایی شده بودند، جهت تکثیر از طریق کشت بافت مورد مطالعه قرار گرفتند. آزمایش شامل دو مرحله استقرار جوانه و شاخه‌زایی بود. در مرحله اول ریز

www.SID.ir

Archive of SID

نمونه‌های جوانه‌های انتهایی و جانبی در فصول مختلف (از تابستان ۱۳۸۹ تا بهار ۱۳۹۰) از پایه های سیب تهیه شدند بطوریکه در هر ریزنمونه حداقل یک جوانه وجود داشت.

پس از تهیه ریزنمونه از جوانه‌های انتهایی پایه‌های رویشی مورد مطالعه و شستشوی سطحی، به مدت نیم ساعت زیر آب جاری قرار داده شد. سپس عمل ضدعفونی تحت شرایط تیمارهای مختلف زیر دستگاه لامینارفلو (هود استریل) انجام شد. جوانه‌های ضدعفونی شده بر روی محیط کشت‌های مختلف (MS تغییر یافته، WPM و DKW) و در شرایط اتاق رشد شامل ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی و شدت نور ۵۰۰۰ لوکس و درجه حرارت ۱± ۲۵درجه سانتی‌گراد جهت استقرار قرار گرفتند. حدود یک ماه پس از کشت جوانه‌ها، نسبت به اندازه‌گیری پارامترهای مختلف از قبیل درصد آلودگی، تعداد شاخه جانبی، طول ساقه، درصد کالوس زایی و تعداد برگ اقدام گردید. درنهایت بهترین محیط کشت و شرایط ضدعفونی جهت استقرار جوانه پایه‌های رویشی مورد مطالعه مشخص گردید. در این آزمایش از سه نوع تیمار ضدعفونی به شرح ذیل استفاده گردید.

۱. کلرید جیوه ۰/۱ در صد به مدت ۳ دقیقه + اتانول ۷۰ در صد به مدت ۳۰ ثانیه
۲. کلرید جیوه ۰/۱ در صد به مدت ۵ دقیقه + اتانول ۷۰ در صد به مدت ۳۰ ثانیه
۳. هیپوکلریت سدیم ۰/۷۵ درصد به مدت ۱۵ دقیقه + اتانول ۷۰ در صد به مدت ۳۰ ثانیه

در مرحله بعد جهت تعیین بهترین تیمار هورمونی برای شاخه زایی اقدام گردید. در این آزمایش از محیط کشت MS تغییر یافته استفاده گردید زیرا جوانه‌ها در این محیط کشت در آزمایش اول بهترین شرایط رشد را دارا بودند. تیمارهای هورمونی مورد استفاده به‌این‌ترتیب بود:

۱. شاهد بدون هورمون
۲. ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر IBA +۱ میلی‌گرم در لیتر BAP
۳. ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر IBA +۲ میلی‌گرم در لیتر BAP
۴. ۱ میلی‌گرم در لیتر IBA
۵. ۲ میلی‌گرم در لیتر IBA

در این آزمایش نیز از سه پایه M106، M111 و B9 و پنج تیمار مختلف هورمونی استفاده شد. این آزمایش نیز مانند آزمایش اول به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار انجام شد که هر تکرار شامل چهار ارلن و در هر ارلن یک گیاهچه کشت گردید. صفات مورد بررسی در این آزمایش شامل طول ساقه، تعداد شاخه، در صد کالوس زایی و تعداد برگ است.

تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها و رسم نمودارها به ترتیب با استفاده از نرم‌افزارهای SAS و Excel انجام و مقایسه میانگین‌ها نیز با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال پنج درصد انجام شد.

نتایج

نمونه‌برداری در این آزمایش از شهریور ۸۹ تا خرداد ۹۰ در پنج زمان مختلف به شرح ذکر شده در جدول ۱ انجام شد. همان‌طور که در این جدول مشاهده می‌شود بهترین نتیجه با ۸۰ در صد جوانه‌های فعال از ریز نمونه‌های کشت شده در اواخر خردادماه حاصل گردید.

جدول ۱- مقایسه اثر زمان نمونه‌برداری بر فعال شدن ریز نمونه‌ها

زمان نمونه‌برداری	شهریور	آبان	بهمن	اوایل اردیبهشت	اواخر خرداد
درصد ریز نمونه فعال	۳۰	۹	۳	۱۰	۸۰

www.SID.ir

Archive of SID

نتایج تجزیه واریانس اثرات پایه، محیط کشت و شرایط ضدعفونی در جدول ۲ نشان داده شده است. اثر پایه و محیط کشت و تیمار ضدعفونی بر کلیه صفات به‌استثنای تعداد شاخه جانبی و در صد کالوس زایی معنی‌دار بود. اثر متقابل پایه، محیط کشت و شرایط ضدعفونی برای کلیه صفات به‌استثنای تعداد شاخه جانبی و در صد کالوس‌زایی معنی‌دار بود.

جدول ۲- نتایج تجزیه واریانس اثرات محیط کشت و شرایط ضدعفونی در کشت درون شیشه‌ای سه پایه رویشی سیب

