

بررسی ریزازدیادی تعدادی از پایه‌های هسته‌داران (*Prunus sp.*) تحت تأثیر محیط

کشت، تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی و نانولوله‌های کربنی

حسن ساریخانی خرمی^۱، حسن ساریخانی^{۲*} و عبدالکریم چهرگانی^۳

(۱) دانشجوی دکتری گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه بوعلی سینا، همدان.

(۲) استاد گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه بوعلی سینا، همدان.

(۳) استاد گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه بوعلی سینا، همدان.

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۰۴/۳۱ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۸/۰۸

چکیده

استفاده از پایه‌های رویشی به منظور یکنواخت سازی تولید و مقابله با دشواری‌های ناشی از پایه‌های بذری در درختان میوه در باغداری نوین ضروری است. این پژوهش با هدف تعیین پروتکل مناسب برای ضدعفونی، پرآوری و ریشه‌زایی پایه‌های رویشی میروبالان 29C، GF677 و گارنم و نیز بررسی کاربرد نانولوله‌های کربنی چندجداره (MWCNs) بر استقرار و رشد این گیاهان انجام شد. محیط کشت‌های DKW، WPM و MS تهیه شدند. به منظور بررسی اثر نوع محیط کشت و تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی از ریزنمونه‌های تک گره استفاده شد. ریزنمونه‌های میروبالان 29C، گارنم و GF677 به ترتیب در محیط کشت‌های MS، DKW و MS مناسب‌ترین استقرار را داشتند. در پایه GF677 بیشترین تعداد شاخه، تعداد گره و طول شاخه در مرحله پرآوری در غلظت ۱ میلی‌گرم در لیتر BA به همراه ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر NAA به دست آمد. در پایه گارنم بیشترین تعداد شاخه در غلظت ۲ میلی‌گرم در لیتر BA به همراه ۰/۲۵ میلی‌گرم در لیتر NAA مشاهده شد و بیشترین تعداد گره، طول شاخه و طول میان‌گره در تیمار ۱ میلی‌گرم در لیتر BA همراه با ۰/۲۵ میلی‌گرم در لیتر NAA مشاهده شد. در پایه میروبالان 29C بیشترین تعداد شاخه در تیمار ۱ میلی‌گرم در لیتر BA همراه با ۰/۲۵ میلی‌گرم در لیتر NAA مشاهده شد. بالاترین میزان ریشه‌زایی در پایه میروبالان 29C، گارنم و GF677 در غلظت‌های ۱، ۲ و ۳ میلی‌گرم در لیتر IBA (به ترتیب) به دست آمد. در ادامه کاربرد ۵۰ میلی‌گرم در لیتر MWCNs سبب افزایش رشد ریز نمونه‌ها شد اما با افزایش غلظت، اثرات منفی در رشد و نمو ریز نمونه‌ها مشاهده شد. استفاده از MWCNs می‌تواند در جهت افزایش کارایی کشت بافت در ریز نمونه‌های گیاهان چوبی مفید باشد.

واژه‌های کلیدی: هسته‌داران، پایه‌های رویشی، ریزازدیادی، نانولوله‌های کربنی

* نویسنده مسئول، پست الکترونیکی: sarikhani@basu.ac.ir

مقدمه

درختان میوه هسته‌دار بخش مهمی از خانواده گل‌سرخیان^۱ هستند که بیش از ۴۳۰ گونه از درختان و درختچه‌ها را شامل می‌شوند (۲۰). حدود ۹/۶ درصد باغات کل کشور، زیر کشت درختان میوه هسته‌دار است و حدود ۱۱ درصد تولید میوه کشور را به خود اختصاص داده است (۱). اغلب پایه‌های مورد استفاده برای درختان میوه‌ی هسته‌دار در ایران، بذری هستند. پایه‌های رویشی در مقایسه با این پایه‌های بذری، مزایایی همچون یکنواختی اندازه‌ی درخت، کنترل رشد، تسهیل مدیریت باغ،

^۱ Rosaceae

مقاومت در برابر تنش‌ها، آفات و بیماری‌ها و همچنین افزایش عملکرد در واحد سطح را دارند (۱۲). برای بادام، هلو و آلوها پایه‌های رویشی مناسب مختلفی پیشنهاد شده است، از جمله پایه‌های GF677^۲، نماگارد^۳، نامارد و میروبالان^۴ 29C که به‌عنوان پایه‌های مناسب در دنیا شناخته شده و مورد استفاده قرار گرفته است (۵، ۱۲).

استفاده از روش‌های تکثیر رویشی برای حفظ ویژگی‌های ژنتیکی پایه‌های رویشی، ضروری است. در دهه‌های گذشته، رویکردهای مختلفی برای تکثیر غیرجنسی ژنوتیپ‌های برتر استفاده شده است. در این بین ریزازدیادی، با استفاده از مجموعه‌ای از تکنیک‌ها، امکان تکثیر انبوه را در زمان کوتاه و با کیفیتی بالا و با حفظ ویژگی‌های ژنتیکی فراهم می‌کند. علاوه بر این به‌طور کلی گیاهان حاصل از ریزازدیادی در مقایسه با گیاهان بذری قدرت بیشتری داشته، یکنواخت‌تر هستند و بلوغ و رشد سریع‌تری دارند (۱۴، ۱۸). به‌طور معمول ریزازدیادی دارای پنج مرحله شامل انتخاب گیاه مادری، استقرار ریزنمونه‌ها، شاخه‌زایی، ریشه‌زایی و مرحله سازگار کردن نمونه‌ها به شرایط طبیعی می‌باشد (۲۳). پژوهش‌های متعددی برای بهبود مراحل ریزازدیادی و افزایش ضریب تکثیر در پایه‌های هسته‌داران انجام شده است.

در پژوهشی شعبانی و همکاران (۴۴) بیشترین ضریب تکثیر ۳/۴۱ را در ریزازدیادی پایه میروبالان 29C گزارش کرده‌اند. همچنین در پژوهش‌های مختلف، از محیط کشت‌های مختلفی برای ریزازدیادی پایه‌های درختان هسته‌دار استفاده شده است: محیط کشت MS (۷، ۱۱، ۲۳، ۴۴)، محیط کشت WPM (۱۱، ۴۲، ۴۳)، محیط کشت DKW (۷)، محیط کشت QL (۷، ۱۱، ۴۴). علاوه بر ترکیبات محیط کشت، بررسی اثر منابع کربوهیدراتی (۳۳)، ترکیبات مختلف مانند تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی (۱۳، ۲۳، ۴۰، ۴۳) و مواد نانو (۲۵، ۴۲) و افزودن آن‌ها به محیط کشت برای بهبود ریزازدیادی زیرنمونه‌های گیاهی مورد بررسی قرار گرفته است. شعبانی و همکاران (۴۵) با کاربرد غلظت‌های مختلف BA و NAA روی پایه میروبالان 29C، بیشترین پرآوری شاخه را در غلظت ۲ میلی‌گرم در لیتر BA به همراه ۱ میلی‌گرم NAA مشاهده کردند و با افزایش غلظت BA در محیط کشت MS، پرآوری کاهش یافت. نسبت‌های مختلف بین BA و NAA می‌تواند باعث تغییر فرآیند رشد گیاه در جهت تشکیل و گسترش ریشه و شاخساره گردد.

اصطلاح نانوذرات به ذراتی اطلاق می‌شود که اندازه آن‌ها حداقل در یک بعد (طول، عرض یا عمق) کمتر از ۱۰۰ نانومتر باشد (۳۷). مواد نانو تنوع بسیار زیادی داشته و در سال‌های اخیر، استفاده از آن‌ها در گیاهان برای اهداف مختلف افزایش یافته است (۲۱، ۳۶). استفاده از فناوری نانو در زمینه زراعی می‌تواند به مزایای متعددی مانند بهبود رشد گیاه منجر شود (۱۹). در میان نانومواد، نانومواد با پایه کربن، مانند نانولوله‌های کربنی تک جداره و چند جداره به دلیل دارا بودن ویژگی‌های منحصر بفردی همچون خواص مکانیکی، الکتریکی، حرارتی و شیمیایی جایگاه ویژه‌ای بدست آورده‌اند (۳۶). از جمله آن‌ها می‌توان به تاثیر کاربرد نانولوله‌های کربنی چند جداره در غلظت کم، بر رشد و افزایش بیان ژن‌های مقاومت به تنش در گیاه توس (۵۷)، افزایش تشکیل چوب در دو گونه صنوبر (۳۰)، افزایش رشد سلولی و برخی ویژگی‌های بیوشیمیایی در کشت سوسپانسیون سلولی گیاه دارویی (۸)، افزایش رشد و جذب آب در کلم بروکلی تحت تنش شوری (۳۴)، افزایش بیان ژن‌های درگیر در تقسیم سلولی و بزرگ شدن سلولی در گیاه تنباکو (۲۷)، افزایش تولید کالوس و تمایز و همچنین تولید متابولیت‌های ثانویه در گیاه پیروش^۵ در شرایط درون شیشه‌ای (۲۲)، افزایش طول ساقه و وزن تر شاخه، برگ و ریشه در پایه GF677 شرایط درون شیشه‌ای (۴۳)، رشد اولیه، زمان گل‌دهی و هورمون‌های گیاهی در گوجه فرنگی (۲۴)، تاثیر بر سلول‌های ریشه

^۲GF677 (*Prunus amygdalus* × *Prunus persica*)

^۳Nemaguard (*Prunus persica*)

^۴Myrobalan29c (*Prunus cerasifera*)

^۵ - *Catharanthus roseus*

و جذب و انتقال آب و مواد غذایی (۳۵) اشاره کرد. علاوه بر گزارش‌های متعددی از مفید بودن این مواد روی گیاهان، در موارد متعددی نیز اثر سمیت این ترکیبات بر گیاهان گزارش شده است (۱۵، ۱۷). عوامل مختلفی از جمله ویژگی‌های مواد نانو، فیزیولوژی گیاه، غلظت و روش کاربرد و شرایط محیطی در نوع اثر موادماتانو تأثیر گذار هستند (۱۰، ۴۱). با اینکه استفاده از مواد نانو در کشاورزی کاربرد زیادی پیدا کرده است اما بسیاری از جنبه‌های جذب، انتقال، تجمع و همچنین اثرات و مکانیسم اثر مواد نانو در گیاهان ناشناخته است.

از جمله دشواری‌های ریز ازدیادی گیاهان چوبی، تعیین تیمار مناسب برای ضد عفونی نمونه‌ها، نوع محیط کشت و غلظت تنظیم‌کننده‌های رشدی بهینه و همچنین بالا بردن ضریب تکثیر در ریزازدیادی پایه‌های رویشی می‌باشد. این پژوهش به منظور تعیین روش ضد عفونی و محیط کشت مناسب جهت ریزازدیادی سه پایه‌ی پر کاربرد درختان میوه‌ی هسته‌دار شامل GF677، میروبالان 29C و گارنم^۶ انجام شده است و همچنین استفاده از نانولوله‌های کربنی به منظور تسهیل جذب املاح و تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی توسط ریز نمونه از محیط کشت در این پژوهش مورد بررسی قرار گرفته است.

