تأثیر محیط کشت و هورمون بر تکثیر پایه رویشیGF677 در کشت درون شیشه‌ای

احمد رضا بلندی[1*]، حسن حمیدی[1] و علی اصغر رضاقلی[2]

[1] **مشهد، مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی خراسان رضوی**

[2] **اصفهان، دانشگاه آزاد اسلامی واحد خوراسگان، گروه باغبانی**

تاریخ دریافت: ۹۲/۱۲/۲۷ تاریخ پذیرش: ۹۳/۹/۲۳

چکیده

بمنظور مطالعه تأثیر هورمون و محیط کشت بر پتانسیل ریزازدیادی پایه رویشی GF677، این آزمایش در سال ۱۳۹۱ در آزمایشگاه بیوتکنولوژی مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی خراسان رضوی بصورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار اجرا شد. در این پژوهش سه نوع محیط کشت شامل WPM، MS و DKW با دو هورمون بنزیل آمینو پورین (BAP) و نفتالین استیک اسید (NAA) با غلظت‌های صفر، ۰/۵ و یک میلی‌گرم در لیتر مورد بررسی قرار گرفت. صفات مورد مطالعه شامل تعداد برگ، طول ساقه، تعداد شاخه جانبی، تعداد ریشه و طول ریشه بود. نتایج تجزیه واریانس اختلاف معنی‌داری را بین محیط‌های کشت، سطوح هورمون و اثر متقابل آنها برای صفات مورد مطالعه نشان داد. بهترین پاسخ برای صفات مورد مطالعه از محیط‌های MS و WPM و ضعیف‌ترین پاسخ از محیط DKW بدست آمد. نتایج اثر متقابل نشان داد که بیشترین مقادیر برای صفات تعداد برگ، طول ساقه و تعداد شاخه جانبی در محیط WPM با استفاده از هورمون BAP در غلظت یک میلی‌گرم در لیتر و بدون استفاده از هورمون NAA حاصل شد. در این آزمایش بالاترین میانگین تعداد ریشه و طول ریشه از محیط WPM با استفاده از غلظت ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA و بدون استفاده از هورمون BAP بدست آمد.

واژه‌های کلیدی: ریزازدیادی، کشت بافت، هورمون، هیبرید، بادام، هلو

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۹۱۵۵۰۹۵۸۱۹ ، پست الکترونیکی: ar_bolandi@yahoo.com

مقدمه

بدلیل ارتباط مرفولوژیکی و فیزیولوژیکی بین قسمت‌های هوایی با سیستم ریشه گیاه بسیاری از خصوصیات رویشی و زایشی گیاهان نظیر قابلیت تولید میوه، اندازه و رنگ میوه، طول عمر گیاه، مقاومت به تنش‌های محیطی مانند خشکی، سرما، مقاومت به شرایط نامطلوب بستر کشت همانند کمبود و یا افزایش بیش از حد عناصر و یا عدم زهکشی مناسب خاک، اسیدیته خاک، بیماری‌ها و ... نه تنها متأثر از واریته مطلوب انتخاب شده بعنوان پیوندک می-باشد بلکه نوع پایه انتخابی تأثیر زیادی بر این صفات دارد (۱۶). علاوه بر این، پایه تعیین کننده سازگاری اکولوژیکی گیاه بوده و پایه‌های با سازگاری اکولوژیکی بالا عملکرد بهتری دارند (۳۱). استفاده از پایه‌های بذری که در احداث باغ‌های سنتی مورد استفاده قرار می‌گیرند بدلایل متعددی ازجمله عدم یکنواختی باغ، امروزه با پایه‌های رویشی متنوعی که برای انواع درختان میوه تولید و معرفی گردیده جایگزین شده و در احداث باغ‌های مدرن مورد استفاده قرار می‌گیرند. انجام آزمایش‌های مزرعه‌ای مختلف روی پایه‌های اصلاح شده جدید بمنظور اطمینان از سازگاری پایه و پیوندک و رشد طبیعی گیاه در شرایط نهالستان از اهمیت ویژه‌ای برخوردار بوده و شناخت اثر متقابل پایه-پیوندک بر خصوصیات مختلف رویشی و زایشی گیاه ضرورت دارد (۳۴). پایه‌های رویشی همچنین بعنوان یک ابزار تربیتی برای رشد درختان پیوند شده بوده و موجب افزایش حاصلخیزی و بهبود بازده از طریق رشد بهتر گیاه،

کنترل قدرت گیاه و افزایش عملکرد کمی و کیفی میوه می‌گردد (۱۷).

در طی سالیان اخیر انواع پایه‌های رویشی برای درختان میوه ازجمله M9، M27، M26، M106 و MM111 برای سیب؛ SL64، Gisela و Maxma Delbard برای گیلاس؛ Mech Mech برای زردآلو؛ BA29 و OHF برای گلابی و همچنین Miroblan B و Marianna GF81 برای آلو و گوجه مورد استفاده قرار گرفته است (۳).

با توجه به اینکه پیوند هلو روی پایه بذری در خاک‌هایی که دارای زهکشی مناسب نبوده و یا در فصولی از سال از آب اشباع می‌باشند موجب توقف رشد و یا مرگ گیاه می‌گردد، تعداد زیادی پایه رویشی از جنس *Prunus* L. نظیر Jaspi، Julior، Penta، Tetra، Montizo و Barrier1 که مقاوم و سازگار با خاک‌های مرطوب بوده معرفی شده است (۳).

یکی از مهمترین پایه‌های رویشی که کاربرد گسترده‌ای در باغستان‌های بادام، هلو و همچنین شلیل دارد، پایه GF677 می‌باشد که از تلاقی *Prunus persica* × *Prunus amygdalus* بصورت طبیعی در سال ۱۹۶۵ توسط محققان انستیتو ملی تحقیقات کشاورزی فرانسه (INRA) در ایستگاه تحقیقاتی Grande Ferrede شناسایی گردید (۲۲). رشد مطلوب این پایه در خاک‌های ضعیف و تا حدودی باتلاقی که امکان رشد هلو در آن وجود ندارد و همچنین شرایط خشک که احداث باغستان بادام با مشکل مواجه می‌باشد از مزایای این پایه است (۲۲).