منابع تغییرات	درجات آزادی	میانگین مربعات				
		درصد آلودگی	تعداد شاخه جانبی	طول ساقه(cm)	درصد کالوس زایی	تعداد برگ
پایه (a)	۲	۸۳۱/۲۹ *	۰/۲۲۸ **	۱/۱۵۳ **	۲۴۴۹/۷۶ **	۱۷/۱۱ **
محیط کشت (b)	۲	۱۶۵۴۹/۹۱ **	۰/۵۰۲ **	۱۱/۰۱۴ **	۵۹۸۵/۳۴ **	۹۴/۶۱۴ **
شرایط ضدعفونی (c)	۲	۸۷۴۹/۳۳۸ **	۰/۰۱۴ ns	۱/۲۲۸ **	۶۱/۰۰۳ ns	۱۸/۸۱ **
a×b	۴	۴۰۵/۸۹ ns	۰/۲۲۸ **	۵/۵۸۹ **	۲۵۸۶/۸ **	۴۲/۵۵ **
a×c	۴	۱۲۶/۴۲ ns	۰/۰۱۴ ns	۰/۷۸۱ **	۴۹/۵۳ ns	۱/۵۹ ns
b×c	۴	۵۲۲/۹۵ ns	۰/۰۱۴ ns	۰/۳۹۳ ns	۸۶/۶۱ ns	۴/۷۳ **
a×b×c	۸	۵۱۹/۴۴ *	۰/۰۱۴ ns	۰/۸۶۵ **	۹۹/۲۳ ns	۶/۴۷ **
خطای آزمایشی	۵۴	۲۰۶/۸۳	۰/۰۳۸	۰/۱۸۳	۷۶/۹۴	۱/۱۲

** معنی‌دار در سطح ۱٪، * معنی‌دار در سطح ۵٪ و ns غیر معنی‌دار

مقایسه میانگین اثرات پایه، محیط کشت و شرایط ضدعفونی در جدول ۳ نشان داده شده است. همان‌طور که در این جدول مشاهده می‌شود در بین سه پایه مورد مطالعه پایه M106، در مقایسه با بقیه پایه‌ها بیشترین تعداد شاخه جانبی، طول ساقه، در صد کالوس زایی و تعداد برگ را دارا بود.

جدول۳- مقایسه میانگین اثرات اصلی پایه، محیط کشت و شرایط ضدعفونی بر صفات درصد آلودگی، تعداد شاخه جانبی، طول ساقه، درصد کالوس زایی و تعداد برگ در کشت درون شیشه‌ای سه پایه رویشی سیب

	تیمار	درصد آلودگی	تعداد شاخه جانبی	طول ساقه(cm)	درصد کالوس زایی	تعداد برگ
پایه	M106	۳۸/۵۲ b	۰/۱۸ a	۰/۷۸ a	۲۳/۳۳ a	۲/۳۸ a
	M111	۳۵/۵۶ b	۰/۰۶ b	۰/۴۷ b	۵/۹۳ b	۱/۳۳ b
	B9	۴۹/۶۳ a	۰ b	۰/۳۹ b	۰/۷۴ c	۰/۸۲ b
محیط کشت	MS تغییر یافته	۸/۱۵ b	۰/۲۴ a	۱/۲۵ a	۲۹/۰۷ a	۳/۶ a
	WPM	۵۷/۷۸ a	۰ b	۰/۴ b	۰/۹۳ b	۰/۹۲ b
	DKW	۵۷/۷۸ a	۰ b	۰ c	۰ b	۰ c
شرایط ضدعفونی	A	۲۸/۸۹ b	۰/۱۱ a	۰/۵۳ b	۱۰ a	۱/۲۰ b
	B	۳۰/۳۷ b	۰/۰۶ a	۰/۳۵ b	۱۲/۰۴ a	۰/۸۷ b
	C	۶۴/۴۴ a	۰/۰۷ a	۰/۷۷۸ a	۷/۹۶ a	۲/۴۵ a

در هر ستون حروف یکسان بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار بر اساس آزمون دانکن است.

A:کلرید جیوه ۰/۱ ٪ و اتانول ۷۰٪ به ترتیب به مدت ۳دقیقه و ۳۰ ثانیه، B:کلرید جیوه ۰/۱ ٪ و اتانول ۷۰٪ به ترتیب به مدت ۵ دقیقه و ۳۰ ثانیه، C :هیپوکلریت سدیم ۰/۷۵٪ و اتانول ۷۰٪ به ترتیب به مدت ۱۵دقیقه و ۳۰ ثانیه.

www.SID.ir

Archive of SID

در ضمن درصد آلودگی کمی در پایه M106 مشاهده گردید. همچنین نتایج نشان داد که محیط کشت MS تغییر یافته کمترین در صد آلودگی، بیشترین تعداد شاخه جانبی، طول ساقه، در صد کالوس زایی و تعداد برگ را داشته است. مقایسه بین شرایط مختلف ضدعفونی نتایج نشان داد که شرایط ضدعفونی A (کلرید جیوه ۰/۱ ٪ و اتانول ۷۰٪ به ترتیب به مدت ۳ دقیقه و ۳۰ ثانیه) کمترین در صد آلودگی، بیشترین تعداد شاخه جانبی و طول ساقه را داشته است.

مقایسه میانگین اثرات متقابل پایه، محیط کشت و شرایط ضدعفونی در جدول ۴ نشان داده شده است.

جدول ۴- مقایسه میانگین اثرات متقابل پایه × محیط کشت × شرایط ضدعفونی بر صفات درصد آلودگی، تعداد شاخه جانبی، طول ساقه، درصد کالوس زایی و تعداد برگ در کشت درون شیشه‌ای سه پایه رویشی سیب.