مواد و روشها

این پژوهش در گلخانه و آزمایشگاه کشت بافت گروه علوم باغبانی دانشگاه بوعلی سینا روی سه پایه GF677، میروبالان 29C و گارنم انجام شد. در آزمایشگاه سرشاخه‌های حاصل از رشد جدید گیاه مادری پس از جدا نمودن برگ، با آب جاری و مایع شوینده به مدت ده دقیقه شسته شده و جهت انجام سایر مراحل کشت مورد استفاده قرار گرفتند. نمونه‌ها به قطعات ۲ تا سه گره‌ای تقسیم گردیدند و جهت تعیین مناسب‌ترین غلظت و زمان کاربرد هیپوکلریت سدیم، محلول‌های ۱، ۱/۵، ۲ و ۲/۵ درصد آن همراه با حدود ۰/۰۵ درصد تویین ۲۰ تهیه شده و به مدت ۱۰، ۱۵ و ۲۰ دقیقه جهت ضد عفونی نمونه‌ها مورد استفاده قرار گرفتند. پس از گذشت ۳۰ روز تعداد نمونه‌های سالم، آلوده و سوخته هر یک از تیمارها ثبت شد.

جهت تعیین محیط کشت مناسب برای استقرار ریزنمونه‌ها، از سه محیط کشت پایه MS (۳۹)، WPM (۳۸) و DKW (۱۸) استفاده شد. بدین منظور مقدار ۳۰ میلی‌لیتر از محیط کشت‌های ذکر شده حاوی ۳ درصد ساکارز و ۰/۷ درصد آگار، پس از تنظیم پی‌اچ ۵/۷±۰/۱ (مدل ۸۲۷، متروم، سوئیس) و حل شدن یکنواخت آگار، در شیشه‌های کشت ۲۰۰ میلی‌لیتری توزیع شد. سپس شیشه‌های کشت در اتوکلاو قرار گرفته و به مدت ۱۵ دقیقه در فشار ۱/۲ اتمسفر و دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد استریل گردیدند. کشت نمونه‌ها در شرایط استریل و در زیر هود لامینار ایر فلو انجام پذیرفت. نمونه‌ها پس از ضد عفونی سطحی، به ریزنمونه‌های تک گره^۷ به طول تقریبی یک سانتی‌متر تقسیم شده و در شیشه‌های کشت حاوی سه نوع محیط کشت MS، WPM و DKW کشت شدند. شیشه‌های کشت در اتاقک رشد در زیر نور فلورسنت با شدت نور ۷۵ میکرومول بر مترمربع در ثانیه و فتوپریود ۱۶ به ۸ روشنایی به تاریکی و دمای ۲۴±۱ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. وضعیت رشدی ریزنمونه‌ها و همچنین تعداد برگ آن‌ها هر ۱۵ روز یکبار تا زرد شدن برگ‌ها مورد بررسی و یادداشت برداری قرار گرفت. این آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار و دو شیشه در هر تکرار که هر شیشه حاوی سه ریزنمونه بود انجام شد.

^۶ - Garnem (*Prunus persica* × *Prunus amygdalus*)

^۷ Single node

به‌منظور بررسی شاخه‌زایی از محیط کشت مناسب برای استقرار ریزنمونه‌های هر پایه در مرحله قبل، همراه با بنزیل‌آدنین (BA) در چهار غلظت ۰، ۱، ۲ و ۳ میلی‌گرم در لیتر و نفتالین استیک اسید (NAA) در سه غلظت ۰، ۰/۱، ۰/۲۵ و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر به همراه ۳ درصد ساکارز و ۰/۷ درصد آگار استفاده شد. شرایط ضد عفونی محیط کشت و اتافک کشت همانند آزمایش اول بود. این آزمایش در قالب آزمایش فاکتوریل با دو فاکتور (غلظت نفتالین استیک اسید و غلظت بنزیل‌آدنین) بر پایه‌ی طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار و دو شیشه در هر تکرار و سه ریزنمونه در هر شیشه، انجام شد. در پایان هفته‌ی چهارم ریزنمونه‌ها واکشت شده و در پایان هفته هشتم شاخص‌های رشدی ریزنمونه‌ها از جمله تعداد شاخه، تعداد گره، طول شاخه و طول میان‌گره‌ها اندازه‌گیری شد.

برای ریشه‌زایی و رشد ریشه‌ها از محیط کشت نیم غلظت MS همراه با ایندول بوتیریک اسید (IBA) در غلظت ۰، ۰/۵، ۱ و ۲ میلی‌گرم در لیتر استفاده شد.

برای بررسی اثر نانو لوله‌های کربنی بر رشد ریزنمونه‌ها، پایه میروبالان 29C انتخاب شد که رشد متعادلی داشت، تا هم اثرات مثبت و هم اثرات منفی، این ترکیبات مشخص گردد. به این منظور از نانو لوله‌های کربنی در غلظت‌های ۰، ۲۰، ۵۰، ۱۰۰ و ۲۵۰ میلی‌گرم در لیتر استفاده شد. در ابتدا محیط کشت مناسب برای استقرار (حاصل از نتایج آزمایش قبل DKW) ساخته شد و سپس غلظت مورد نظر از نانو لوله‌های کربنی چند جداره (قطر خارجی ۲۰-۱۰ نانومتر، قطر داخلی ۱۰-۵ نانومتر، طول رشته ۳۰ میکرومتر و مساحت سطح ۲۰۰ متر مربع بر گرم) با دقت به محیط اضافه گردید و در پایان محیط کشت در حمام فراصوت (التراسونیک) قرار گرفت تا نانولوله‌های چند جداره موجود در محیط کشت به خوبی پخش شوند. سپس پی اچ محیط کشت روی 5.7 ± 0.1 تنظیم گردید و پس از اتوکلاو و پیش از سرد شدن محیط به کمک دستگاه التراسونیک ترکیب نانو مجدداً پخش شد. پس از ۴۵ روز از کاشت، علاوه بر تعداد گره، طول شاخه و طول میان‌گره و سطح برگ، وزن تر ریشه، ساقه، برگ و جوانه نیز اندازه‌گیری شد. سپس نمونه‌ها به مدت ۷۲ ساعت در آون با دمای ۸۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند و وزن خشک نمونه‌ها اندازه‌گیری شد. با استفاده از این داده‌ها و با فرمول زیر درصد آب هر یک از بخش‌ها محاسبه شد.

$$\text{درصد آب بافت} = 100 \times \frac{(\text{وزن خشک}) - (\text{وزن تر})}{(\text{وزن تر})}$$

داده‌های حاصل از این پژوهش ابتدا از لحاظ نرمال بودن مورد بررسی قرار گرفت. در صورت نیاز با استفاده از رابطه رادیکال x، نرمال شدند. سپس با کمک نرم افزار SAS (نسخه‌ی ۹/۴) تجزیه شدند. مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح ۵ درصد مورد بررسی قرار گرفت.

نتایج

بهینه‌سازی شرایط ضد‌عفونی

اثر نوع پایه و غلظت هیپوکلریت سدیم در سطح یک درصد و اثر متقابل این دو فاکتور در سطح پنج درصد بر درصد نمونه‌های سالم و سوخته معنی‌دار شد. در ارتباط با درصد نمونه‌های آلوده، غلظت هیپوکلریت سدیم در سطح یک درصد

معنی‌دار شد اما اثر نوع پایه بر این صفت، معنی‌دار نبود. درصد نمونه‌های سالم در میروبالان 29C و گارنم بیشتر از GF677 بود. بیشترین درصد سوختگی در نمونه‌های GF677 (۲۶ درصد) و کمترین میزان آن در نمونه‌های میروبالان 29C (۰ درصد) مشاهده شد (جدول ۱). به طور کلی بیشترین تعداد نمونه سالم در تیمار ۱۵ دقیقه هیپوکلریت سدیم ۱/۵ درصد به دست آمد. بیشترین نمونه‌ی آلوده نیز در تیمار ۱۰ دقیقه و بالاترین میزان سوختگی نمونه‌ها در اثر مواجهه با هیپوکلریت سدیم در تیمار ۲۰ دقیقه مشاهده شد. در مورد اثر متقابل پایه و تیمار ضد عفونی، تیمار ۲۰ دقیقه غوطه‌وری در هیپوکلریت سدیم ۱/۵ درصد بیشترین نمونه سوخته را در پایه GF677 ایجاد نمود.

جدول ۱- اثر متقابل پایه و زمان ضد عفونی بر درصد نمونه‌های سالم و سوخته با غوطه‌وری در هیپوکلریت سدیم ۱/۵ درصد پایه‌های میروبالان 29C، گارنم و GF677.

پایه	GF677			گارنم			میروبالان 29C		
	۲۰	۱۵	۱۰	۲۰	۱۵	۱۰	۲۰	۱۵	۱۰
زمان دقیقه									
درصد نمونه سالم	73.9 d	81.2 c	81.2 c	91.6 ab	82.2 c	86.4 bc	95.8 a	90.6 ab	83.3 c
درصد نمونه سوخته	26.0 a	17.7 b	5.2 def	7.3 de	2.1 fg	13.5 bc	3.1 efg	9.37 cd	0.0 g

حروف مشابه در هر ردیف به معنی عدم وجود اختلاف معنی‌دار با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح ۵ درصد است.

استقرار

با توجه به داده‌ی تعداد برگ سبز در مرحله استقرار برای هر سه پایه در هر سه محیط کشت، بیشترین تعداد برگ سبز در هر ریزنمونه در زمان ۴۵ روز پس از کشت مشاهده شد. روند و سرعت رشد در پایه‌های مختلف متفاوت بود (شکل ۱).