استفاده از این پایه و دیگر کولتیوارهای مناسب بدلیل مقاومت به کلروز آهن بویژه زمانی که گیاه در خاک‌های قلیایی کشت شده و کیفیت میوه و بقاء گیاه کاهش می‌یابد بعنوان ابزار مفیدی برای فائق آمدن بر شرایط نامساعد محیطی خاک مورد استفاده قرار می‌گیرد (۳۲). Syrgiannidis (۲۹) گزارش کرد که درختان هلو پیوند شده روی پایه GF677 حدود ۳۰ درصد کلروز کمتری نسبت به درختان پیوند شده روی پایه بذری هلو نشان می‌دهند. این پایه همچنین به خاک‌های آهکی مقاوم بوده، به‌طوری‌که در اروپا از این هیبرید برای پایه هلو و آلو در خاک‌های با میزان کلسیم بالا استفاده می‌شود. وقتی کولتیوارهای هلو روی پایه بذری هلو در pH بالا یا خاک‌های آهکی کشت می‌شوند درخت‌های حاصل ضعیف، بی‌حاصل و دارای کمبود آهن می‌باشند.

از دیگر خصوصیات این هیبرید می‌توان به قدرت رشد بالا، یکنواختی گیاهان تولید شده، سیستم ریشه‌بندی قوی و مقاوم بودن در برابر انتقال نهال بدلیل وجود ریشه فرعی بیشتر اشاره کرد (۴). با توجه به قدرت رشدی زیاد گیاهان پیوند زده روی این پایه، لازم است بمنظور کاهش رقابت بین میوه و شاخ و برگ نسبت به هرس درختان پیوند زده در تابستان اقدام گردد.

برای تأمین تعداد پایه مورد نیاز در بازار لازم است پایه‌های هیبرید جدید با استفاده از تکنولوژی‌های کارآمد و نو در حد انبوه تکثیر شوند که بدین منظور استفاده از کشت بافت کاربرد گسترده‌ای دارد (۲۳).

اولین تحقیقات کشت درون شیشه‌ای پایه GF677 (هیبرید هلو و بادام) توسط Tabachnick و Kester (۳۰) انجام شد. آنان از جوانه‌های خواب بعنوان ریزنمونه برای ریز ازدیادی استفاده کردند. سپس برای شکستن خواب، جوانه‌ها را بمدت یک تا دو ماه در دمای سه درجه سانتی‌گراد قرار دادند. محیط‌های کشت مورد استفاده در این پژوهش MS، MS½ و Knop تغییر یافته بود که از محیط‌های MS و MS½ نتایج مطلوبی بدست نیامد اما در محیط Knop تغییر یافته گیاهان شکل و رشد طبیعی داشتند (۳۰). Hasan و همکاران (۱۰) تأثیر دو محیط کشت LP و MS را بر باززایی GF677 از برگ در شرایط درون شیشه‌ای مطالعه و گزارش نمودند که محیط کشت LP تأثیر پذیری بیشتری بر تعداد جوانه تولید شده در نمونه‌های باززایی شده دارد. این محققین نشان دادند که پاسخ بهتر محیط LP به دلیل وجود

مقدار کمتر کلرید در این محیط و همچنین وجود کلسیم به فرم CaNO3 می باشد در حالیکه کلسیم در محیط MS به فرم CaCl2می‌باشد و این امر باعث کاهش نسبت کلسیم این محیط نسبت به محیط LP می‌گردد.

Matt و Johannes (۱۸) تأثیر هفت محیط کشت شامل DKW، WPM، QL، CP، MS و ترکیبی از آنها را با نسبت مساوی بر باززایی شاخه‌های نابجا روی پنج رقم تجاری گیلاس مطالعه و گزارش کردند که محیط‌های DKW/WPMبا نسبت ۱ : ۱ و QL در حضور ترکیبی از هورمون‌های تیدیازون (TDZ) و اسید ایندول بوتیریک (IBA) اندام‌زایی بیشتری نسبت به محیط‌های دیگر دارند.

در بیشتر تحقیقات روی GF677 برای تکثیر جوانه از هورمون‌های BAP با غلظت بین ۰/۱ تا سه میلی‌گرم در لیتر بعنوان مهمترین منبع سیتوکنین استفاده شده است (۲، ۵ و ۱۱). تأثیر سیتوکنین‌ها با توجه به نوع کشت، سن ریزنمونه و نوع واریته تغییر می‌کند و شروع فعالیت جوانه-های جانبی، تحریک و تقسیم سلول، تشکیل جوانه‌های جانبی و تکثیر آنها را کنترل می‌کند (۵).

George (۷) گزارش کرد اگر در فاز تکثیر درون شیشه‌ای از غلظت‌های بالای سیتوکنین استفاده شود گیاهچه‌های تولید شده بیش از حد معمول متورم شده و برگ‌ها در بعضی از ارقام حالت غیر طبیعی بخود می‌گیرند.

القاء ریشه‌زایی در ریز نمونه‌ها در شرایط کشت بافت از مراحل سخت در فرایند ریز ازدیادی می‌باشد. توانایی بافت گیاهی در تشکیل ریشه بستگی به بسیاری از عوامل درونی و بیرونی ازجمله هورمون‌ها دارد.

گزارش‌های زیادی در مورد القاء ریشه‌زایی در گیاهان چوبی با استفاده از اکسین‌های خارجی (بیرونی) همانند IBA، NAA و IAA و اثر متقابل آنها با اکسین‌های درونی که به اندازه کافی سنتز نمی‌شوند، منتشر شده است (۵). این محققان گزارش کردند که اکسین‌های خارجی فقط در مراحل اولیه برای تحریک و ظهور ریشه‌های جدید مورد نیاز می‌باشد.

برخی از محققان پس از انتقال گیاهچه‌ها از شرایط درون شیشه‌ای به گلخانه و شرایط غیر استریل نسبت به القاء ریشه‌زایی با قرار دادن قسمت انتهایی ساقه با هورمون‌های گروه اکسین اقدام کردند و مزیت این روش را در کاهش هزینه و زمان رشد نسبت به شرایط درون شیشه‌ای اعلام کردند (۱۳).

Fotopoulos و Sotiropoulos (۷) گیاهچه‌های پایه PR204/84 که هیبرید حاصل از هلو و بادام بوده و بعنوان جایگزین برای GF677 می‌باشد را روی دو محیط کشت MS و MS½ با چهار غلظت IBA (۰، ۲/۵، ۵ و ۱۰ میکرو مول) بمنظور ریشه‌زایی قرار دادند. نتایج آنان نشان داد که در شرایط استفاده از IBA با غلظت ۱۰ میکرومول در هر دو محیط کشت MS و MS½ بیشترین درصد ریشه‌زایی، تعداد ریشه و همچنین وزن خشک و تر ریشه حاصل شد. علاوه بر این محیط کشت MS½ نسبت به MS از نظر صفات مرتبط با عملکرد ریشه در بیشتر غلظت‌های هورمونی مورد مطالعه برتری نشان داد.