پایه	محیط کشت	شرایط ضدعفونی	درصد آلودگی	تعداد شاخه جانبی	طول ساقه (cm)	درصد کالوس زایی	تعداد برگ
M106	MS تغییر یافته	A	۰/۰۰ i	۰/۵۵ a	۲/۱۶ ab	۶۸/۳۳ b	۵/۸۷ a
		B	۰/۰۰ i	۰/۵۷ a	۲/۴۱ a	۸۵/۰۰ a	۶/۱۰ a
		C	۶/۶۷ hi	۰/۵۰ a	۲/۰۰ ab	۵۶/۶۷ b	۷/۷۲ a
	WPM	A	۴۶/۶۷ cdef	۰/۰۰ c	۰/۴۹ d	۰/۰۰ d	۰/۸۹ c
		B	۳۳/۳۳ defgh	۰/۰۰ c	۰/۰۰ d	۰/۰۰ d	۰/۰۰ c
		C	۶۶/۶۷ cd	۰/۰۰ c	۰/۰۰ d	۰/۰۰ d	۰/۸۳ c
	DKW	A	۳۳/۳۳ defgh	۰/۰۰ c	۰/۰۰ d	۰/۰۰ d	۰/۰۰ c
		B	۶۰/۰۰ cd	۰/۰۰ c	۰/۰۰ d	۰/۰۰ d	۰/۰۰ c
		C	۱۰۰/۰۰ a	۰/۰۰ c	۰/۰۰ d	۰/۰۰ d	۰/۰۰ c
M111	MS تغییر یافته	A	۰/۰۰ i	۰/۴۰ ac	۱/۴۰ bc	۶/۶۷ cd	۳/۴۰ b
		B	۶/۶۷ hi	۰/۰۰ c	۰/۷۲ cd	۲۳/۳۳ c	۱/۷۵ bc
		C	۱۳/۳۳ fghi	۰/۱۱ bc	۲/۱۲ ab	۱۵/۰۰ c	۶/۸۴ a
	WPM	A	۲۶/۶۷ defgh	۰/۰۰ c	۰/۰۰ d	۸/۳۳ cd	۰/۰۰ c
		B	۴۰/۰۰ cdefg	۰/۰۰ c	۰/۰۰ d	۰/۰۰ d	۰/۰۰ c
		C	۱۰۰/۰۰ a	۰/۰۰ c	۰/۰۰ d	۰/۰۰ d	۰/۰۰ c
	DKW	A	۴۶/۶۷ cdef	۰/۰۰ c	۰/۰۰ d	۰/۰۰ d	۰/۰۰ c
		B	۲۰/۰۰ efghi	۰/۰۰ c	۰/۰۰ d	۰/۰۰ d	۰/۰۰ c
		C	۶۶/۶۷ bc	۰/۰۰ c	۰/۰۰ d	۰/۰۰ d	۰/۰۰ c
B9	MS تغییر یافته	A	۱۳/۳۳ ghi	۰/۰۰ c	۰/۱۰ d	۶/۶۷ cd	۰/۰۷ c
		B	۰/۰۰ i	۰/۰۰ c	۰/۰۰ d	۰/۰۰ d	۰/۰۰ c
		C	۳۳/۳۳ cdefgh	۰/۰۰ c	۰/۳۴ d	۰/۰۰ d	۰/۶۹ c
	WPM	A	۵۳/۳۳ cde	۰/۰۰ c	۰/۶۰ d	۰/۰۰ d	۰/۵۸ c
		B	۶۰/۰۰ cd	۰/۰۰ c	۰/۰۰ d	۰/۰۰ d	۰/۰۰ c
		C	۹۳/۳۳ ab	۰/۰۰ c	۲/۵۰ a	۰/۰۰ d	۶/۰۰ a
	DKW	A	۴۰/۰۰ cdefgh	۰/۰۰ c	۰/۰۰ d	۰/۰۰ d	۰/۰۰ c
		B	۵۳/۳۳ cde	۰/۰۰ c	۰/۰۰ d	۰/۰۰ d	۰/۰۰ c
		C	۱۰۰/۰۰ a	۰/۰۰ c	۰/۰۰ d	۰/۰۰ d	۰/۰۰ c

در هر ستون حروف یکسان بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار بر اساس آزمون دانکن است. A :کلرید جیوه ۰/۱ ٪ و اتانول ۷۰٪ به ترتیب به مدت ۳دقیقه و

www.SID.ir

Archive of SID

۳۰ ثانیه، B:کلرید جیوه ۰/۱ ٪ و اتانول ۷۰٪ به ترتیب به مدت ۵ دقیقه و ۳۰ ثانیه، C: هیپوکلریت سدیم ۰/۷۵٪ و اتانول ۷۰٪ به ترتیب به مدت ۱۵دقیقه و ۳۰ ثانیه.

نتایج تجزیه واریانس اثرات پایه و تیمارهای هورمونی در کشت درون شیشه‌ای سه پایه رویشی سیب در جدول ۵ نشان داده شده است. اثر پایه بر کلیه صفات مورد مطالعه به‌استثنای تعداد برگ در سطح یک در صد معنی‌دار شد. همچنین اثر تیمارهای هورمونی بر کلیه صفات مورد مطالعه به‌استثنای درصد کالوس‌زایی بسیار معنی‌دار است. اثر متقابل پایه و تیمار هورمونی در مورد صفات تعداد شاخه و طول ساقه معنی‌دار شد اما در مورد صفات درصد کالوس زایی و تعداد برگ غیر معنی‌دار شد.

جدول ۵- نتایج تجزیه واریانس اثرات تیمارهای مختلف هورمونی در کشت درون شیشه‌ای سه پایه رویشی سیب

منابع تغییرات	درجات آزادی	میانگین مربعات			
		تعداد شاخه	طول ساقه(cm)	درصد کالوس زایی	تعداد برگ
پایه (a)	۲	۴/۲۶ **	۳/۲۳ **	۵۶۷/۰۴ **	۳۱/۶۹ ns
تیمارهای هورمونی (b)	۴	۱۷/۱۸ **	۱/۷۷ **	۱۸۴/۵۷ ns	۱۱۷۲/۰۴ **
a×b	۸	۲/۵۹ **	۰/۳۹ *	۱۸۴/۵۷ ns	۱۰۵/۶۴ ns
خطای آزمایشی	۳۰	۰/۶۲	۰/۱۳	۹۶/۸۴	۴۸/۰۱

** معنی‌دار در سطح ۱٪، *معنی‌دار در سطح ۵٪ و ns غیر معنی‌دار

مقایسه میانگین اثرات پایه و تیمارهای هورمونی در کشت درون شیشه‌ای سه پایه رویشی سیب در جدول ۶ نشان داده شده است. نتایج نشان داد که پایه B9 بیشترین تعداد شاخه و بیشترین تعداد برگ را داشته است اما بیشترین طول ساقه و در صد کالوس‌زایی مربوط به پایه M106 بوده است. همچنین مقایسه میانگین‌ها نشان داد که بیشترین تعداد شاخه و بیشترین تعداد برگ مربوط به تیمار هورمونی ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر IBA +۲ میلی‌گرم در لیتر BAP است. درحالی‌که بیشترین طول ساقه مربوط به تیمار هورمونی ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر IBA +۱ میلی‌گرم در لیتر BAP و بیشترین درصد کالوس زایی مربوط به تیمار هورمونی ۱ میلی‌گرم در لیتر IBA و بدون هورمون BAP است. نتایج نشان می‌دهد که تیمار هورمونی ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر IBA +۱ میلی‌گرم در لیتر BAP کمترین درصد کالوس‌زایی را داشته است.