شکل ۱- تفاوت رشد و نمو در سه ریزنمونه میروبالان 29C، گارنم و GF677 (به ترتیب از راست به چپ) در محیط کشت منتخب هر یک (یعنی

MS, MS, DKW)

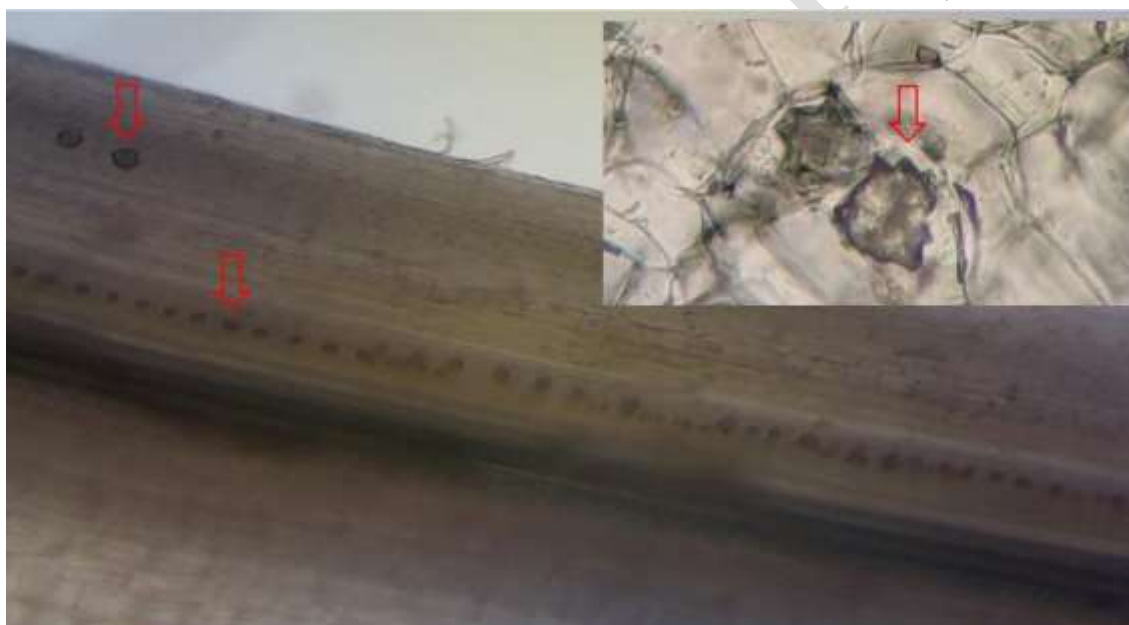
در ۱۵ روز اول، پایه GF677 تقریباً نزدیک به پایه میروبالان 29C، با سرعت بیشتری شروع به رشد نمود اما پس از آن روند کاهشی در تعداد برگ سبز و فعال در ریزنمونه‌های این پایه دیده شد؛ به نحوی که در دوره‌های پایانی با اختلاف معنی‌داری پایین‌ترین میزان برگ سبز متعلق به این پایه بود (جدول ۲).

جدول ۲- تعداد برگ سبز تشکیل شده (در دوره‌های زمانی ۱۵ روزه) و متوسط طول نهایی شاخه در ارقام و در محیط‌های کشت مختلف

میروبالان 29C			گارنم			GF677			پایه
MS	DKW	WPM	MS	DKW	WPM	MS	DKW	WPM	محیط کشت
5.33 b	5.53 ab	4.06 c	3.46 d	2.70 de	2.66 e	6.00 a	3.16 de	5.00 b	۱۵ روز اول
9.20 bc	10.70 a	7.56 d	8.76 c	6.20 e	9.43 b	8.10 d	6.10 e	9.43 b	تعداد برگ
11.63 b	14.56 a	9.36 e	11.03 c	10.1 d	7.73 g	8.56 f	6.46 h	9.90 d	۱۵ روز سوم
5.96 b	6.96 a	4.73 c	4.10 d	3.50 e	4.53 cd	1.83 f	0.96 g	0.40 g	۱۵ روز چهارم
28.40 b	37.10 a	10.84 d	17.99 c	16.49 c	6.46 e	6.55 e	4.75 ef	3.31 f	متوسط طول نهایی شاخه

حروف مشابه در هر ردیف به معنی عدم وجود اختلاف معنی‌دار با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح ۵ درصد است.

در مرحله استقرار در نمونه‌های کشت شده، رسوب مقداری از نمک‌های محیط کشت به صورت بلورهای چند وجهی در سلول‌های بافت پارانشیم ساقه مشاهده شد (شکل ۲).



شکل ۲- بلورهای نمک چند وجهی در سلول‌های بافت پارانشیم ساقه ریز نمونه‌های پایه میروبالان 29C در مرحله استقرار و در محیط کشت DKW علامت پیکان شکل چند وجهی و محل قرار گیری این بلور ها در ساقه را نشان می‌دهد.

پراوری

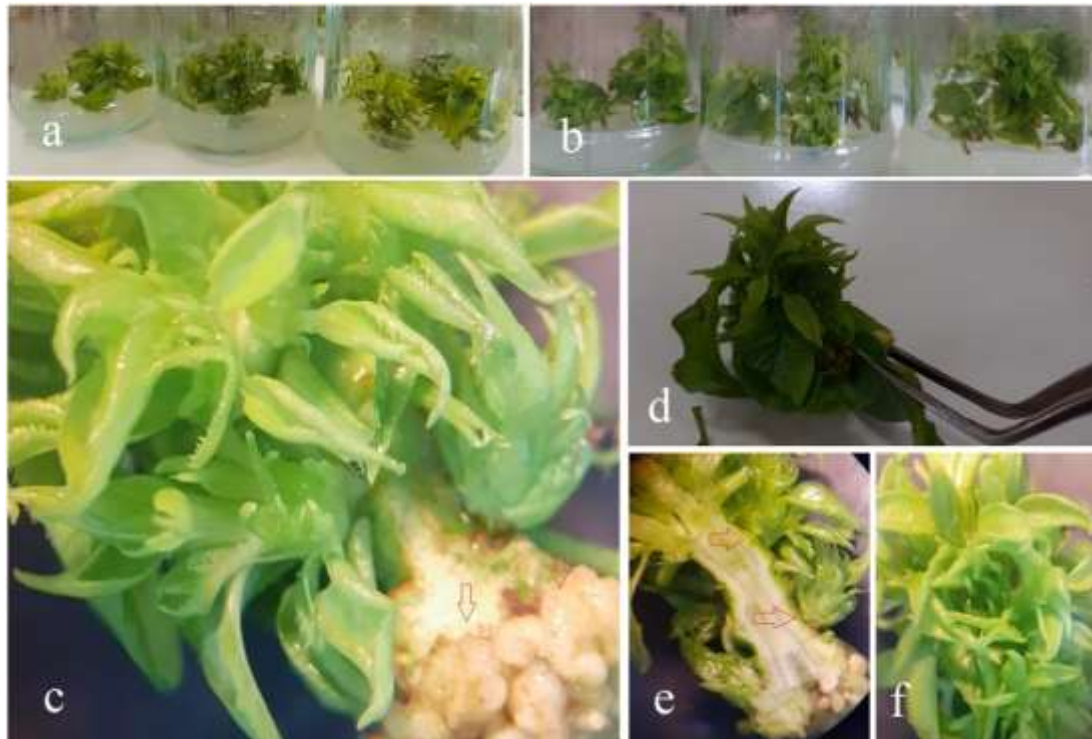
تیمارهای پراوری پایه‌ها به صورت جداگانه آنالیز شدند؛ اما به طور کلی در مقایسه بین پایه‌ها، پایه میروبالان 29C شاخه زایی و رشد بالاتری نسبت به دو پایه دیگر داشت. در پایه GF677 اثر متقابل بین BA و NAA بر تعداد شاخه، تعداد گره و طول شاخه در سطح ۱ درصد و طول میان گره در سطح ۵ درصد معنی‌دار شد. بیشترین تعداد شاخه، تعداد گره و طول شاخه (۴/۷۵ عدد، ۲۰ گره و ۱۲ میلی‌متر) در غلظت ۱ میلی‌گرم در لیتر BA به همراه ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر NAA به دست آمد. بیشترین طول میان گره (۸ میلی‌متر) در تیمار فاقد BA و NAA مشاهده شد. در پایه گارنم اثر متقابل بین هورمون BA و NAA بر تعداد شاخه، تعداد گره، طول شاخه و طول میان‌گره در سطح ۱ درصد معنی‌دار شد. در مورد تعداد شاخه (با

میانگین $5/7$ در غلظت 2 میلی‌گرم در لیتر BA همراه با $0/25$ میلی‌گرم در لیتر NAA مشاهده شد. بیشترین تعداد گره، طول شاخه و طول میان‌گره (12 گره، 9 میلی‌متر و $7/8$ میلی‌متر) در تیمار 1 میلی‌گرم در لیتر BA به همراه $0/25$ میلی‌گرم در لیتر NAA مشاهده شد (جدول ۳ و شکل ۳).



شکل ۳- (a). سیاه شدن قسمتی از نمونه‌های GF677 که در محیط کشت قرار داشته است. (b) نمونه‌های GF677 در محیط کشت DKW بعد از ۴۵ روز. (c) نمونه‌های GF677 در محیط کشت WPM که بعد از ۴۵ روز زرد شده و برگ از دست دادند. (d) نمونه‌های میروبالان 29C کشت شده بعد از ۴۵ روز در محیط کشت DKW.

وضعیت پرآوری و اثر ترکیب تنظیم‌کننده‌های رشد در پایه میروبالان 29C در شکل ۴ دیده می‌شود. در این پایه، اثر متقابل بین BA و NAA بر تعداد شاخه و تعداد گره در سطح 1 درصد معنی‌دار شد و در مورد طول شاخه، NAA در سطح 1 درصد و در مورد طول میان‌گره، BA در سطح 1 درصد معنی‌دار شد. در این پایه، بیشترین تعداد شاخه با میانگین $5/2$ شاخه در هر ریزنمونه؛ در تیمار 1 میلی‌گرم در لیتر BA به همراه $0/25$ میلی‌گرم در لیتر NAA مشاهده شد که با تیمار 2 میلی‌گرم در لیتر BA به همراه $0/1$ میلی‌گرم NAA یا فاقد NAA اختلاف معنی‌داری نداشت. بیشترین تعداد گره ($14/7$) در تیمار 1 میلی‌گرم در لیتر BA همراه با $0/25$ میلی‌گرم در لیتر NAA مشاهده شد (جدول ۳). بالاترین طول شاخه ($19/31$ میلی‌متر) در تیمارهای فاقد NAA و بیشترین طول میان‌گره در تیمارهای فاقد BA به میزان $2/38$ میلی‌متر اندازه‌گیری شد.



شکل ۴- (a) ریزنمونه‌های میروبالان 29C در محیط کشت DKW همراه با ۲ میلی‌گرم در لیتر BA و ۰/۱ میلی‌گرم NAA، (b) ریزنمونه‌های میروبالان 29C در محیط کشت DKW حاوی ۱ میلی‌گرم در لیتر BA به همراه ۰/۲۵ میلی‌گرم در لیتر NAA، (c) ایجاد کالوس در محل ارتباط ریزنمونه با محیط کشت حاوی ۱ میلی‌گرم در لیتر BA به همراه ۰/۲۵ میلی‌گرم در لیتر NAA، (d) رشد ریزنمونه میروبالان 29C در محیط کشت حاوی تنظیم‌کننده‌های رشد پس از ۴۵ روز (e) شاخه‌زایی در اثر غلظت ۱ میلی‌گرم در لیتر BA به همراه ۰/۲۵ میلی‌گرم در لیتر NAA و (f) نمای نزدیک‌تر ریزنمونه با تراکم بالای برگ که برگ‌ها هنوز شکل کاملی به خود نگرفته‌اند.