Nazary Moghaddam و Yadollahi (۲۰) بمنظور مطالعه ریزازدیادی پایه رویشی GF677 از محیط کشت MS با غلظت‌های مختلف BAP (۰، ۰/۱، ۰/۶، ۱، ۱/۵ و ۲ میلی-گرم در لیتر) استفاده کردند. نتایج نشان داد که تعداد و طول ساقه در شرایط استفاده از یک میلی‌گرم در لیتر BAP نسبت به شاهد (بدون استفاده از BAP) و سایر غلظت‌های مورد مطالعه بیشتر بود. به‌طوری‌که کمترین تعداد ساقه نیز در تیمار شاهد مشاهده شد.

Rehman و همکاران (۲۵) از سه محیط کشت MS، MS½ و WPM و هورمون‌های BAP، IBA و NAA جهت استقرار، شاخه‌زایی و ریشه‌زایی گلابی در شرایط درون شیشه‌ای استفاده کردند. نتایج نشان داد که بیشترین درصد شاخه‌زایی و تعداد ساقه در شرایط استفاده از محیط کشت

WPM و غلظت ۲/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP حاصل شد. بیشترین ریشه‌زایی نیز در شرایط استفاده از محیط کشت - MS½ و غلظت یک میلی‌گرم در لیتر IBA بدست آمد.

پایه‌های رویشی GF677 (هیبرید هلو× بادام) دارای خصوصیات مطلوبی از قبیل مقاومت به خاک‌های آهکی، قدرت رشد بیشتر، سیستم ریشه بندی قوی، مقاومت به کمبود آهن، مقاومت به خشکی و افزایش محصول است. روش‌های متعددی برای تکثیر این پایه وجود دارد که از بین آنها استفاده از روش کشت بافت بدلیل عدم محدودیت زمانی و مکانی، ضریب تکثیر بالا، پاسخ مناسب گیاه به باززایی، کوتاه شدن فصل رشد و کاهش هزینه تولید از اهمیت زیادی برخوردار می‌باشد. از این‌رو در این تحقیق تأثیر دو عامل محیط کشت و هورمون بر پتانسیل ریزازدیادی پایه GF677 در شرایط کشت درون شیشه‌ای و بهینه سازی شرایط تکثیر سریع این پایه، مورد مطالعه قرار گرفته است.

مواد و روشها

این تحقیق در سال ۱۳۹۱ در آزمایشگاه بیوتکنولوژی مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی خراسان رضوی اجرا شد. مواد گیاهی مورد استفاده در این تحقیق از جوانه‌های انتهایی و جانبی شاخه‌های جوان پایه مادری GF677 موجود در کلکسیون این مرکز تهیه گردید. زمان تهیه ریزنمونه حدود اردیبهشت ماه بود که خواب زمستانی گیاه به پایان رسیده و گیاه فعالیت مجدد خود را شروع کرد. شاخه‌های با طول حدود ۲۰ سانتی‌متر از پایه مادری جدا و به قطعات حدود ۱۰ میلی‌متر بطوریکه در هر قطعه یک تک جوانه وجود داشته باشد، تقسیم شدند. شستشوی سطحی و اولیه ریزنمونه‌ها با افزودن چند قطره مایع ظرفشویی و قرار دادن آنها زیر آب جاری بمدت حدود نیم ساعت انجام شد. سپس ریزنمونه‌ها سه نوبت با آب مقطر شستشو و بعد از آن جهت انجام عملیات ضد عفونی به زیر دستگاه لامینار فلو (هود استریل) منتقل شدند. در این مرحله ابتدا از کلرید جیوه ۰/۱ درصد و بعد از الکل ۷۰ درصد بترتیب بمدت سه دقیقه و ۳۰ ثانیه جهت ضد عفونی ریزنمونه‌ها استفاده شد. پس از پایان مرحلهٔ ضد عفونی و با هدف حذف کامل مواد ضد عفونی کننده از سطح نمونه‌های گیاهی، ریزنمونه‌ها را بلافاصله در داخل آب مقطر استریل قرار داده و سه نوبت شستشو همراه با همزدن کامل انجام شد. در این تحقیق دو هورمون بنزیل آمینو پورین (BAP) و نفتالین استیک اسید (NAA) و همچنین سه محیط کشت شامل WPM (۱۴)، MS (۱۹) و DKW (۶) مورد بررسی قرار گرفت. این آزمایش بصورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار اجرا شد. مقدار عناصر کم مصرف، پر مصرف، ویتامین‌ها و ساکارز در سه محیط کشت مورد مطالعه در جدول ۱ نشان داده شده است.

هر تکرار در این آزمایش شامل ۱۰ ارلن ۲۵۰ سی‌سی محتوای ۴۰ میلی‌لیتر از هر محیط کشت بود که پس از توزیع محیط کشت در داخل آنها، جهت استریل کردن بداخل اتوکلاو بمدت ۱۵ دقیقه در دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد و فشار ۱/۲ اتمسفر منتقل شدند. سپس در زیر دستگاه هود استریل ریزنمونه‌های GF677 ضدعفونی شده و بر روی سطح محیط کشت از قرار سه ریز نمونه در داخل هر ارلن قرار داده شدند. ظروف کشت بداخل فیتوترون (اتاقک رشد) با شرایط دمای ۲±۲۵ درجه سانتی‌گراد، شدت نور ۵۰۰۰ لوکس و دوره نوری ۱۶ ساعت روشنایی و هشت ساعت تاریکی منتقل گردیدند. گیاهچه‌ها حدود ده روز پس از کشت از محل میانگره‌ها شروع به رشد نموده و با گذشت زمان تعداد و اندازه آنها افزایش یافت و هر سه هفته (۲۱ روز) نسبت به واکشت ریزنمونه‌ها در محیط تازه اقدام گردید. حدود ۶ – ۵ هفته پس از واکشت نسبت به اندازه‌گیری صفاتی از قبیل تعداد برگ، شاخه جانبی و ریشه و همچنین طول ریشه و ساقه اقدام گردید. گیاهچه‌های ریشه‌دار شده که دارای وضعیت رشدی مناسبی بودند از محیط کشت خارج و پس از

شستن ریشه‌ها و حذف کامل آگار از محیط اطراف ریشه، برای ادامهٔ رشد و گذراندن مرحلهٔ سازگاری به گلدان منتقل شدند. نتایج آزمایش با استفاده از نرم افزار آماری SAS تجزیه و تحلیل گردید. مقایسه میانگین‌ها نیز با استفاده از آزمون دانکن در سطح احتمال پنج درصد انجام شد.