مقایسه میانگین اثرات متقابل پایه و تیمارهای هورمونی در جدول ۷ نشان داده شده است.

جدول ۶- مقایسه میانگین اثرات تیمارهای هورمونی مختلف بر صفات تعداد شاخه، طول ساقه، درصد کالوس‌زایی و تعداد برگ در کشت درون شیشه‌ای سه پایه رویشی سیب

	تیمار	تعداد شاخه	طول ساقه(cm)	درصد کالوس زایی	تعداد برگ
پایه	M106	۱/۶۵ b	۲/۷۱ a	۱۱/۱۱ a	۱۳/۶۹ a
	M111	۱/۸۴ b	۲/۰۵ b	۰/۰۰ b	۱۴/۳۲ a
	B9	۲/۶۵ a	۱/۸۱ b	۰/۰۰ b	۱۶/۴۷ a
تیمارهای هورمونی	A	۱/۰۰ b	۲/۲۵ b	۲/۷۷ ab	۶/۷۳ b
	B	۳/۳۱ a	۲/۸۲ a	۰/۰۰ b	۲۵/۰۳ a
	C	۳/۷۹ a	۲/۳۴ b	۲/۷۷ ab	۲۹/۴۰ a
	D	۱/۱۵ b	۱/۶۹ c	۱۲/۹۶ a	۶/۴۲ b
	E	۱/۰۰ b	۱/۸۵ c	۰/۰۰ b	۶/۵۵ b

www.SID.ir

Archive of SID

در هر ستون حروف یکسان بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار بر اساس آزمون دانکن است. A:شاهد بدون هورمون، B: ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر IBA +۱ میلی‌گرم در لیتر BAP ، C: ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر IBA +۲ میلی‌گرم در لیتر BAP، D: ۱ میلی‌گرم در لیتر IBA و بدون هورمون BAP ، E: ۲ میلی‌گرم در لیتر IBA و بدون هورمون BAP.

جدول ۷- مقایسه میانگین اثرات متقابل پایه × تیمارهای هورمونی بر صفات تعداد شاخه، طول ساقه، درصد کالوس‌زایی و تعداد برگ در کشت درون شیشه‌ای سه پایه رویشی سیب.

پایه	تیمارهای هورمونی	تعداد شاخه	طول ساقه (cm)	درصد کالوس زایی	تعداد برگ
M106	A	۱/۰۰ e	۲/۷۸ abc	۱۰/۰۰ b	۸/۰۸ d
	B	۲/۱۷ cde	۳/۰۲ a	۰/۰۰ b	۱۶/۰۰ cd
	C	۲/۶۴ cd	۲/۹۰ ab	۱۰/۰۰ b	۲۵/۵۶ bc
	D	۱/۴۴ de	۲/۴۹ abcd	۳۳/۲۵ a	۱۰/۲۸ d
	E	۱/۰۰ e	۲/۳۶abcde	۰/۰۰ b	۸/۵۶ d
M111	A	۱/۰۰ e	۲/۲۹ bcde	۰/۰۰ b	۷/۷۸ d
	B	۳/۵۰ bc	۲/۶۷ abc	۰/۰۰ b	۲۸/۳۳ abc
	C	۲/۷۲ cd	۱/۸۸ def	۰/۰۰ b	۲۳/۷۸ bc
	D	۱/۰۰e	۱/۲۶fg	۰/۰۰ b	۴/۶۱d
	E	۱/۰۰e	۲/۱۸cde	۰/۰۰ b	۷/۱۱d
B9	A	۱/۰۰e	۱/۷۰ ef	۰/۰۰ b	۴/۳۳ d
	B	۴/۲۸b	۲/۷۸ abc	۰/۰۰ b	۳۰/۷۵ ab
	C	۶/۰۰a	۲/۲۴ bcde	۰/۰۰ b	۳۸/۸۶ a
	D	۱/۰۰e	۱/۳۲ fg	۰/۰۰ b	۴/۳۹ d
	E	۱/۰۰e	۱/۰۲ g	۰/۰۰ b	۴/۰۰ d

در هر ستون حروف یکسان بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار بر اساس آزمون دانکن است. A:شاهد بدون هورمون، B: ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر IBA +۱ میلی‌گرم در لیتر BAP ، C: ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر IBA +۲ میلی‌گرم در لیتر BAP، D: ۱ میلی‌گرم در لیتر IBA و بدون هورمون BAP ، E: ۲ میلی‌گرم در لیتر IBA و بدون هورمون BAP.