جدول ۳- تعداد شاخه، تعداد گره، طول شاخه و میان‌گره در پایه‌های GF677، گارنم و میروبالان 29C در محیط کشت منتخب هر یک (MS, MS) و DKW به ترتیب) به همراه غلظت‌های مختلف BA و NAA

میروبالان 29C		گارنم		GF677		غلظت BA		غلظت NAA			
تعداد گره	تعداد شاخه	طول میان‌گره (mm)	طول شاخه (mm)	تعداد گره	تعداد شاخه	طول میان‌گره (mm)	طول شاخه (mm)	تعداد گره	تعداد شاخه		
11.5 b	1 f	0.260 bcd	1.25 c	2.75 cde	1 c	0.80 a	0.5 c	1.75 c	1.0 d	0	0
11.25 bc	4 abc	0.732 ab	7 a	9.25 ab	3.75 b	0.29 bcd	2.0 c	5.5 bc	1.0 d	1	
11.25 bc	4.5 abc	0 d	0 c	0.00 e	1 c	0.37 bcd	3.0 bc	4.25 c	2.25 c	2	
9.75 bcd	3.75 bcd	0.187 cd	0.75 c	1.00 de	1 c	0.29 bcd	0.75 c	1.25 c	1.0 d	3	
3.5 g	1 f	0.495 abcd	5.75 ab	10.0 ab	1.75 c	0.10 cd	2.75 bc	3.75 c	1.25 d	0	0.1
10 bcd	4 abc	0.250 bcd	0.25 c	0.25 e	1 c	0.63 ab	12.0 a	20.25 a	4.75 a	1	
11 bcd	5 ab	0.388 abcd	1.5 c	2.5 de	1.5 c	0.50 abc	5.25 b	10.5 b	3.75 b	2	
9 bcde	3.75 bcd	0 d	0 c	0 e	1 c	0.60 ab	1.5 c	2.0 c	1.5 cd	3	

5.75 efg	1 f	0.250 bcd	0.5 c	1 de	1 c	0.20 bcd	0.75 c	3.0 c	1.0 d	0	0.25
14.75 a	5.25 a	0.787 a	9 a	12 a	4.25 ab	0.26 bcd	1.75 c	4.25 c	1.0 d	1	
7.75 cdef	2.5 def	0.517 abc	5.5 ab	7.75 abc	5.75 a	0.25 bcd	0.5 c	0.5 c	1.0 d	2	
5.25 fg	1 f	0.458 abcd	3.25 bc	5.75 bcd	1.5 c	0.13 cd	0.25 c	0.5 c	1.0 d	3	
7.5 def	1 f	0 d	0 c	1 de	1 c	0.33 bcd	1.0 c	3.0 c	1.0 d	0	0.5
5.75 efg	1 f	0 d	0 c	0 e	1 c	0.00 d	0.0 c	0.0 c	1.0 d	1	
7.5 def	3.5 cde	0.527 abcd	1.75 c	3.25 cde	1.75 c	0.00 d	0.0 c	0.0 c	1.0 d	2	
4.5 fg	2.25 ef	0 d	0 c	0e	1 c	0.125 cd	0.25 c	0.5 c	1.0 d	3	

حروف مشابه در هر صفت در سه پایه نشان دهنده عدم وجود اختلاف معنی‌دار با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح ۵ درصد است.

ریشه‌زایی

اثر متقابل پایه و غلظت IBA بر صفات درصد ریشه‌دهی، طول ریشه، وزن تر و خشک ریشه، درصد وزن خشک و تعداد انشعابات ریشه در سطح ۱ درصد معنی‌دار شد. بیشترین درصد ریشه‌زایی در پایه میروبالان 29C به میزان ۹۵ درصد در غلظت ۱ میلی‌گرم در لیتر مشاهده شد. بیشترین درصد ریشه‌زایی در پایه‌ی گارنم در غلظت ۱ میلی‌گرم در لیتر IBA به میزان ۷۰ درصد به دست آمد اما در پایه‌ی GF677 بیشترین درصد ریشه‌زایی در غلظت ۲ میلی‌گرم در لیتر IBA به مقدار ۴۱/۶ درصد مشاهده شد. غلظت‌های ۱ یا ۲ میلی‌گرم در لیتر IBA سبب ایجاد طویل‌ترین ریشه‌ها در هر سه پایه شدند (جدول ۴). بیشترین وزن تر و خشک در پایه میروبالان 29C و گارنم در غلظت‌های ۱ و ۲ میلی‌گرم در لیتر به دست آمدند و در پایه GF677 این مولفه در غلظت ۱ میلی‌گرم در لیتر IBA بیشترین میزان بود (جدول ۴).

جدول ۴- اثر غلظت IBA بر صفات مرتبط با ریشه‌زایی ریزنمونه‌های شاخه پایه‌های GF677، میروبالان 29C و گارنم در محیط کشت نیم غلظت

MS							
پایه	غلظت IBA	ریشه دهی (درصد)	طول ریشه (mm)	وزن تر ریشه (mg)	وزن خشک ریشه (mg)	وزن خشک (درصد)	تعداد انشعاب
GF677	0	0.0 f	0.0 e	0.0 d	0.0 d	0.00 c	0.0 f
	0.5	6.7 f	1.6 e	1.3 d	0.1 d	3.25 c	0.3 f
	1	25 e	53.6 cd	74.9 bc	7.8 bc	10.51 ab	3.6 de
	2	41.6 d	34.3 d	43.3 c	4.3 cd	10.52 ab	2.3 ef
گارنم	0	0.0 f	0.0 e	0.0 d	0.0 d	0.00 c	0.0 f
	0.5	58.3 c	84.0 b	87.5 b	11.9 b	13.63 a	5.7 cd
	1	70.0 bc	153.6 a	180.6 a	23.1 a	12.79 ab	11.0 b
	2	65.0 c	149.6 a	184.2 a	25.1 a	13.43 a	14.0 ab
میروبالان 29C	0	3.3 f	6.0 e	7.0 d	0.8 d	7.96 b	1.0 ef
	0.5	65.0 c	68 bc	82.3 b	9.9 bc	12.01 ab	7.0 c
	1	95.0 a	145.6 a	175.6 a	19.8 a	11.28 ab	12.6 b
	2	78.3 b	144.3 a	177.2 a	21.2 a	12.3 ab	17.0 a

حروف مشابه در هر ستون به معنی عدم وجود اختلاف معنی‌دار با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح ۵ درصد است.

هیچگونه ریشه‌زایی در پایه‌های گارنم و GF677 در عدم حضور IBA مشاهده نشد اما در مراحل مختلف آزمایش، ریشه‌زایی پایه میروبالان 29C در محیط فاقد IBA دیده شد. بالاترین درصد ریشه‌زایی در پایه میروبالان 29C و در غلظت ۱ میلی‌گرم در لیتر IBA به دست آمد (جدول ۴).

استقرار در محیط کشت حاوی نانولوله های کربنی

بالاترین وزن تر و خشک در ریشه، ساقه، برگ و جوانه در نمونه‌های مواجه با ۵۰ میلی‌گرم در لیتر MWCNs مشاهده شدند. در مقابل در نمونه‌هایی که گیاه در مواجهه با غلظت‌های بالاتری از MWCNs قرار داشت وزن تر کاهش یافت (جدول ۵). با توجه به یافته‌های این پژوهش مشخص گردید که غلظت پایین MWCNs (۵۰ میلی‌گرم در لیتر) می‌تواند اثرات مثبتی بر رشد و نمو گیاه داشته باشد. اما با بالاتر رفتن غلظت، اثرات منفی مختلفی در رشد و فیزیولوژی گیاه به وجود می‌آید (شکل ۵)



شکل ۵- نمونه برگ پایه میروبالان 29C در محیط کشت DKW بدون نانولوله‌های کربنی (a) و تیمار ۲۵۰ میلی‌گرم در لیتر نانولوله‌های کربنی (b). نمونه برگ در تیمار ۲۵۰ میلی‌گرم در لیتر نانولوله‌های کربنی، پیکان نشان دهنده اختلال در رشد و تکامل برگ است.

جدول ۵- اثر غلظت نانولوله‌های کربنی چند جداره بر وزن تر و خشک و درصد آب بافتی ریز نمونه پایه میرو بالان کشت شده در محیط DKW در مرحله استقرار.

غلظت نانولوله	وزن تر ریشه (mg)	وزن خشک ریشه (mg)	وزن تر ساقه (mg)	وزن خشک ساقه (mg)	وزن تر برگ (mg)	وزن خشک برگ (mg)	وزن تر جوانه (mg)	وزن خشک جوانه (mg)	وزن تر کل (mg)	وزن خشک کل (mg)	درصد آب بافت کل	درصد آب بافت جوانه	درصد آب بافت برگ	درصد آب بافت ساقه	درصد آب بافت ریشه	درصد آب بافت کل
0	36.6	8.3	53.3	16.3	118	21	21.6	8.3	223	54	70.3	63.4	77.4	69	25.7	70.3
20	56	6.3	56.6	14	192	34	34.3	4.3	339	58	82.8	76.7	81.4	75.2	59.1	82.8
50	519.6	88	81.3	21.3	479.6	79	126.6	23.3	1207	210	82.5	82.2	83.5	73.7	82.9	82.5
100	123.6	13.6	50.6	11.3	348.3	50	19	1.3	541	76	85.8	93.1	85.4	77.5	88.8	85.8

⁸multi-walled carbon nanotubes

a	b	a	ab	ab	a	c	ab	ab	c	b	b	b			
86.3	48 b	352	91.6	86.7	81.4	88.5	1.3	15.6	32 b	241.6	9.6	52 b	5 b	42.6	250
a		bc	a	a	a	a	c	c		bc	c	b		b	

حروف مشابه در هر ستون به معنی عدم وجود اختلاف معنی‌دار با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح ۵ درصد است.

اثر غلظت‌های مختلف MWCNs بر طول شاخه، تعداد گره، طول میان‌گره، سطح برگ، طول ریشه و تعداد انشعابات ریشه در سطح یک درصد معنی‌دار شد. همچنین تجمع MWCNs در سطح ریشه نیز مشاهده شد (شکل ۶).



شکل ۶- سمت راست انسداد آوند به دلیل شکل‌گیری کالوس در ریزنمونه میروبلان 29C در محیط کشت DKW حاوی BA و NAA، سمت چپ تجمع نانو ذرات روی دیواره ریشه پایه میروبلان 29C در محیط یک دوم MS همراه با غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر MWCNs

بیشترین طول شاخه، طول میان‌گره، سطح برگ و طول ریشه (۷/۸ سانتی‌متر، ۴ میلی‌متر، ۱۷ سانتی‌متر مربع و ۱۷/۳ سانتی‌متر) در غلظت ۵۰ میلی‌گرم در لیتر مشاهده شد. این تیمار در مورد صفات تعداد گره و انشعابات ریشه نیز بیشترین مقادیر را ایجاد نمود (شکل ۷ و جدول ۶).