جدول ۱- مقدار عناصر کم‌مصرف، پرمصرف، ویتامین‌ها و ساکارز (میلی‌گرم در لیتر) در سه محیط کشت مورد مطالعه

ترکیبات	محیط کشت		
	MS	DKW	WPM
NH_4NO_3	۱۶۵۰	۱۴۱۶	۴۰۰
KNO_3	۱۹۰۰	–	–
$Ca(NO_3)_2.4H_2O$	–	۱۹۶۸	۵۵۶
$CaCl_2.2H_2O$	۴۴۰	۱۴۹	۹۶
K_2SO_4	–	۱۵۵۹	۹۹۰
$MgSO_4.7H_2O$	۳۷۰	۷۴۰	۳۷۰
KH_2PO_4	۱۷۰	۲۶۵	۱۷۰
$MnSO_4.4H_2O$	۲۲/۳	۳۳/۵	۲۲/۳
$Na_2MoO_4.2H_2O$	۰/۲۵	۰/۳۹	۰/۲۵
$ZnSO_4.7H_2O$	۸/۶	–	۸/۶
$Zn(NO_3)_2.6H_2O$	–	۱۷	–
KI	۰/۸۳	–	–
H_3BO_3	۶/۲	۴/۸	۶/۲
$CuSO_4.5H_2O$	۰/۰۲۵	۰/۲۵	۰/۲۵
$CoCl.6H_2O$	۰/۲۵	–	–
$NiSO_4.6H_2O$	–	۰/۰۰۵	–
$FeSO_4.7H_2O$	۲۷/۸	۳۳/۸	۲۷/۸
$Na_2EDTA.2H_2O$	۳۷/۳	۴۵/۴	۳۷/۳
Myo-inositol	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰
Thiamin-HCL	۰/۱	۲	۱
Nicotinic acid	۰/۵	۱	۰/۵
Pyridoxine-HCL	۰/۵	–	۰/۵
Glycine	۲	۲	۲
Glutamine	–	–	۲
Sucrose	۳۰۰۰۰	۳۰۰۰۰	۳۰۰۰۰

MS, Murashige and Skoog (1969); DKW, Driver and Kuniyuki walnut medium (1984); WPM, Woody plant medium (Lloyd and McCown, 1980)

نتایج و بحث

نتایج تجزیه واریانس در جدول ۲ نشان داده شده است. همانگونه که در این جدول مشاهده می‌گردد هورمون و محیط کشت تأثیر معنی‌داری در سطح احتمال ۱٪ بر تمامی صفات مورد مطالعه دارند. در این مطالعه همچنین اثر متقابل و معنی‌داری بین هورمون و محیط کشت در سطح احتمال ۵٪ برای صفت تعداد ریشه و در سطح ۱٪ برای بقیه صفات مشاهده می‌گردد.

جدول۲- نتایج تجزیه واریانس اثرات محیط کشت و هورمون بر تعداد برگ، شاخه جانبی و ریشه، طول ساقه و ریشه در پایه GF677

منابع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات				
		تعداد برگ	طول ساقه	تعداد شاخه جانبی	تعداد ریشه	طول ریشه
محیط کشت	۲	۲۱۲/۸۹**	۴۸۰/۹۶**	۲۵/۲۰**	۳/۰۱**	۸۲/۵۲**
هورمون	۸	۲۶۱/۰۷**	۲۱۳/۷۷**	۴۴/۶۳**	۱۱/۷۹**	۱۶۴/۹۴**
محیط کشت × هورمون	۱۶	۸۱/۹۹**	۸۰/۰۲**	۱۱/۱۸**	۱/۹۴*	۷۷/۱۸**
خطای آزمایش	۸۰	۱۰/۱۳	۶/۲۱	۰/۷۷	۰/۱۹۴	۱۹/۱۷
ضریب تغییرات (درصد)		۳/۶۳	۲/۴۱	۱۸/۱۷	۲/۳۴	۱۰/۳۴

* و **: به‌ترتیب معنی‌دار در سطح ۰/۰۵ و ۰/۰۱

حدود ۱۰ روز پس از استقرار ریز نمونه‌ها روی محیط‌های کشت، اختلاف در رشد اندام‌های رویشی با توجه به نوع محیط کشت مورد استفاده مشهود بود. نمونه‌های مستقر شده روی محیط کشت DKW دارای رشد بسیار بطئ و کند بودند، در صورتی‌که نمونه‌های کشت شده در دو محیط دیگر از وضعیت رشدی مناسبی برخوردار بودند. برگ‌ها پس از رشد، ظاهری کشیده و نسبتاً باریک داشتند و پهنک آنها با کمی قوس بسمت داخل حالت ناودانی شکل بخود گرفته بودند. رنگ آنها در محیط کشت WPM بصورت سبز تیره و در محیط MS سبز روشن بود، بگونه‌ای که رنگ پریدگی و نهایتاً نکروزه شدن در محیط MS در صورت تأخیر در واکشت نسبت به محیط WPM سریعتر بوقوع می‌پیوندد.

در این تحقیق ریز نمونه‌های کشت شده روی محیط DKW برای تمام صفات مورد مطالعه پاسخ ضعیف‌تری نسبت به دو محیط دیگر نشان دادند. تعداد برگ، طول ساقه و تعداد شاخه جانبی تشکیل شده در این محیط نسبت به محیط MS بترتیب ۷۱/۹ ، ۶۸/۸ و ۷۱/۷ درصد کاهش و نسبت به محیط کشت WPM برای صفات ذکر شده بترتیب ۷۰/۴ ، ۶۶/۶ و ۷۳/۹ درصد کاهش نشان داد (جدول ۳).

جدول ۳- مقایسه میانگین اثر محیط کشت بر تعداد برگ، شاخه جانبی و ریشه، طول ساقه و ریشه در پایه GF677

محیط کشت	تعداد برگ	طول ساقه (میلی‌متر)	تعداد شاخه جانبی	تعداد ریشه	طول ریشه (میلی‌متر)
WPM	۶/۹۹ a	۱۱/۱۲ a	۲/۱۹ a	۰/۸۸ a	۲/۶۴ ab
MS	۶/۶۴ a	۱۰/۳۹ a	۲/۳۸ a	۰/۵۸ b	۳/۹۶ a
DKW	۱/۹۶ b	۳/۴۷ b	۰/۶۲ b	۰/۲۲ c	۰/۵۳ b

میانگین‌های دارای حداقل یک حرف مشترک بر اساس آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ۵٪ تفاوت معنی‌داری ندارند.