بحث

بهترین زمان برای گرفتن نمونه‌ها زمانی است که درخت از خواب زمستانی بیرون آمده و تقریباً فعالیت خود را شروع کرده‌اند زیرا در زمان خواب درخت، مواد فنلی از ریز نمونه آزاد گردیده که اثرات سوئی را در محیط کشت ایجاد می‌کنند (۳۰). زمان نمونه‌گیری می‌تواند بر درصد آلودگی و پاسخ ریزنمونه به کشت مؤثر باشد، بطوریکه آلودگی هر چه به انتهای سال نزدیک می‌شود، افزایش می‌یابد (۲۵). نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که باوجود اینکه در ماه‌های آبان الی اردیبهشت درصد آلودگی پایین است ولی جوانه‌ها فعال نمی‌شوند و به دلیل ترشح ترکیبات فنلی محیط کشت قهوه‌ای رنگ می‌شود. در صورتی که نمونه‌های گرفته شده از ژنوتیپ های منتخب در اواخر خرداد ماه به خوبی فعال می‌شوند. نتایج به دست آمده از این پژوهش با نتایج کوشال و همکاران (۲۰۰۵) مطابقت دارد(۲۱) اما با نتایج میتیک و همکاران (۲۰۱۲) متفاوت است (۲۵) که علت آن می‌تواند به شرایط جغرافیایی، محیطی و ژنوتیپ وابسته باشد. بنابراین می‌توان با توجه به نتایج این آزمایش زمان نمونه‌برداری برای ریز ازدیادی پایه‌های گزینش شده سیب را در اواخر خرداد ماه توصیه نمود.

www.SID.ir

Archive of SID

با توجه به نتایج به دست آمده از آزمایش استقرار جوانه در همه صفات به‌جز درصد آلودگی، پایه M106 برتری معنی‌داری نسبت به دیگر پایه‌های مورد مطالعه داشت. گروه‌بندی نتایج با آزمون دانکن نیز نشان داد که پایه M106 در مورد صفات تعداد شاخه جانبی، طول ساقه، درصد کالوس‌زایی و تعداد برگ در گروه a و پایه M111 در مورد کلیه صفات در گروه b و پایه B9 در مورد صفات تعداد شاخه جانبی، طول ساقه و تعداد برگ در گروه b قرار دارد در مورد صفت درصد کالوس زایی در گروه c قرار دارد. بنابراین می‌توان بیان نمود که پایه M106 پاسخ بهتری به کشت نشان داده است.

همان‌طور که در قسمت نتایج بیان شد محیط کشت MS تغییر یافته در تمامی صفات برتری نسبت به دو محیط دیگر از خود نشان داد. در رابطه با دو محیط WPM و DKW در هیچ‌کدام از صفات محیط DKW برتری نشان نداد ولی نتایج در مورد صفات درصد آلودگی، تعداد شاخه جانبی و درصد کالوس زایی تفاوت معنی‌داری باهم ندارند. در مورد صفات طول ساقه و تعداد برگ محیط کشت WPM نسبت به DKW برتری نشان داد. این امر را امیری و الاهنیا (۲۰۱۳) نیز تصدیق نمودند(۳).

برگ‌های نمونه‌های قرار داده شده در محیط کشت WPM نسبت به محیط MS تغییر یافته سریع‌تر زرد شده و همچنین برگ‌های این نمونه‌ها به‌صورت نازک و کشیده بر روی محیط کشت پخش گردیدند، که این نتایج با نتایج مارینو و نوفرینی (۲۰۱۳) مطابقت دارد (۲۴). نتایج نشان داد که محیط کشت MS تغییر یافته با میانگین تولید ۳/۶ عدد برگ بهترین محیط است و محیط WPM با میانگین ۰/۹۲ در مرتبه دوم قرار دارد. اختلاف این دو محیط کشت از نظر تعداد برگ معنی‌دار است. این مطلب را می‌توان به غلظت متفاوت عناصر ماکرو در دو محیط کشت MS تغییر یافته و WPM نسبت داد، زیرا غلظت نمک‌های به‌کاررفته در محیط کشت MS تغییر یافته نسبت به محیط کشت WPM بیشتر است. در رابطه با محیط کشت DKW با توجه به این‌که این محیط اولین بار برای گردو ساخته و استفاده شده است و بنابر مطالعه سیکوتی و همکاران (۲۰۰۸) این محیط کشت برای پایه‌های رویشی سیب مناسب نیست (۹). بنابراین می‌توان با توجه به نتایج این آزمایش محیط کشت مناسب برای ریز ازدیادی پایه‌های گزینش شده سیب را MS تغییر یافته توصیه نمود.

با توجه به نتایج به دست آمده از آزمایش استقرار جوانه و در مورد صفت درصد آلودگی که در تیمارهای ضدعفونی اهمیت بیشتری دارد، بین تیمار ضدعفونی هیپوکلریت سدیم ۰/۷۵٪ و اتانول ۷۰٪ به ترتیب به مدت ۱۵دقیقه و ۳۰ ثانیه با دو تیمار دیگر تفاوت معنی‌داری وجود دارد و این تیمار با میانگین ۶۴/۴۴ درصد آلودگی مناسب به نظر نمی‌رسد که این نتیجه با نتایج ارائه شده توسط دوبرانزکی و همکاران (۲۰۱۰) که بیان داشتند ضدعفونی با کلریت سدیم تأثیری بر از بین بردن آلودگی ندارد، در صورتی که استفاده کلرید جیوه بدین منظور نتایج مطلوبی نشان داد، مطابقت دارد (۱۲). در عین حال افزایش زمان تماس ریز نمونه با کلرید جیوه باآنکه باعث کاهش آلودگی می‌شود ولی به علت پلی فنلی شدن بافت‌ها موجب نابودی کشت‌ها می‌شود. که این مورد در نتایج آزمایش ما نیز مشهود بود به طوری که در تیمار ضدعفونی A (زمان استفاده از کلرید جیوه ۳ دقیقه) تعداد شاخه جانبی، طول ساقه و تعداد برگ بیشتری نسبت به تیمار ضدعفونی B(زمان استفاده از کلرید جیوه ۵ دقیقه) مشاهده گردید. بنابراین می‌توان اظهار نمود که بهترین روش ضدعفونی برای پایه‌های سیب تیمار A (کلرید جیوه ۰/۱ ٪ و اتانول ۷۰٪ به ترتیب به مدت ۳ دقیقه و ۳۰ ثانیه) است. تیمار مناسب ضدعفونی با نتایج بنماهیول و همکاران (۲۰۰۹) بر روی پسته (۵)، چاگ و همکاران (۲۰۰۹) بر روی ارکیده (۸) و ناس و همکاران (۲۰۱۰) بر روی *Prunus microcarpa* (۲۷) با تفاوت در زمان ضدعفونی مشابه بود که این تفاوت می‌تواند به‌اندازه ریز نمونه، زمان نمونه‌گیری

www.SID.ir

Archive of SID

و پیش تیمارهای ضدعفونی مربوط باشد. به‌طور کلی با توجه به نتایج به دست آمده از این آزمایش برای کشت پایه‌های رویشی سیب می‌توان روش ضدعفونی با کلرید جیوه ۰/۱ درصد به مدت ۳ دقیقه را توصیه نمود.