شکل ۷- تفاوت در رشد ریشه و ساقه و برگ ریز نمونه های پایه میکروبالان 29C در محیط کشت DKW همراه با غلظت‌های ۲۰ و ۵۰ میلی گرم در لیتر MWCNT (به ترتیب از راست و چپ) ۴۵ روز پس از کشت. در شکل رشد بیشتر ریز نمونه در تیمار حاوی غلظت‌های بالاتر MWCNT قابل مشاهده است.

جدول ۶- اثر غلظت‌های مختلف MWCNs بر طول شاخه، تعداد گره، طول میان‌گره، سطح برگ، طول ریشه و تعداد انشعابات ریشه پایه میکروبالان

29C						
غلظت نانولوله (میلی گرم / لیتر)	طول شاخه (میلی متر)	تعداد گره	طول میان‌گره میلی متر	سطح برگ (سانتی متر مربع)	طول ریشه (میلی متر)	انشعابات ریشه
0	23.3 d	11.3 b	2.18 b	8.39 c	32.6 b	7.6 b
20	33.2 c	14 ab	2.37 b	6.54 c	49 b	10.3 b
50	78.5 a	19.3 a	4.09 a	17.04 a	173.6 a	38.6 a
100	45.2 b	18 a	2.54 b	12.36 b	89.6 b	26.3 ab
250	23.3 d	10.6 b	2.19 b	5.36 c	37.6 b	13.6 b

حروف مشابه در هر ستون به معنی عدم وجود اختلاف معنی‌دار با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح ۵ درصد است.

بحث و نتیجه گیری

در پژوهش‌های پیشین غلظت ۱/۵ درصد هیپوکلریت سدیم به عنوان غلظتی مناسب برای یکی از پایه‌های رویشی درختان میوه استفاده شده است (۴۲). مدت زمان مواجهه با این غلظت می‌تواند اثرات مفیدی در کنترل آلودگی یا به عکس تخریب ریزنمونه‌ها داشته باشد که این موضوع می‌تواند به ژنوتیپ و نوع ریزنمونه مرتبط باشد.

با توجه به داده‌های برگ سبز و فعال می‌توان چنین نتیجه گرفت که زمان مناسب برای واکنش ریزنمونه‌ها و یا داده‌برداری برای صفات رشدی در ارقام مورد بررسی حداکثر ۴۵ روز پس از کاشت است، چرا که ریزنمونه‌ها بیشترین رشد در یک مرحله کشت را، در این زمان دارند و پس از آن به سرعت به سمت از دست‌دهی برگ و خشکی پیش می‌روند. در بین ارقام مورد بررسی به طور کلی پایه میکروبالان 29C بیشترین مقدار برگ سبز و فعال را در تمام مراحل استقرار داشت (جدول ۲) که احتمالاً همین مساله به این پایه کمک کرد تا در شرایط درون شیشه بیشترین میزان رشد را داشته باشد به نحوی که در پایان، بیشترین طول نهایی شاخه را پایه میکروبالان 29C داشت.

مشاهده بلورهای چند وجهی در سلول‌های بافت پارانشیم ساقه ممکن است به غلظت عناصر در دسترس ریزنمونه، مربوط باشد که ریزنمونه از آن به عنوان مکانیسمی برای کم کردن اثرات منفی غلظت بالای عناصر محیط کشت بهره برده باشد. این موضوع در پایه میکروبالان 29C و در هر سه محیط کشت قابل مشاهده بود؛ اما در بافت پارانشیم گیاه مادری (قبل از کشت بافت) این مورد مشاهده نشد که بیانگر این است که احتمالاً ایجاد بلورها به دلیل وجود محیط کشت بوده است. نکته‌ی دیگری که در ارتباط با این بلورها وجود داشت ابعاد آن‌ها بود که بلورهای نمکی که نزدیک‌تر به بخش آوندی بودند کوچک‌تر و بلورهایی که به سمت بیرونی پوست بودند بزرگ‌تر بودند. در منابع توضیحی در مورد چگونگی شکل‌گیری این بلورهای نمکی یا تاثیر این فرآیند در این پایه یا سایر گونه‌های گیاهی نزدیک مطرح نشده است و برای روشن شدن علت و مکانیسم این امر نیاز به بررسی‌های بیشتر وجود دارد.

تفاوت در رشد و نمو ریزنمونه‌های پایه میروبالان 29C و GF677 در شرایط درون شیشه بسیار زیاد بود (شکل‌های ۲ و ۳) و علت این تفاوت را می‌توان به توقف رشدی که در پایه GF677 رخ می‌دهد، نسبت داد. همانطور که در شکل ۲ نیز مشخص است پوست ریزنمونه‌های پایه‌ی GF677 مدتی پس از قرارگیری در محیط کشت قهوه‌ای شدند. این قهوه‌ای شدن پوست فقط در قسمت‌هایی است که به صورت مستقیم با محیط کشت در ارتباط بودند. این قهوه‌ای شدن احتمالاً نشان‌دهنده آسیب سلولی در این نواحی است که می‌تواند مانعی برای رشد و توسعه ریزنمونه باشد. برای تعیین علت این قهوه‌ای شدن در ابعاد سلولی نیاز به پژوهش‌های دقیق‌تری با این رویکرد وجود دارد.

تفاوت میزان رشد سه پایه میروبالان 29C، گارنم و GF677 در شکل ۳ قابل مشاهده است. در این پژوهش مناسب‌ترین محیط کشت برای استقرار پایه میروبالان 29C؛ محیط کشت DKW بود. این نتایج با مطالعه شعبانی و همکاران (۳) مطابقت دارد، که در آن مشاهده شد، محیط کشت‌های MS و DKW محیط مناسبی برای پایه استقرار پایه میروبالان 29C می‌باشند. آن‌ها بیش‌ترین درصد بقای گیاهچه در محیط کشت DKW حاوی یک میلی‌گرم در لیتر NAA را گزارش کردند (۳). برای پایه‌های گارنم و GF677 نیز محیط کشت MS بهترین استقرار و رشد را ایجاد نمود.

عملکرد تنظیم‌کننده‌های رشد مختلف بر عملکرد ریزنمونه به عوامل متعددی از جمله ژنوتیپ و نوع ریزنمونه مورد استفاده بستگی دارد. همانگونه که از نتایج مشخص است BA سبب افزایش تعداد شاخه در ریزنمونه‌ها شد اما در غلظت ۳ میلی‌گرم در لیتر به حالت سمیت رسیده و سبب کاهش شاخه‌زایی در این پایه‌ها نسبت به غلظت‌های پایین‌تر خود (یعنی ۱ و ۲ میلی‌گرم در لیتر) شده است و می‌توان این غلظت را به عنوان آستانه‌ای برای کاربرد آن در نظر گرفت. این آستانه می‌تواند برای گیاهان مختلف و سیتوکینین‌های مختلف متفاوت باشد. به عنوان مثال در مطالعه‌ای روی ساقه گیاه زردآلو در شرایط درون شیشه‌ای مشاهده شد که هر سه سیتوکینین TDZ، BAP و mT به همراه هورمون NAA باعث افزایش رشد اندام هوایی شدند؛ اما بین غلظت‌های مورد استفاده TDZ و BAP تفاوت معنی‌داری وجود داشت، در حالی که در مورد mT، غلظت، تاثیر معنی‌داری بر بازسازی اندام هوایی نداشت. در این پژوهش، بیشترین افزایش وزن اندام هوایی در محیط حاوی ۱ میلی‌گرم در لیتر BAP به همراه ۱ میلی‌گرم در لیتر هورمون NAA به دست آمد (۴۶). مطالعات انجام شده روی شاخه‌زایی گیاه بلوبری^۹ نشان داد که محیط کشت WPM برای رقم فرتینگ در دو غلظت ۶ و ۸ میلی‌گرم در لیتر BAP تعداد شاخه‌ی بیشتری ایجاد شد. همچنین برای رقم لوگسی، محیط کشت WPM همراه با ۴ میلی‌گرم در لیتر BAP محیطی ایده آل برای ریزنمونه نوک ساقه یا دو گره بود (۲۶).

در پژوهشی که شعبانی و همکاران (۳) انجام دادند پایه میروبالان 29C در غلظت‌های بالای BAP و NAA به ترتیب از شاخه‌زایی و درصد ریشه‌زایی پایینی برخوردار بودند و بیشترین ضریب تکثیر به میزان ۳/۴۱ شاخه در محیط کشت MS حاوی ۲ میلی‌گرم در لیتر BAP و کمترین میزان آن یعنی ۰/۵۹ شاخه در محیط کشت QL با سه میلی‌گرم در لیتر BAP گزارش شد.

با توجه به مشاهدات انجام گرفته می‌توان پایه میروبالان 29C را به عنوان پایه‌ی نسبتاً سهل تکثیر معرفی نمود که به راحتی استقرار یافته و قادر به پرآوری شاخه و ریشه‌زایی است. در مقابل در بین ارقام مورد بررسی پایه GF677 به دلیل حساسیت بالاتر تکثیر سخت‌تری داشت و به سرعت برگ‌های خود را از دست می‌داد. پایه گارنم نیز با وجود این که در برخی صفات

^۹ *Vaccinium corymbosum* L.

به طور میانگین از پایه GF677 ضعیف‌تر بود اما شاخه‌زایی بالاتری داشت و در محیط کشت مدت زمان بیشتری به رشد خود ادامه داد.

در ارتباط با ریشه‌زایی، با مطالعه گیاه هلو، نتایج نشان داد که در غلظت‌های مشابه IBA تعداد ریشه و طول ریشه بیشتری را نسبت به NAA در تمام غلظت‌های مورد مطالعه ایجاد کرده است (۹). در پژوهش شعبانی و همکاران (۳)، بیشترین درصد ریشه‌زایی (۱۰۰ درصد) در محیط DKW با یک میلی‌گرم در لیتر NAA به دست آمد و کمترین درصد ریشه‌زایی (۱/۴۹ و ۲ درصد) در محیط QL و DKW فاقد هورمون به دست آمد. براساس نتایج، استقرار پایه‌ی GF677 در شرایط درون شیشه دشوار بود (جدول ۲) همچنین تفاوت بسیار زیادی در رشد و نمو ریزنمونه‌های پایه میروبالان 29C و GF677 در شرایط درون شیشه مشاهده شد (شکل‌های ۲ و ۳)، ریشه‌زایی نیز به کمک غلظت‌های بالاتری از ایندول بوتریک اسید انجام شد و در این پایه در بهترین حالت نسبت به پایه میروبالان 29C ریشه‌زایی کمتری به دست آمد، که می‌توان با توجه به این موضوع، پایه GF677 را پایه‌ای نسبتاً سرسخت در نظر گرفت (شکل ۲). تفاوت ریشه‌زایی بین پایه GF677 و میروبالان 29C فرضیه‌ی وجود سطوح بالاتر هورمون‌های درونی در پایه میروبالان 29C نسبت به پایه GF677 را تقویت می‌کند.