البته بین دو محیط MS و WPM برای صفات تعداد برگ، طول ساقه و تعداد شاخه جانبی اختلاف معنی‌داری مشاهده نگردید اما پاسخ گیاهچه‌ها به صفات مرتبط با ریشه در این دو محیط متفاوت بود. در محیط کشت MS تعداد ریشه تولید شده بیشتر بود، در صورتی‌که در محیط کشت WPM طول ریشه‌ها بزرگتر بودند.

بین محیط کشت‌های DKW، MS و WPM تفاوت‌هایی از نظر نوع و مقدار بعضی عناصر و ترکیبات کم مصرف و پرمصرف وجود دارد و اختلاف در پاسخ به عملکرد کشت درون شیشه‌ای پایه رویشی GF677 در محیط‌های مورد مطالعه در این تحقیق ناشی از همین تفاوت‌ها می‌باشد. در دو محیط کشت WPM و DKW در مقایسه با محیط MS نیترات پتاسیم حذف و سولفات پتاسیم جایگزین شده، ضمن اینکه مقدار یون سولفات در محیط WPM و DKW

بترتیب ۴/۴ و ۷/۲ برابر بیشتر از مقدار آن در محیط MS می‌باشد (جدول ۳). از تفاوت‌های دیگر سه محیط کشت مورد مطالعه مقادیر نیترات و آمونیم آنها بوده که بعنوان منبع اصلی تأمین نیتروژن به محیط کشت اضافه می‌گردد. اگرچه نسبت نیترات به آمونیم در سه محیط تقریباً برابر است اما مقادیر آنها در محیط‌های مختلف با یکدیگر متفاوت بوده، بگونه‌ای که مقدار نیترات در محیط MS نسبت به محیط WPM و DKW بترتیب ۳/۸۳ و ۱/۱۴ برابر و مقدار آمونیم آن نسبت به این دو محیط بترتیب ۴/۱۲ و ۱/۱۷ برابر بیشتر می‌باشد (جدول ۱).

Shanjani (۲۷) گزارش کرد که نیترات و آمونیم منبع اصلی نیتروژن در محیط کشت است ولی نیترات بدلیل سهولت در جذب و غیر سمی بودن نسبت به آمونیم منبع بهتری از نیتروژن می‌باشد.

با توجه به اینکه محیط کشت‌های مختلف از نظر نوع و غلظت بعضی از املاح و ترکیبات با یکدیگر متفاوت می باشند، بنابراین رشد و نمو ریز نمونه‌های مستقر شده روی این محیط‌ها با یکدیگر متفاوت بوده که با شناخت این تفاوت‌ها می‌توان محیط مطلوب برای هدف مورد نظر را شناسایی کرد.

نتایج حاصل از پژوهش مهدویان و همکاران (۱) روی تأثیر سه نوع محیط کشت بر ریز ازدیادی پایه رویشی محلب نشان داد که درصد شاخسارهای ریشه‌دار شده در محیط کشت DKW نسبت به محیط کشت MS با مقدار مشابه هورمون، ۲۵٪ بیشتر از مقدار بدست آمده در محیط کشت MS است. این برتری برای صفت تعداد شاخه‌های جانبی در محیط کشت DKW نیز مشاهده شد، بگونه‌ای که تعداد شاخه در این محیط ۱/۶ برابر بیشتر از تعداد بدست آمده در محیط MS بود.

در پژوهش دیگری تأثیر دو محیط کشت MS و LP که از نظر مقدار کلسیم و کلرید با یکدیگر تفاوت داشتند برای ساقه‌زایی پایه رویشی GF677 مورد استفاده قرار گرفت و نتایج اختلاف معنی‌داری را بین دو محیط نشان داد، به‌طوری‌که در محیط LP درصد ساقه‌زایی ۲۹/۸۵ بود، در صورتی‌که این مقدار در محیط MS برابر ۲۰/۸۸ بدست آمد (۱۰).

نتایج حاصل از مطالعات Fotopoulos و Sotiropoulos (۷) بر روی تأثیر دو محیط کشت MS و MS½ بر ریشه-زایی گیاهچه‌های هیبرید حاصل از هلو و بادام نشان داد که اختلاف معنی‌داری بین دو محیط برای بیشتر صفات مرتبط با ریشه‌زایی وجود دارد، بگونه‌ای که میانگین وزن خشک ریشه در محیط MS½ حدود ۶۳ درصد بیشتر از وزن خشک ریشه‌های تولید شده در محیط کشت MS بود. این محققان گزارش کردند بدلیل تأثیر غلظت املاح محیط کشت بر بعضی خصوصیات گیاهچه‌ها در شرایط درون شیشه‌ای، استفاده از بعضی محیط‌های کشت از جمله MS با ½ غلظت استاندارد (MS½) برای ریشه زایی مفید می‌باشد.

کمالی و همکاران (۱۱) تأثیر دو محیط کشت MS و Knop را روی تکثیر و قدرت جوانه زنی GF677 مورد مطالعه قرار دادند. نتایج نشان داد که اختلاف معنی‌داری بین دو محیط برای صفات مورد مطالعه وجود دارد. این محققان برتری محیط کشت Knop در مقایسه با محیط کشت MS را برای تکثیر جوانه و طویل شدن آنها در تیمارهای متناظر از نظر نوع و غلظت هورمون گزارش کردند.

Rehman و همکاران (۲۵) برای استقرار، شاخه‌زایی و ریشه‌زایی گلابی از سه محیط کشت MS، MS½ و WPM استفاده کردند. نتایج نشان داد که محیط کشت WPM از نظر صفات درصد شاخه‌زایی، تعداد و طول ساقه نسبت به سایر محیط کشت‌های مورد مطالعه برتری داشت. در حالیکه بیشترین ریشه‌زایی در محیط کشت MS½ حاصل شد.

علاوه بر تأثیر محیط کشت بر عملکرد صفات مرتبط با ریز ازدیادی در پایه رویشی GF677، هورمون‌ها نیز بعنوان

فاکتور مهم دیگری در تحریک سلول، تشکیل و تکثیر جوانه‌ها و همچنین القاء ریشه‌زایی و رشد آنها تأثیرگذار می‌باشند.