در آزمایش اول در خصوص استقرار جوانه پایه M106 برتری نشان داد اما در آزمایش دوم بررسی تیمارهای هورمونی در مورد صفت شاخه زایی و تعداد برگ پایه B9 برتری داشت. اما در مورد صفت طول ساقه و درصد کالوس زایی همچنان پایه M106 برتری داشت که این موضوع را می‌توان به تأثیر هورمون و استفاده از تیمارهای هورمونی مختلف در کشت بافت مرتبط دانست. همچنین با توجه به نتایج مقایسه میانگین پایه B9 در مورد صفت تعداد شاخه با میانگین ۲/۶۵ در گروه a قرار دارد که نسبت به پایه‌های دیگر برتری معنی‌داری نشان داد. همچنین پایه B9 در مورد صفت تعداد برگ با میانگین ۱۶/۴۷ در گروه a قرار دارد و در مورد این صفت تفاوت معنی‌دار با دوپایه دیگر ندارد. پایه M111 در مورد صفت تعداد برگ با میانگین ۱۴/۳۲ برگ در گروه a قرار دارد اما در مورد سایر صفات در گروه b قرار دارد. بنابراین می‌توان این‌گونه بیان نمود که پایه B9 بهترین پاسخ را نسبت به تیمارهای هورمونی جهت شاخه زایی داشته است. این نتایج با نتایج دردی و همکاران (۱۹۹۳) مطابقت دارد به این صورت که آنان امکان تکثیر درون شیشه‌ای ۱۱ ژنوتیپ محلب را به‌عنوان پایه برای دو رقم گیلاس مطالعه کردند. در این تحقیق نشان داده شد که میزان پرآوری شاخه در روی محیط مشابه برای پایه‌های مختلف متغیر بود و این‌گونه نتیجه گرفتند که میزان پرآوری تا حد زیادی به ژنوتیپ وابسته است (۱۳).

هورمون بنزیل آمینو پورین (BAP) که یک هورمون از گروه سیتوکینین‌ها است و باعث القای شاخه زایی می‌گردد در سه غلظت صفر، ۱ و ۲ میلی‌گرم در لیتر مورد بررسی قرار گرفت. بعد از اندازه‌گیری صفات مشخص گردید که غلظت ۲ میلی‌گرم در لیتر نسبت به دیگر تیمارهای اعمال شده مناسب‌تر است. در پژوهشی که ایکونا و مولئو (۲۰۱۰) بر روی کشت بافت پایه رویشی آلبالو انجام دادند بیان کردند که غلظت ۱ میلی‌گرم بنزیل آدنین نسبت به غلظت‌های ۰/۵، ۲، ۳ و ۴ میلی‌گرم در لیتر مناسب‌تر است (۱۷). کلمنته مورنو و همکاران (۲۰۱۲) نیز بیان نمودند که اختلاف معنی‌داری بین کاربرد دو غلظت ۰/۵ و ۱ میلی‌گرم در لیتر از هورمون BAP برای ریز ازدیادی پایه رویشی گیلاس وجود ندارد (۱۰). هورمون IBA که یک اکسین به شمار می‌رود و مانند دیگر اکسین‌ها باعث ریشه‌زایی در گیاهان می‌گردد در این آزمایش در غلظت‌های صفر، ۰/۱، ۱ و ۲ میلی‌گرم در لیتر مورد استفاده قرار گرفت که در مورد صفات، تعداد شاخه، تعداد برگ و طول ساقه غلظت ۰/۱ برتری داشت اما در مورد صفت درصد کالوس زایی غلظت ۱ میلی‌گرم در لیتر برتری نشان داد. در این رابطه گزارش شده است که غلظت اکسین زیادی نه‌تنها باعث القای ریشه‌زایی در گیاه *Withania somnifera* نمی‌گردد بلکه در برخی موارد باعث کند شدن این عمل نیز می‌گردد (۲۹).

مسئله دیگری که در این پژوهش مورد بررسی قرار گرفت بحث کاربرد توأم دو هورمون BAP و IBA در محیط کشت بود، که نتایج مقایسه میانگین‌ها نشان داد که در مورد صفاتی نظیر تعداد برگ که توسط هورمون BAP القا می‌گردند با افزایش غلظت هورمون IBA از تعداد برگ کاسته می‌شود. نتایج محققین دیگر نشان داده است که بهتر است، بسته به هدف مورد نظر این دو هورمون به‌طور جداگانه در محیط کشت به کار برده شود (۴). در مورد کشت بافت پایه رویشی زردآلو، گزارش شده است که در حضور NAA (که همانند IBA یک اکسین است) هورمون BAP تأثیر بیشتری بر شاخه زایی می‌گذارد (۷)، البته غلظت هورمون NAA نباید در سطوح بالا به کار رود و همچنین در مواردی که اکسین داخلی در سطح بالایی قرار

www.SID.ir

Archive of SID

دارد نباید از NAA همراه با BAP برای شاخه زایی در محیط کشت استفاده شود.