در مورد کاربرد نانو لوله‌های کربنی، به نظر می‌رسد علاوه بر نوع گیاه، غلظت MWCNs نیز اهمیت زیادی در واکنش مشاهده شده به این مواد دارد. چرا که هنگامی که غلظت‌های پایین‌تر آن‌ها استفاده می‌شود، نانو مواد در افزایش جذب و انتقال آب، جوانه‌زنی بذر، فعالیت نیتروژناز، فتوسنتز و فعالیت آنتی‌اکسیدانی، فعال‌کردن پروتئین‌های کانال آب و بهبود جذب عناصر موثر هستند. اما با افزایش غلظت، همه این اثرات تغییر می‌کنند (۳۵، ۵۲) و می‌توانند در غلظت بالاتر برای گیاه ایجاد سمیت نمایند که این مساله در پژوهش‌های پیشین گزارش شده است.

در این پژوهش با افزایش غلظت MWCNs از ۵۰ میلی‌گرم در لیتر، وزن تر و خشک اندام‌های گیاهی و وزن کل ریزنمونه کاهش یافت (جدول ۵). این موضوع می‌تواند به آسیب فیزیکی ترکیبات نانو در غلظت‌های بالا، بر رشد و نمو ریزنمونه‌ها ارتباط داشته باشد. این مساله در پژوهش‌های دیگر نیز به اثبات رسیده است. به عنوان مثال دنگ و همکاران (۱۷) بیان کردند تعاملات نانوذرات با گیاهان ممکن است باعث مسمومیت مستقیم و آشکار با توجه به علائم مورفولوژیکی، فیزیولوژیکی و مولکولی شود. مطالعات اولیه در مسمومیت گیاهی توسط نانوذرات بر مورفولوژی و پارامترهای تشریحی مانند شاخص جوانه‌زنی بذر، طول ریشه، نسبت ساقه به ریشه، بیومس و مورفولوژی ریشه متمرکز شده است (۳۱، ۳۲، ۵۶). در این پژوهش نیز اثرات منفی در غلظت‌های بالای MWCNs (۲۵۰ میلی‌گرم در لیتر) از جمله رشد نامناسب بعضی برگ‌ها و ریز شدن آن‌ها دیده شد (شکل ۵).

MWCNs می‌توانند در غلظت‌های پایین‌تر به عنوان محرک در فرایندهای فیزیولوژیکی تاثیر داشته باشد. تاثیر مثبت نانو مواد به دلیل ویژگی‌های منحصر بفرد آن‌ها از جمله سطح شیمیایی، نوع پیوست و بیوفیزیک آن در ارتباط است که در پژوهش کوچیبهاتلا و همکاران (۲۸) به این مساله تاکید شده است. مطالعات انجام شده بر گیاه خردل هندی (*Brassica juncea*) نیز نشان داد که نانولوله‌های کربنی و نانوذرات SiO₂ در غلظت‌های پایین، بر طول دمبرگ و تعداد دانه تاثیر مثبت داشتند اما در غلظت‌های بالاتر نانو مواد مورد استفاده، تغییرات معنی‌دار منفی بر طول برگ، عملکرد بیولوژیکی و شاخص برداشت، مشاهده شد. نانوذرات مختلف پس از برهم‌کنش با گونه‌های مختلف گیاهی، رفتار متفاوتی دارند که بر پیچیدگی درک فرآیند تاثیر آن‌ها اضافه می‌کند (۱۷).

اثرات مثبتی که در غلظت پایین نانو ذرات مشاهده می‌شود (شکل ۷) می‌تواند ناشی از تسهیل جذب و انتقال آب به ریزنمونه‌ها باشد چرا که ریزنمونه‌ها پس از مدتی قرارگیری در محیط کشت دچار انسداد آوندی و یا تشکیل کالوس (شکل ۶) در محل برش می‌شوند که این امر موجب می‌گردد جذب و انتقال آب و املاح مختل گردد و احتمالاً نانو لوله‌های کربنی می‌توانند با ایجاد کانال‌هایی در طول این محل‌های مسدود شده به جذب و انتقال آب و املاح کمک می‌کنند.

کاهش وزن و اثرات منفی ناشی از غلظت بالای نانو ترکیبات، به دلیل آسیب‌های فیزیکی است که این ترکیبات در سطح سلولی ایجاد می‌کنند. در مطالعه تن و فوگستسو (۴۹) مشاهده شد که نانولوله‌های کربنی چند دیواره، چگالی سلولی را در سوسپانسیون سلولی برنج کاهش دادند. در غلظت‌های مختلفی از MWCNs، مرگ سلولی گزارش شده است؛ که در غلظت‌های پایین، به طور غالبی به علت آپوپتوز و ایجاد اجسام آپوپتوتیک از سلول و در غلظت‌های بالا، مربوط به نکروزه شدن بود؛ که با نشت محتوای سیتوپلاسمی و تخریب غشاء تشخیص داده شد (۴۹). با توجه به این مطالب علت اختلالات مورفولوژیکی (شکل ۵) می‌تواند ناشی از آسیب در سطوح سلولی باشد.

در مقابل سمیت، گزارش‌هایی از غلظت مناسب و نحوه‌ی تاثیرگذاری مثبت این ترکیبات بر رشد و نمو وجود دارد به عنوان نمونه وانگ و همکاران (۵۴) گزارش کردند که نانولوله‌های کربنی چند جداره‌ی اکسید شده، به طور قابل توجهی اندازه سلول‌ها در سیستم ریشه‌ای را در گیاه گندم افزایش داده، و نیز رشد ساقه و ریشه را بهبود بخشیدند. این تاثیر ممکن است در نتیجه جذب و پس از آن تجمع و پس از آن حرکت نانولوله‌های کربنی از ریشه به برگ باشد (۴۷). همچنین نانولوله‌ی کربنی چند جداره قادرند ظرفیت نگهداری آب و بیومس، گل‌دهی و بازدهی میوه را در گوجه‌فرنگی بهبود بخشند (۲۷). براساس نتایجی که توسط لاهیانی (۲۹) گزارش شده، قرار گرفتن سه محصول زراعی جو، سویا و ذرت در معرض MWCNs، موجب افزایش جوانه‌زنی و رشد گیاه شده است، که به علت بیان بالای ژن‌های کدکننده انواع مختلفی از پروتئین‌های کانال‌ها می‌باشد. این پژوهشگران به این نتیجه رسیدند که نانولوله‌های کربنی می‌توانند به عنوان تنظیم‌کننده‌های رشد برون‌زا برای گیاهان خاص، استفاده شوند (۲۹). آزمایش ویلاگاریا و همکاران (۵۳) نیز نشان داد که نانولوله‌های کربنی با تنظیم بیان ژن‌های موثر در تقسیم سلولی و بیان ژن‌های دیواره سلولی در سلول‌های تیمار شده، منجر به رشد سریع‌تر نسبت به سلول‌های شاهد شده‌اند.

مطالعات انجام شده روی گیاه یاس نشان داد که استفاده از نانومواد مانند نانولوله‌های کربنی تأثیر عمیقی بر رشد گیاه در یاس دارد. نتایج این مطالعه، مزایای نانولوله‌های کربنی را برای ارتقای رشد گیاه یاس تایید کرده است (۵۰). تأثیر نانولوله‌های کربنی چند جداره در غلظت‌های ۱، ۱۰، ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر را روی پارامترهای مورفولوژیک دو گیاه (*Betula pubescens* Ehrh, و *B. pendula* Roth) در شرایط گلخانه‌ای هم نشان داد که این نانوذره زیست‌توده خشک برگ را در غلظت ۱۰ میلی‌گرم در لیتر ۳۰ درصد، ساقه ۴۲ درصد و ریشه ۴۹ درصد افزایش داد. اما در عین حال، مشاهده شد که استفاده از نانوذرات ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر منجر به کاهش پارامترهای مورد مطالعه در *Betula pendula* شد که (۵۷) مشابه چیزی که در این پژوهش در مورد پایه‌های رویشی مشاهده شد.

در پژوهش زراعی و همکاران (۲)، محیط پایه MS حاوی IBA به ترتیب ۲ و ۴ میلی‌گرم در لیتر برای دو گیاه انگور و پالونیا، همراه با غلظت‌های مختلف زغال فعال و نانولوله کربنی (۴۰۰، ۲۰۰، ۱۰۰، ۵۰، ۰ میلی‌گرم بر لیتر)، مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که هر دو فرم زغال فعال و نانولوله کربن بر میزان جذب فنول محیط کشت و پرآوری ریزنمونه‌های درون شیشه‌ای اثرات مثبت و معنی‌دار داشت. بیشترین تعداد ریشه در ۴۰۰ میلی‌گرم بر لیتر نانولوله کربن مشاهده شد.

بلندترین طول ساقه در ۲۰۰ میلی‌گرم بر لیتر نانولوله کربنی مشاهده شد. اما در گیاه پالونیا در غلظت‌های کم نانولوله کربن، تعداد ریشه بیشتری مشاهده شد. حداقل تعداد ریشه در ۲۰۰ میلی‌گرم بر لیتر نانولوله‌های کربن و حداکثر در ۵۰ میلی‌گرم بر لیتر نانولوله کربنی مشاهده شد.

دلایل مختلفی در پژوهش‌ها برای اثر مثبت نانولوله‌های کربنی بر رشد و نمو گیاه گزارش شده است. در مطالعات انجام شده روی گونه‌ای از جنس مالوس شواهدی ارائه شده که نشان می‌دهد نانولوله‌های کربنی فتوسنتز و سنتز محصولات فتوسنتزی را ارتقا می‌دهند و منجر به افزایش محتوای سوربیتول در برگ‌های این گونه شد. محلول پاشی ۱۰ و ۲۰ میلی‌گرم در لیتر نانولوله‌های کربنی باعث افزایش محتوای کلروفیل، سرعت خالص فتوسنتز، هدایت روزنه ای و سرعت تعرق شد (۵۵). در پژوهشی روی گیاه نیشکر (*Saccharum spp.*) در غلظت‌های مختلف (۰، ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر) MWCNs نتایج حاکی از آن بود که استفاده از نانولوله‌های کربنی چند جداره در غلظت‌های پایین، اثرات فیزیولوژیکی مطلوبی بر رشد در مرحله تکثیر آزمایشگاهی نیشکر داشت و باعث افزایش رشد شاخساره نیشکر در غلظت‌های ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر MWCNs شد (۴۸).