در این تحقیق بیشترین تعداد برگ از ریز نمونه‌های تیمار شده با غلظت‌های یک و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP بدون حضور NAA بدست آمد (جدول ۴). ترکیب هر مقدار از هورمون NAA با BAP موجب کاهش این صفت می‌شود، به‌طوری‌که ترکیب ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA با همین مقدار BAP تعداد برگ در هر ریز نمونه را ۷۴/۷ درصد نسبت به کاربرد BAP به‌تنهایی کاهش داد. در این آزمایش کمترین تعداد برگ با میانگین ۳/۷۷ عدد برای هر ریز نمونه از دو ترکیب ۰/۵ و یک میلی‌گرم در لیتر BAP با یک میلی‌گرم در لیتر NAA بدست آمد.

جدول ۴- مقایسه میانگین اثر هورمون بر تعداد برگ، شاخه جانبی و ریشه، طول ساقه و ریشه در پایه GF677

هورمون (میلی‌گرم در لیتر)	تعداد برگ	طول ساقه (میلی‌متر)	تعداد شاخه جانبی	تعداد ریشه	طول ریشه (میلی‌متر)
شاهد (بدون هورمون)	۳/۷۹ b	۸/۲۲ c	۰/۵۷ de	۰/۴۶ c	۶/۸۲ b
0 BAP+0.5NAA	۲/۵۴ b	۶/۸۹ c	۰/۳۱ e	۳/۴۲ a	۱۲/۰۱ a
0 BAP +1NAA	۲/۱۷ b	۶/۲۲ c	۰/۲۸ e	۱/۱۶ b	۲/۴۹ c
0.5 BAP +0NAA	۱۴/۵۸ a	۱۴/۴۶ b	۴/۷۹ b	۰ c	۰ c
0.5 BAP +0.5NAA	۳/۷۲ b	۸/۲۲ c	۱/۷۱ c	۰ c	۰ c
0.5 BAP +1NAA	۱/۲۶ b	۲/۸۱ d	۰/۱۹ e	۰ c	۰ c
1 BAP +0NAA	۱۴/۵۵ a	۱۷/۵۴ a	۶/۲۱ a	۰ c	۰ c
1 BAP +0.5NAA	۲/۹۷ b	۷/۲۲ c	۱/۳۰ dc	۰ c	۰ c
1 BAP +1NAA	۱/۲۶ b	۲/۹۲ d	۰/۲۳ e	۰ c	۰ c

میانگین‌های دارای حداقل یک حرف مشترک بر اساس آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ۵٪ تفاوت معنی‌داری ندارند.

در این تحقیق واکنش ریز نمونه‌ها به کاربرد هورمون‌ها و غلظت‌های مختلف آنها برای صفت طول ساقه و تعداد شاخه‌های جانبی تقریبا مشابه با رفتار ریز نمونه‌ها برای صفت تعداد برگ بود و بهترین پاسخ از کاربرد هورمون BAP به‌تنهایی بدست آمد، با این تفاوت که برای این صفات افزایش هورمون BAP از ۰/۵ به یک میلی‌گرم در لیتر مقادیر این صفات را بطور معنی‌داری افزایش داد.

مقایسه مقادیر بدست آمده از تیمار شاهد برای صفات ذکر شده در مقایسه با مقادیر حاصل از تیمارهایی که از هورمون NAA (به‌تنهایی یا در ترکیب با هورمون BAP) استفاده شده نشان از برتری تیمار شاهد در تمامی حالات داشت. بطور مثال برای صفت طول ساقه، میانگین مقدار تیمار شاهد ۸/۲۲ میلی‌متر است ولی در صورت افزودن یک میلی‌گرم NAA و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP به محیط کشت مقدار این صفت ۶۵/۸ درصد کاهش و در صورت افزایش یک میلی‌گرم NAA با یک میلی‌گرم در لیتر BAP عملکرد این صفت ۶۴/۵ درصد کاهش می‌یابد (جدول ۴).

در ارتباط با نقش هورمون‌ها بر باززایی گیاهان جنس پرونوس گزارشهای زیادی منتشر شده است. در بیشتر تحقیقات برای پرآوری و شاخه‌زایی این گیاهان از هورمون‌های گروه سیتوکنین در محیط کشت استفاده شده است. Sotiropoulos و Fotopoulos (۲۸) تأثیر غلظت‌های مختلف دو هورمون BAP (۰/۰۸و ۰/۲۸ میکرومول) و GA_3 (صفر ، ۰/۰۲۸ ، ۰/۲۸و ۲/۸ میکرومول) را در محیط کشت MS بر طول گیاهچه یک نوع از هیبرید هلو × بادام مورد مطالعه قرار دادند. نتایج این محققان نشان داد که

بهترین پاسخ برای این صفت از ترکیب ۰/۰۸ میکرومول BAP با ۰/۰۲۸ میکرومول GA_3 در محیط کشت بدست می‌آید. در این گزارش استفاده از غلظت‌های بالای هورمون GA_3 تأثیر منفی بر کیفیت جوانه‌ها نشان داد، به‌طوری‌که بعضی از برگ‌های تولید شده در قسمت پایین رنگ پریده شده و برخی علائم شیشه‌ای شدن را بروز می دهند. George (۸) گزارش کرد که در صورت استفاده از غلظت‌های بالای سیتوکینین برای تکثیر درون شیشه‌ای گیاهان، گیاهچه‌های حاصل بیش از حد معمول متورم شده و در برخی موارد برگ‌ها بشکل غیر طبیعی ظاهر می‌شوند. در پژوهش دیگری Loreti و همکاران (۱۵) گزارش کردند که استفاده از هورمون‌های BAP و GA_3 بترتیب با غلظت-های ۰/۸ و ۰/۲۴ در محیط کشت بر بهبود کیفیت و افزایش طول جوانه‌های پایه رویشی هلو بنام PSB_2 تأثیرگذار می‌باشد.

Ruzic و Vujovic (۲۶) در مطالعه چهار نوع سیتوکنین مختلف شامل BAP ، TDZ، 2ip و کینیتین بر ریزازدیادی گیلاس رقم Laines نشان دادند که BAP بهترین هورمون برای فاز تکثیر و پرآوری می‌باشد. در تحقیقی مهدویان و همکاران (۱) تأثیر BAP را در شکستن غالبیت انتهایی و تحریک رشد شاخساره‌های جدید بیان کردند، بگونه‌ای که افزایش غلظت این هورمون در محیط کشت باعث تولید شاخساره‌های بیشتری شدند. این محققان وجود هورمون BAP در محیط را بعنوان عامل مانع‌شونده تولید ریشه در پایه رویشی محلب ذکر کردند.