پارامتر دیگری که در فن کشت بافت اهمیت دارد مسئله تولید شاخه جانبی است، زیرا در مرحله واکشت نمونه‌ها، شاخه‌های جانبی تولید شده را می‌توان جدا نمود و هر یک را به‌عنوان یک نمونه در محیطی جداگانه کشت نمود. حتی در برخی موارد که رشد شاخ ساره‌ها قوی باشد از هر شاخ ساره می‌توان چندین ریز نمونه تهیه کرد و با این کار سرعت تکثیر بسیار افزایش می‌یابد (۱۱و۲۰). به همین منظور بررسی این صفت در مورد ریز ازدیادی پایه‌های سیب نشان داد که محیط کشت MS تغییر یافته نسبت به دو محیط دیگر مورد آزمایش تولید شاخه جانبی بیشتری نمود. در پژوهشی نیز محیط MS بهترین محیط تولید شاخه برای ریز ازدیادی بادام (*Amygdalus communis*) معرفی شد، همچنین غلظت ۱ میلی‌گرم در لیتر هورمون BAP در محیط کشت MS مناسب‌ترین غلظت برای تولید شاخه بادام در محیط کشت اعلام گردید (۱۸). نتایج نشان داد که در بین تیمارهای هورمونی اعمال شده، غلظت هورمونی ۰/۱ IBA + ۲ BAP با میانگین ۳/۷۹ بهترین نتیجه را برای تولید شاخه جانبی دارا است. علاوه بر این پایه B9 حاوی ۲ میلی‌گرم در لیتر بنزیل آدنین و ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر IBA بیشترین شاخه جانبی را تولید نمود.

در مورد صفت تولید کالوس با توجه به آزمون دانکن در تیمارهای مختلف هورمونی مشاهده گردید که کالوس زایی در تیمار هورمونی A و C در گروه ab قرار دارند. تیمار هورمونی D با میانگین ۱۲/۹۶ در گروه a قرار دارد و بیشترین کالوس زایی را داشته است. نتایج حاصل از این تحقیق با نتایج لینگ‌فی و همکاران (۲۰۰۹) که بیان داشتند غلظت‌های بالای اکسین سبب ایجاد کالوس و مانعی برای رشد شاخه و ریشه است مطابقت دارد (۲۳).

نتیجه‌گیری کلی

بر اساس نتایج حاصل از این پژوهش، مناسب‌ترین زمان نمونه‌برداری برای ریز ازدیادی پایه‌های سیب مورد آزمایش اواخر خرداد ماه تعیین شد. همچنین از بین پایه‌های مورد مطالعه پایه M106 در محیط MS تغییر یافته بهترین استقرار را داشت. بعلاوه استفاده از تیمار ضدعفونی شامل کلرید جیوه ۰/۱ ٪ و اتانول ۷۰٪ به ترتیب به مدت ۳ دقیقه و ۳۰ ثانیه سبب کمترین آلودگی شد. در مورد شاخه زایی، پایه B9 در حضور هورمون بنزیل آمینو پورین با غلظت ۲ میلی گرم در لیتر مناسب‌ترین پاسخ را داشت.

منابع

۱. جوکاری، س.، هدایت، م.، ۱۳۹۶. بررسی اثر تنظیم کننده های رشد بر باززایی چهار نوع کنار (Ziziphus spp.) درکشت درون شیشه ای. مجله پژوهش‌های گیاهی. ۳۰ (۳): ۷۳۵-۷۵۱.

۲. عباسی، ح.، تساعدی، س.، ؛ میرسلیمانی، م. و مسعودی، م. ۱۳۹۵. بررسی پتانسیل باز زایی استبرق *Calotropis procera* در شرایط کشت درون شیشه‌ای. مجله پژوهش‌های گیاهی. ۲۹ (۴): ۸۳۳-۸۴۲.

3. Amiri, E. M. and A. Elahinia. 2013. Optimization of medium composition for apple rootstocks. *African Journal of Biotechnology* 10(18): 3594-3601.

4. Arab, M. M., A. Yadollahi, A. Shojaeiyan, S. Shokri, and S. M. Ghojah. 2014. Effects of nutrient media, different cytokinin types and their concentrations on in vitro multiplication of G × N15 (hybrid of almond × peach) vegetative rootstock. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology* 12(2): 81-87.

5. Benmahioul, B., M. Kaid-Harche, N. Dorion, and F. Daguin. 2009. In vitro embryo germination and proliferation of pistachio (*Pistacia vera* L.). *Scientia Horticulturae* 122(3): 479-483.

6. Bhojwani, S. S. and P. K. Dantu, *Plant tissue culture: an introductory text*. 2013: Springer.

7. Cati, M., F. Gennari, and G. Marino. 2014. Effect of culture jar seal on in vitro rooting and subsequent acclimatization of three Italian

www.SID.ir

Archive of SID

apricot varieties. *Scientia Horticulturae* 168: 120-123.