در مطالعه انجام شده توسط عبدالعلی پور و همکاران (۴) مشاهده شد که نانولوله‌های کربنی اثر مثبتی بر پرآوری سبب گوشت قرمز و مالینگ مرتون داشته است که در سه غلظت ۰، ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر نانولوله‌های کربنی اثر سمی مشاهده نشد و در این پژوهش نانولوله‌های کربنی باعث افزایش تعداد برگ و طول میان‌گره موجب بهبود پرآوری ریزنمونه‌های تیمار شده نسبت به شاهد شده است که با نتایج این پژوهش همخوانی دارد. مطالعاتی به منظور بررسی پاسخ‌های فیزیولوژیکی و مولکولی پرپوش (*Catharanthus roseus*) به MWCNs موجود در محیط کشت انجام شده که محیط کشت حاوی نانولوله کربنی چند جداره منجر به افزایش قابل توجهی در شاخص‌های رشد گیاه مانند عرض برگ، سطح برگ، وزن تر برگ، طول ریشه و زیست توده کل گیاه شد (۲۲). در پژوهش حاضر نیز سطح برگ و وزن تر و خشک برگ تحت تاثیر غلظت ۵۰ میلی‌گرم در لیتر نانولوله کربنی افزایش یافته است.

رشد سریع‌تر و بیش‌تر در تیمارهای متوسط MWCNT (شکل ۷) می‌تواند ناشی از جذب آسان‌تر عناصر، از محیط کشت باشد. تیواری و همکاران (۵۱)، اثر MWCNTs را روی نهال‌های گوجه‌فرنگی بررسی کردند و دریافتند که در غلظت ۴۰ میلی‌گرم در لیتر، جذب عناصر غذایی ضروری افزایش می‌یابد که در نهایت منجر به افزایش رشد و زیست‌توده می‌شود. در پژوهش محمدپور و همکاران (۶) کاربرد نانولوله‌های کربنی با غلظت‌های ۲۵ و ۷۵ میلی‌گرم در لیتر به صورت معنی‌داری باعث بهبود ویژگی‌های موفولوژیکی و زیست‌توده در دو گونه پسته وحشی شامل بنه و خینجوک در مقایسه با سایر تیمارها شد. بیشترین افزایش در طول ریشه، ارتفاع ساقه و طول یقه در گونه بنه در تیمار ۲۵ میلی‌گرم در لیتر مشاهده شد. در گونه خینجوک، بیشترین میزان طول ریشه و وزن خشک و تر ریشه در تیمار ۷۵ میلی‌گرم در لیتر نانوکربن ثبت شد. رشد ریشه، ساقه و برگ در نمونه‌هایی که غلظت متوسطی (۵۰ میلی‌گرم در لیتر) از MWCNs را در دسترس داشتند، بیشتر از سایر تیمارها بود. جدا از اندازه نهایی ریشه در تیمار ۵۰ میلی‌گرم در لیتر MWCNs، رشد سریع‌تر ریشه در مراحل اولیه کشت در این تیمار نیز مشاهده شد که این موضوع این مزیت را برای ریزنمونه دارد که آن را قادر می‌سازد تا املاح موجود در محیط کشت را به شکل مناسب‌تری از تمام نقاط شیشه کشت جذب نماید و رشد ساقه و برگ را تسریع کند.

به طور کلی موفقیت مراحل مختلف ریز ازدیادی شامل ضد عفونی، استقرار، پرآوری شاخه، ریشه‌زایی و سازگاری به میزان بسیار بالایی به ژنوتیپ گیاه مادری وابسته است؛ به این دلیل که پایه در مراحل ریز ازدیادی تاثیر معنی‌داری بر صفات

مورد ارزیابی و موفقیت آن مرحله داشته است. استفاده از نانو لوله های کربنی در غلظت پایین می تواند به ریزنمونه ها کمک کند تا جذب آب و املاح بیشتری داشته باشند. این مساله به دلیل این است که نانو لوله های کربنی می توانند مسیری برای انتقال آب و نمک ها و ویتامین های محلول در آن ایجاد کنند تا گیاه در شرایطی که دچار اختلال در جذب می شود (به دلیل بسته شدن آوندها یا ایجاد کالوس) بتواند به کمک این مسیرها به جذب مواد موجود در محیط کشت ادامه دهد.

سپاسگزاری

این پژوهش از محل گرنت دانشگاه بوعلی سینا حمایت مالی شده است که بدین وسیله تشکر و قدردانی می گردد.

منابع

- ۱- احمدی، ک.، قلیزاده، ح.، عبادزاده، ح.، حاتمی، ف.، حسینپور، ر.، کاظمی فرد، ر. و عبدشاه، ه. (۱۳۹۵) آمارنامه کشاورزی سال زراعی ۹۴-۹۳. وزارت جهاد کشاورزی. ۲۴۰ صفحه.
- ۲- زارعی، م.، غلیزاده، م.، خراسانی نژاد، س. و خوشحال سرمست م. (۱۴۰۲). کاربرد زغال فعال و نانولوله های کربنی در حذف مواد فنولی از محیط کشت بافت گیاهان انگور و پالونیا. *مجله پژوهش های گیاهی (مجله زیست شناسی ایران)* ۳۶(۱): ۴۶-۶۱.
- ۳- شعبانی، ز.، عابدی، ب.، گنجی مقدم، ا. و تهرانی فر، ع. (۱۳۹۷) افزایش انبوه درون شیشه ای میروبالان 29 C (*Prunus cerasifera* L.): یک پایه رویشی برای میوه های هسته دار. نشریه پژوهش های تولید گیاهی، ۲۶ (۳): ۱۶۷-۱۷۷.
- ۴- عبدالعلی پور، م.، دادپور، م.، افتخاری سیس، ب. و مطلبی آذر، ع. (۱۴۰۰) تأثیر نانوذرات کربنی بر ویژگی های فیزیولوژیکی سیب گوشت قرمز و مالینگ مرتون. *مطالعات علوم محیط زیست*، ۷ (۱): ۴۶۸۸ - ۴۹۹۶.
- ۵- گنجی مقدم، ا. و عبدالله زاده، ا. (۱۳۸۷) راهنمای پایه های درختان میوه (سیب، گلابی، گیلان و آلو). سروا. ۱۹۰ صفحه. ترجمه.
- ۶- محمدپور، ف.، قاسمی آقباش، ف.، زرافشار، م.، قنبری، ا. (۱۴۰۰). اثر پیش تیمار بذر با نانولوله های کربنی بر عملکرد رشد دو گونه پسته وحشی (*P. khinjuk Stocks & Pistacia atlantica* Desf). فصلنامه علمی زیست شناسی کاربردی دانشگاه الزهراء، ۳۴ (۴): ۱۶۴-۱۷۹.
- ۷- منصوریار، م.، عرفانی مقدم، ج.، عبداللهی، ح. و سلامی، س.ع. (۱۳۹۵). بهینه سازی روش ریزازدیادی درون شیشه ای برخی پایه های پر رشد گلابی. *علوم باغبانی ایران* ۴۷ (۲): ۳۶۱-۳۷۰.
- ۸- مینایی، س.، اصغری زکریا، ر.، زارع، ن. و خضری، م. (۱۴۰۲). بررسی تأثیر نانومحرک ها بر رشد سلولی و برخی ویژگی های بیوشیمیایی آن در کشت سوسپانسیون سلولی گیاه دارویی شیرین بیان سا (*Galega officinalis* L.). *مجله پژوهش های گیاهی (مجله زیست شناسی ایران)* ۳۶ (۳): ۳۱۶-۳۳۱.

- 9- Al Ghasheem, N., Stănică, F., Peticilă, A. G., Venat, O., Butcaru, A., Al-Suwaid, I., ... & Alghasheem, K. (2022). *in vitro* impact of concentration and addition methods of plant hormones on peach (*Prunus persica* L. Batsch) micrografting. *Scientific Papers. Series B. Horticulture*, 66(2), 11-18.
- 10- Alikhani Mehrjardi, H. A., Jonoubi, P., Majd, A., & Haji Hosseini, R. (2022). Effects of Multi-Wall Carbon Nano Tube (MWCNT) on *Nepeta cataria* and *Salvia sclarea* *in vitro* culture. *Iranian Journal of Plant Physiology*, 12(4), 4339-4346.
- 11- Arab, M. M., Yadollahi, A., Shojaeiyan, A., & Ahmadi, H. (2016). Artificial neural network genetic algorithm as powerful tool to predict and optimize *in vitro* proliferation mineral medium for G×N15 rootstock. *Frontiers in Plant Science*, 7, 1526.
- 12- Arab, M. M., Yadollahi, A., Shojaeiyan, A., Shokri, S., & Ghoghah, S. M. (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.
- 13- Bani, S. H. S., Shaaban, L., & Al-Mizory, M. (2017). Effect of media cultures and benzyladenine (BA) concentrations in micropropagation of three types of cherry rootstock (establishment and multiplication). *The Iraqi Journal of Agricultural Science*, 48, 113.
- 14- Correia, M., Lopes, T., Puga, A. P., Pinto, G., Canhoto, J., & Correia, S. (2023). Morphophysiological evaluation of *Solanum betaceum* Cav. *in vitro* cloned plants: A comparison of different micropropagation methods. *Plants*, 12(9), 1884.
- 15- de la Rosa, G., García-Castañeda, C., Vázquez-Núñez, E., Alonso-Castro, Á. J., Basurto-Islas, G., Mendoza, Á., ... & Molina, C. (2017). Physiological and biochemical response of plants to engineered NMs: implications on future design. *Plant Physiology and Biochemistry*, 110, 226-235.
- 16- Deng, Y. Q., White, J. C., and Xing, B. S. (2014). Interactions between engineered nanomaterials and agricultural crops: implications for food safety. *Journal of Zhejiang University Science A*, 15(8), 552-572.
- 17- Dhingra, P., Sharma, S., Singh, K. H., Kushwaha, H. S., Barupal, J. K., Haq, S., ... & Kachhwaha, S. (2022). Seed priming with carbon nanotubes and silicon dioxide nanoparticles influence agronomic traits of Indian mustard (*Brassica juncea*) in field experiments. *Journal of King Saud University-Science*, 34(4), 102067.
- 18- Driver, J. A., & Kuniyuki, A. H. (1984). *In vitro* propagation of Paradox walnut rootstock. *HortScience*, 19(4), 507-509.
- 19- Elemike, E. E., Uzoh, I. M., Onwujiwe, D. C., & Babalola, O. O. (2019). The role of nanotechnology in the fortification of plant nutrients and improvement of crop production. *Applied Sciences*, 9(3), 499.
- 20- Famiani, F., Bonghi, C., Chen, Z. H., Drincovich, M. F., Farinelli, D., Lara, M. V., ... & Walker, R. P. (2020). Stone fruits: Growth and nitrogen and organic acid metabolism in the fruits and seeds—A review. *Frontiers in Plant Science*, 11, 572601.
- 21- Feregrino-Perez, A. A., Magaña-López, E., Guzmán, C., & Esquivel, K. (2018). A general overview of the benefits and possible negative effects of the nanotechnology in horticulture. *Scientia Horticulturae*, 238, 126-137.
- 22- Ghasempour, M., Iranbakhsh, A., Ebadi, M., & Oraghi Ardebili, Z. (2019). Multi-walled carbon nanotubes improved growth, anatomy, physiology, secondary metabolism, and callus performance in *Catharanthus roseus*: An *in vitro* study. *3 Biotech*, 9(11), 404.
- 23- Güney, M. (2019). Development of an *in vitro* micropropagation protocol for Myrobalan 29C rootstock. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, 43(6), 569-575.
- 24- Jordan, J. T., Oates, R. P., Subbiah, S., Payton, P. R., Singh, K. P., Shah, S. A., ... & Cañas-Carrell, J. E. (2020). Carbon nanotubes affect early growth, flowering time and phytohormones in tomato. *Chemosphere*, 256, 127042.
- 25- Khafri, A. Z., Zarghami, R., Ma'mani, L., & Ahmadi, B. (2023). Enhanced efficiency of *in vitro* rootstock micro-propagation using silica-based nanoparticles and plant growth regulators