Nazary Moghaddam و Yadollahi (۲۰) برای ریزازدیادی پایه رویشی GF677 از غلظت‌های مختلف BAP (۰، ۰/۱، ۰/۶، ۱، ۱/۵ و ۲ میلی‌گرم در لیتر) استفاده کردند. این محققان بیشترین تعداد و طول ساقه را در شرایط استفاده از یک میلی‌گرم در لیتر BAP ذکر کردند.

Karimpour و همکاران (۱۲) گزارش کردند که در شرایط درون شیشه‌ای، افزایش غلظت سیتوکینین باعث افزایش شاخه‌زایی در ارقام مختلف گلابی می‌شود.

در تحقیق حاضر بهترین نتیجه برای صفات تعداد و طول ریشه از کاربرد ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA و بدون استفاده از هورمون BAP بدست آمد (جدول ۴). در این تیمار تعداد ریشه در هر ریز نمونه ۱/۷۱ عدد با میانگین طول ۱۲/۰۱ میلی‌متر بود. در صورت افزایش غلظت هورمون NAA در این تیمار به یک میلی‌گرم در لیتر تعداد ریشه و طول ریشه بترتیب ۶۶/۱ و ۴۳/۲ درصد کاهش می‌یابد. برای این صفات پاسخ محیط بدون هورمون (شاهد) بهتر از تمامی محیط کشت‌هایی بود که به آن هورمون BAP به‌تنهایی یا در ترکیب با هورمون NAA استفاده شده بود. بعبارت دیگر، وجود هورمون BAP در محیط کشت مانع تولید ریشه در گیاهچه می‌گردد. در محیط شاهد، میانگین تعداد ریشه ۰/۲۳ عدد و طول آنها ۲/۴۹ میلی‌متر بود.

در ریزازدیادی، ریشه‌دار کردن ریز نمونه‌ها اغلب با چالش مواجه بوده و نرخمیزان آن پایین می‌باشد. بدین ترتیب اعمال تیمارهای هورمونی مخصوصا اکسین‌ها برای القاء ریشه‌زایی در گیاهچه‌های درون شیشه‌ای بطریقی که تعداد ریشه کافی با اندازه مناسب و بدون تشکیل کالوس تولید کنند و پس از استقرار در خاک توانایی خوب داشته باشند دارای اهمیت می‌باشد (۹).

استفاده از اکسین‌های مختلف و با غلظت‌های متفاوت در شرایط درون شیشه‌ای برای تحریک گیاهچه به ریشه‌زایی در GF677 مورد استفاده قرار گرفته و پاسخ‌های متنوعی گزارش شده است. Ahmad و همکاران (۲) از سه هورمون IBA، NAA و IAA برای ریشه‌زایی جوانه‌های GF677 استفاده نمودند و بهترین پاسخ را در استفاده از هورمون IBA گزارش کردند. در تحقیق دیگری Nissen و Sutter (۲۱) از دو هورمون IAA و IBA برای ریشه‌زایی استفاده کردند و پاسخ ضعیف‌تر هورمون IAA در مقایسه

با IBA را بسرعت بیشتر اکسیداسیون فتوشیمیایی و یا آنزیماتیک هورمون IAA در مقایسه با IBA نسبت دادند. Vaez و Salehi (۳۳) تأثیر غلظت‌های مختلف IBA و NAA را بر ریشه‌زایی هیبرید GF677 مطالعه نمودند و بهترین پاسخ را برای تعداد و طول ریشه از کاربرد ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر IBA گزارش نمودندکردند.

در جدول ۵ نتایج اثر متقابل محیط کشت در هورمون نشان داده شده است.

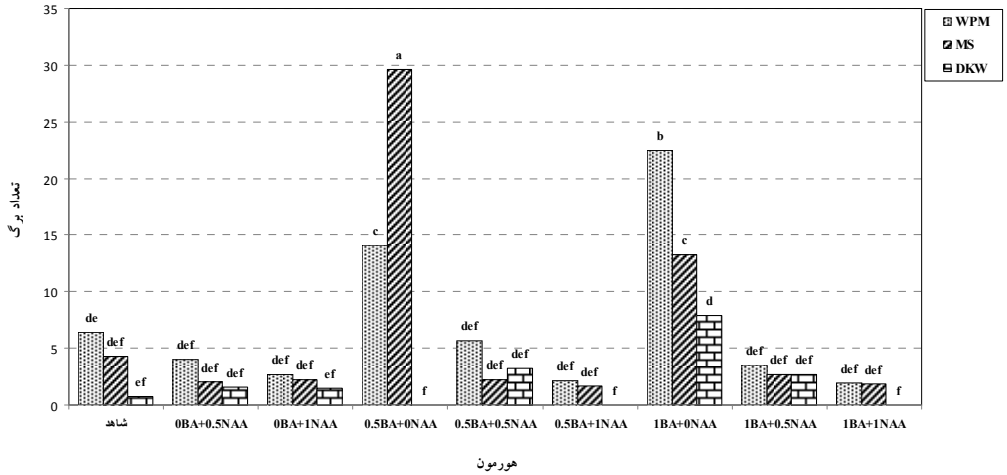
جدول ۵- مقایسه میانگین اثر متقابل محیط کشت × هورمون بر تعداد شاخه جانبی و ریشه، طول ساقه و ریشه در پایه GF677