8. Chugh, S., S. Guha, and I. U. Rao. 2009. Micropropagation of orchids: A review on the potential of different explants. *Scientia Horticulturae* 122(4): 507-520.
9. Ciccotti, A., C. Bisognin, I. Battocletti, A. Salvadori, M. Herdemertens, and W. Jarausch. 2008. Micropropagation of apple proliferation-resistant apomictic *Malus sieboldii* genotypes. *Agronomy Research* 6(2): 445-458.
10. Clemente-Moreno, M. J., P. Díaz-Vivancos, A. Piqueras, and J. A. Hernández. 2012. Plant growth stimulation in Prunus species plantlets by BTH or OTC treatments under in vitro conditions. *Journal of Plant Physiology* 169(11): 1074-1083.
11. Cornille, A., T. Giraud, M. J. M. Smulders, I. Roldán-Ruiz, and P. Gladieux. 2014. The domestication and evolutionary ecology of apples. *Trends in Genetics* 30(2): 57-65.
12. Dobránszki, J. and J. A. Teixeira da Silva. 2010. Micropropagation of apple — A review. *Biotechnology Advances* 28(4): 462-488.
13. Dradi, G., G. Vito, and A. Standardi. 1993. In vitro mass propagation of eleven *Prunus mahaleb* ecotypes. *Acta Horticulturae* 410: 477-484.
14. Elliott, R. F. 1972. Axenic culture of shoot apices of apple. *New Zealand Journal of Botany* 10(2): 254-258.
15. Geng, F., R. Moran, M. Day, W. Halteman, and D. Zhang. 2015. In Vitro Shoot Proliferation of Apple Rootstocks 'B. 9','G. 30', and 'G. 41'Grown under Red and Blue Light. *HortScience* 50(3): 430-433.
16. Harris, S. A., J. P. Robinson, and B. E. Juniper. 2002. Genetic clues to the origin of the apple. *Trends in Genetics* 18(8): 426-430.
17. Iacona, C. and R. Muleo. 2010. Light quality affects in vitro adventitious rooting and ex vitro performance of cherry rootstock Colt. *Scientia Horticulturae* 125(4): 630-636.
18. Isikalan, Ç., F. A. Akbas, S. Namli, E. Tilkat, and D. Basaran. 2008. In vitro micropropagation of almond (*Amygdalus communis* L. cv. Nonpareil). *African Journal of Biotechnology* 7(12).
19. Jones, O. 1967. Effect of benzyl adenine on isolated apple shoots. *Nature* 215: 1514-1515.
20. Kalinowska, M., A. Bielawska, H. Lewandowska-Siwkiewicz, W. Priebe, and W. Lewandowski. 2014. Apples: Content of phenolic compounds vs. variety, part of apple and cultivation model, extraction of phenolic compounds, biological properties. *Plant Physiology and Biochemistry* 84: 169-188.
21. Kaushal, N., M. Modgil, M. Thakur, and D. Sharma. 2005. In vitro clonal multiplication of an apple rootstock by culture of shoot apices and axillary buds. *Indian journal of experimental biology* 43(6): 561.
22. Larsen, F. E. and S. S. Higgins. 1993. Growth and fruit production of young micropropagated apple (*Malus domestica* Borkh.) trees. *Scientia Horticulturae* 53(3): 205-211.
23. LingFei, X., M. FengWang, and L. Dong. 2009. Plant regeneration from in vitro cultured leaves of Lanzhou lily (*Lilium davidii* var. unicolor). *Scientia Horticulturae* 119(4): 458-461.
24. Marino, G. and M. Noferini. 2013. Effect of the type of closure for culture bottles on micropropagation efficiency of apricot. *Scientia Horticulturae* 161: 306-313.
25. Mitić, N., M. Stanišić, J. Milojević, L. Tubić, T. Ćosić, R. Nikolić, S. Ninković, and R. Miletić. 2012. Optimization of in vitro regeneration from leaf explants of apple cultivars Golden Delicious and Melrose. *HortScience* 47(8): 1117-1122.
26. Modgil, M., D. R. Sharma, and S. V. Bhardwaj. 1999. Micropropagtion of apple cv. Tydeman's Early Worcester. *Scientia Horticulturae* 81(2): 179-188.
27. Nas, M. N., Y. Bolek, and N. Sevgin. 2010. The effects of explant and cytokinin type on regeneration of *Prunus microcarpa*. *Scientia Horticulturae* 126(2): 88-94.
28. Robinson, T., W. Autio, J. Clements, W. Cowgill, C. Embree, V. Gonzalez, S. Hoying, M. Kushad, M. Parker, and R. Parra. 2012. Rootstock tolerance to apple replant disease for improved sustainability of apple production. *Acta horticulturae*. 940: 521-528.
29. Sivanesan, I. and S. W. Park. 2015. Optimizing factors affecting adventitious shoot regeneration, in vitro flowering and fruiting of *Withania somnifera* (L.) Dunal. *Industrial Crops and Products* 76: 323-328.
30. Thomas, T. D. 2008. The role of activated charcoal in plant tissue culture. *Biotechnology Advances* 26(6): 618-631.

www.SID.ir

Archive of SID

31. Walkey, D. 1972. Production of apple plantlets from axillary-bud meristems. *Canadian Journal of Plant Science* 52(6): 1085-1087.

The effects of medium, sterilization and hormonal treatment on micropropagation of some apple (*Mallus domestica* Borkh.) rootstocks

Mohamadzadeh Moghadam N.[1], Safipour Afshar A.[2] and Saeid Nematpour F.[2]

[1]Agricultural Researcher Center, Razavi Khorasan, Mashhad, I.R. of Iran

[2]Dept. of Biology, Neyshabur Branch, Islamic Azad University, Neyshabur, I.R. of Iran

Abstract

Micropropagation of apple has played an important role in the production of healthy, disease-free plants and in the rapid multiplication of rootstocks with desirable traits. In this study, the effects of disinfection, medium type and plant hormone on contamination, number of lateral branches, shoot length, callus induction, number of leaves of three rootstocks M106, M111 and B9 as factorial experiment in completely randomized design with three replications were investigated. The explants Surface sterilized by different concentrations of mercuric chloride and sodium hypochlorite and then were cultivated in modified MS, WPM and DKW media. The lowest contamination achieved by mercuric chloride (0.1%) and ethanol (70%) for 3 minutes and 30 Seconds, respectively. In this study, the modified MS medium supplemented with 0.1 mg/L BA with maximum growth had more successful establishment. Mean comparisons showed that rootstock M106 in terms of all studied traits, have a significant difference with other rootstocks, and So that the highest shoot length, leaves number and callus induction observed in this rootstock. The maximum branch initiation achieved from medium supplemented by 0.1 mg/ L IBA and 2 mg/ L BAP. The results showed that genotypes respond differently to culture conditions, as the rootstock B9 showed better response to branch initiation than other genotypes.

Key words: Apple, Rootstock, In Vitro, Establishment and Shoot initiation

www.SID.ir