- in myrobalan 29C (*Prunus cerasifera* L.). *Journal of Plant Growth Regulation*, 42(3), 1457-1471.
- 26- Kharel, P., Creech, M. R., Nguyen, C. D., Vendrame, W. A., Munoz, P. R., & Huo, H. (2022). Effect of explant type, culture medium, and BAP concentration on in vitro shoot development in highbush blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.) cultivars. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 58(6), 1057-1065.
- 27- Khodakovskaya, M. V., De Silva, K., Biris, A. S., Dervishi, E., and Villagarcia, H. (2012). Carbon nanotubes induce growth enhancement of tobacco cells. *ACS Nano*, 6(3), 2128-2135.
- 28- Kuchibhatla, S. V., Karakoti, A. S., Bera, D., and Seal, S. (2007). One dimensional nanostructured materials. *Progress In Materials Science*, 52(5), 699-913.
- 29- Lahiani, M. H., Dervishi, E., Chen, J., Nima, Z., Gaume, A., Biris, A. S., and Khodakovskaya, M. V. (2013). Impact of carbon nanotube exposure to seeds of valuable crops. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 5(16), 7965-7973.
- 30- Li, M., Wang, L., Zhang, J., Zhan, R., An, N., Sun, Y., ... & Su, H. (2022). Single-walled carbon nanotubes promotes wood formation in *Populus davidiana* × *P. bolleana*. *Plant Physiology and Biochemistry*, 184, 137-143.
- 31- Lin, D., and Xing, B. (2008). Root uptake and phytotoxicity of ZnO nanoparticles. *Environmental Science & Technology*, 42(15), 5580-5585.
- 32- Liu, Q., Zhao, Y., Wan, Y., Zheng, J., Zhang, X., Wang, C., ... and Lin, J. (2010). Study of the inhibitory effect of water-soluble fullerenes on plant growth at the cellular level. *ACS Nano*, 4(10), 5743-5748.
- 33- Lucho, S.R., da Silva, V.R., Egewarth, J. et al. (2022). Exogenous sorbitol modifies sugar metabolism, transport and signalling in in vitro-grown 'Myrobalan 29C' according to tissue. *Journal of Plant Growth Regulation*, 42, 5011-5028.
- 34- Martínez-Ballesta, M., Zapata, L., Chalbi, N., & Carvajal, M. (2016). Multiwalled carbon nanotubes enter broccoli cells enhancing growth and water uptake of plants exposed to salinity. *Journal of Nanobiotechnology*, 14(1), 1-14.
- 35- Martínez-Fernández, D., Vítková, M., Michálková, Z., and Komárek, M. (2017). Engineered nanomaterials for phytoremediation of metal/metalloid-contaminated soils: Implications for plant physiology. In *Phytoremediation* (pp. 369-403). Springer, Cham.
- 36- Mathew, S., Tiwari, D. K., & Tripathi, D. (2021). Interaction of carbon nanotubes with plant system: A review. *Carbon Letters*, 31(2), 167-176.
- 37- Mathur, P., Chakraborty, R., Aftab, T., & Roy, S. (2023). Engineered nanoparticles in plant growth: Phytotoxicity concerns and the strategies for their attenuation. *Plant Physiology and Biochemistry*, 107721.
- 38- McCown, B. H. (1981). Woody Plant Medium (WPM)-a mineral nutrient formulation for microculture for woody plant species. *Horticultural Science*, 16, 453.
- 39- Murashige, T., & Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15, 473-497.
- 40- Papafotiou, M., and Martini, A.N. (2009). Effect of position and orientation of leaflet explants with respect to plant growth regulators on micropropagation of *Zamioculcas zamiifolia* Engl.(ZZ). *Scientia horticultrae*, 120(1): 115-120.
- 41- Rajput V, Minkina T, Fedorenko A, Sushkova S et al (2018) Toxicity of copper oxide nanoparticles on spring barley (*Hordeum sativum distichum*). *Science of The Total Environment* 645:1103-1113.
- 42- Sarikhani, H., & Sarikhani-Khorami, H. (2021). Effect of light quality on micropropagation and some morphological properties of Cadaman avimag (*Prunus persica* × *P. davidiana*) rootstock. *International Journal of Horticultural Science and Technology*, 8(1), 51-65.
- 43- Sarikhani, H., Ghorbanizad, H. and Gholami, M. (2017). Effect of carbon nanotubes in micropropagation of GF677 (*Prunus*

- amygdalus× *Prunus persica*) rootstock. *Acta Horticulturae*, 1155: 245-250.
- 44- Shabani, Z., Abedi, B., Ganji Moghadam, E., & Tehranifar, A. (2019). In vitro mass propagation of 'Myrobalan29C' (*Prunus cerasifera* L.): a vegetative Rootstock for stone fruits. *Journal of Plant Production Research*, 26(3), 167-177.
- 45- Shabani, Z., Moghadam, E. G., Abedi, B., & Tehranifar, A. (2015). The effect of plant growth regulators and their concentration in vitro on mass propagation of Myrobalan 29C rootstock. *Journal of Horticulture and Forestry*, 7(3), 57-64.
- 46- Šiško, M., Ternjak, T., & Grobelnik-Mlakar, S. (2022). The effects of different cytokinin types and their concentration on in vitro growth of apricot (*Prunus armeniaca* L.) shoots. *Agricultura Scientia*, 19(1), 1-6.
- 47- Smirnova, E., Gusev, A., Zaytseva, O., Sheina, O., Tkachev, A., Kuznetsova, E., ... and Kirpichnikov, M. (2012). Uptake and accumulation of multiwalled carbon nanotubes change the morphometric and biochemical characteristics of *Onobrychis arenaria* seedlings. *Frontiers of Chemical Science and Engineering*, 6(2), 132-138.
- 48- Sorcia-Morales, M., Gómez-Merino, F. C., Sánchez-Segura, L., Spinoso-Castillo, J. L., & Bello-Bello, J. J. (2021). Multi-walled carbon nanotubes improved development during in vitro multiplication of sugarcane (*Saccharum* spp.) in a semi-automated bioreactor. *Plants*, 10(10), 2015.
- 49- Tan XM, Fugetsu B (2007) Multi-walled carbon nanotubes interact with cultured rice cells: evidence of a self-defense response. *Journal of Biomedicine and Nanotechnology* 3:285-288.
- 50- Thirupathi, G., Shankaraswamy, J., Prashanth, P., & Sathish, G. (2023). Studies on effect of carbon based nanomaterial, novel plant growth promoting agents on growth of jasmine (*Jasminum sambac* Ait.). *Pharma Innovation*, 12(1): 401-404.
- 51- Tiwari, D. K., Dasgupta-Schubert, N., Villasenor, L. M., Tripathi, D., & Villegas, J. (2013). Interaction of carbon nanotubes with mineral nutrients for the promotion of growth of tomato seedlings. *Nano Studies*, 7, 87-96.
- 52- Verma, S. K., Das, A. K., Gantait, S., Kumar, V., & Gurel, E. (2019). Applications of carbon nanomaterials in the plant system: A perspective view on the pros and cons. *Science of the Total Environment*, 667, 485-499.
- 53- Villagarcia, H., Dervishi, E., de Silva, K., Biris, A. S., and Khodakovskaya, M. V. (2012). Surface chemistry of carbon nanotubes impacts the growth and expression of water channel protein in tomato plants. *Small*, 8(15), 2328-2334.
- 54- Wang, X., Han, H., Liu, X., Gu, X., Chen, K., & Lu, D. (2012). Multi-walled carbon nanotubes can enhance root elongation of wheat (*Triticum aestivum*) plants. *Journal of Nanoparticle Research*, 14, 1-10.
- 55- Wu, M., Su, H., Li, C., Fu, Z., Wu, F., Yang, J., & Wang, L. (2023). Effects of foliar application of single-walled carbon nanotubes on carbohydrate metabolism in crabapple plants. *Plant Physiology and Biochemistry*, 194, 214-222.
- 56- Yang, L., and Watts, D. J. (2005). Particle surface characteristics may play an important role in phytotoxicity of alumina nanoparticles. *Toxicology Letters*, 158(2), 122-132.
- 57- Zhuzhukin, K. V., Evlakov, P. M., Grodetzkaya, T. A., Gusev, A. A., Zakharova, O. V., Shuklinov, A. V., & Tomina, E. V. (2023). Effect of multi-walled carbon nanotubes on the growth and expression of stress resistance genes in birch. *Forests*, 14(1), 163.

Investigating the micropropagation of stone fruits (*Prunus* sp.) rootstocks under the influence of culture medium, plant growth regulators and carbon nanotubes

Hassan Sarikhani-Khorami¹, Hassan Sarikhani¹ and Abdolkarim Chehregani-Rad²

1- Department of Horticultural Science, Bu-Ali Sina University, Hamedan, Iran.

2- Department of Biology, Bu-Ali Sina University, Hamedan, Iran.

* corresponding author sarikhani@basu.ac.ir

Abstract

The use of vegetative rootstocks is essential for standardizing production and addressing challenges arising from seedling rootstocks in modern horticulture. This study aimed to establish an optimized protocol for disinfection, proliferation, and rooting of Myrobalan 29C, GF677, and Garnem rootstocks. Additionally, we investigated the potential impact of multi-walled carbon nanotubes (MWCNs) on the establishment and growth of these plants. DKW, WPM, and MS culture media were prepared, and single nodule explants were utilized to explore the influence of culture medium type and plant growth regulators. Among the three rootstocks, Myrobalan, Garnem, and GF677 explants exhibited the most favorable establishment in DKW, MS, and MS culture media, respectively. Notably, GF677 rootstock showed the highest number of branches, nodes, and branch length during the proliferation stage with a concentration of 1 mg/L of BA and 0.1 mg/L of NAA. Similarly, Garnem displayed the highest number of branches with a treatment of 2 mg/L of BA along with 0.25 mg/L of NAA. Regarding rooting, the highest rooting rate was achieved with Myrobalan, Garnem, and GF677 at concentrations of 1, 1, and 2 mg/L of IBA, respectively. Furthermore, the application of 50 mg/L of MWCNs resulted in increased explant growth; however, higher concentrations exhibited adverse effects on explant growth and development. The use of MWCNs holds potential to enhance tissue culture efficiency, particularly for explants of woody plants.

Key words: Stone fruit, rootstock, micropropagation, carbon nanotubes