محیط کشت	هورمون (میلی‌گرم در لیتر)	طول ساقه (میلی‌متر)	تعداد شاخه جانبی	تعداد ریشه	طول ریشه (میلی‌متر)
WPM	شاهد (بدون هورمون)	۹/۱۰ defg	۰/۷۱ f	۰ d	۰ c
	0 BAP+0.5NAA	۹/۸۶ def	۰/۲۹ f	۵/۸۱ a	۲۲/۲۴ a
	0 BAP +1NAA	۷/۸۱ defghi	۰/۱۹ f	۲/۱۹ b	۱/۵۲ bc
	0.5 BAP +0NAA	۱۶/۹۵ b	۴/۵۲ c	۰ d	۰ c
	0.5 BAP +0.5NAA	۱۱/۱۰ cd	۲/۹۵ d	۰ d	۰ c
	0.5 BAP +1NAA	۳/۷۶ hijk	۰/۴۳ f	۰ d	۰ c
	1 BAP +0NAA	۲۸/۱۰ a	۹/۱۴ a	۰ d	۰ c
	1 BAP +0.5NAA	۱۰/۴۸ cde	۱/۵۲ def	۰ d	۰ c
	1 BAP +1NAA	۲/۹۵ ijk	۰ f	۰ d	۰ c
MS	شاهد (بدون هورمون)	۱۴/۶۷ bc	۱/۰۰ ef	۱/۴۳ c	۲۰/۴۸ a
	0 BAP+0.5NAA	۵/۷۱ efghij	۰/۳۳ f	۲/۴۸ b	۹/۲۹ b
	0 BAP +1NAA	۷/۴۸ defghi	۰/۱۹ f	۱/۳۳ c	۵/۹۵ bc
	0.5 BAP +0NAA	۲۶/۴۳ a	۹/۸۶ a	۰ d	۰ c
	0.5 BAP +0.5NAA	۵/۲۴ fghij	۰/۷۱ f	۰ d	۰ c
	0.5 BAP +1NAA	۴/۶۷ ghijk	۰/۱۴ f	۰ d	۰ c
	1 BAP +0NAA	۱۷/۶۲ b	۷/۱۰ b	۰ d	۰ c
	1 BAP +0.5NAA	۵/۹۵ efghij	۱/۴۳ def	۰ d	۰ c
	1 BAP +1NAA	۵/۸۱ efghij	۰/۷۱ f	۰ d	۰ c
DKW	شاهد (بدون هورمون)	۲/۳۳ jk	۰ f	۰ d	۰ c
	0 BAP+0.5NAA	۵/۱۰ fghij	۰/۳۳ f	۲/۰۰ bc	۴/۵۲ bc
	0 BAP +1NAA	۳/۳۸ ijk	۰/۴۸ f	۰ d	۰ c
	0.5 BAP +0NAA	۰ k	۰ f	۰ d	۰ c
	0.5 BAP +0.5NAA	۸/۳۳ defgh	۱/۴۸ def	۰ d	۰ c
	0.5 BAP +1NAA	۰ k	۰ f	۰ d	۰ c
	1 BAP +0NAA	۶/۹۰ defghij	۲/۴۰ de	۰ d	۰ c
	1 BAP +0.5NAA	۵/۲۴ fghij	۰/۹۵ ef	۰ d	۰ c
	1 BAP +1NAA	۰ k	۰ f	۰ d	۰ c

میانگین‌های دارای حداقل یک حرف مشترک بر اساس آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ۵٪ تفاوت معنی‌داری ندارند.

همانگونه که در این جدول مشاهده می گردد بهترین پاسخ برای صفات تعداد برگ (شکل ۱)، طول ساقه و تعداد شاخه جانبی در محیط WPM با استفاده از هورمون BAP در غلظت یک میلی‌گرم در لیتر و بدون استفاده از هورمون

NAA بدست آمد. باززایی پایه رویشی GF677 در مرحله ساقه‌زایی و ریشه‌زایی در شکل ۲ نشان داده شده است. در این تیمار هورمونی برای صفات ذکر شده، محیط کشت MS پاسخ مطلوبی نشان نداد، بطوریکه تعداد برگ و طول ساقه در این محیط نسبت به محیط WPM بترتیب ۴۱ درصد و ۳۷/۳ درصد کمتر بود. برای این صفات (تعداد برگ، طول ساقه، تعداد شاخه جانبی) بالاترین عملکرد در محیط MS، با استفاده از هورمون BAP در غلظت ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر و بدون حضور هورمون NAA بدست آمد. گیاهچه‌های تولید شده در محیط کشت DKW اگر چه پاسخ ضعیف‌تری برای صفات تعداد برگ، طول ساقه و تعداد شاخه جانبی نسبت به دو محیط کشت دیگر نشان دادند اما واکنش آنها به غلظت‌های مختلف هورمونی در این محیط مشابه واکنش گیاهچه‌های کشت شده در محیط WPM بود و بالاترین مقادیر از تیمار هورمونی یک میلی-گرم در لیتر هورمون BAP بدون مشارکت هورمون NAA بدست آمد.



شکل ۱ – نمودار اثر متقابل محیط کشت در هورمون بر تعداد برگ در پایه رویشی GF677

شکل ۲- باززایی پایه رویشی GF677 در مرحله ساقه‌زایی (سمت راست) و ریشه‌زایی (سمت چپ)

همانگونه که در جدول ۵ مشاهده می‌گردد واکنش گیاهچه‌ها به صفات مرتبط با ریشه در محیط کشت‌های مختلف با توجه به نوع هورمون مورد استفاده متفاوت می باشد. بالاترین میانگین طول ریشه در محیط WPM از

کاربرد NAA با غلظت ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر و بدون استفاده از هورمون BAP بدست آمد، در صورتیکه در محیط کشت MS بالاترین عملکرد برای این صفت از تیمار یک میلی‌گرم در لیتر NAA بدست آمد. در این تحقیق اگرچه برای صفات مرتبط با اندام‌های هوایی، گیاهچه‌های کشت شده روی محیط MS نسبت به دو محیط دیگر پاسخ مناسب‌تری نشان دادند اما گیاهچه‌ها در محیط کشت WPM از نظر ریشه دارای وضعیت مطلوبتری می‌باشند. بنابراین بنظر می‌رسد رشد بهتر اندام‌های هوایی در محیط کشت MS بدلیل وجود مقادیر بالای نیتروژن بویژه نیترات موجود در محیط MS باشد که مقدار آن تقریباً چهار برابر محیط WPM است. در تحقیق حاضر گیاهچه‌های ریشه‌دار شده که دارای وضعیت رشدی مناسبی بودند، جهت ادامهٔ رشد و گذراندن مرحلهٔ سازگاری به گلدان منتقل شدند (شکل ۳).

Hasan و همکاران (۱۰) تأثیر دو محیط کشت LP و MS را در ترکیب با غلظت‌های مختلف دو هورمون BAP و NAA بر درصد باززایی، تعداد جوانه و طول جوانه در ریز نمونه‌های باززایی شده در GF677 مورد مطالعه قرار دادند و اثر متقابل معنی‌داری بین محیط کشت و هورمون‌های رشد برای صفات مورد مطالعه گزارش شد.

شکل ۳- پایه رویشی GF677 حاصل از کشت درون شیشه‌ای

در گزارش این محققان طول گیاهچه‌های باززایی شده در محیط MS محتوای ۲/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP و ۰/۷۵ میلی‌گرم در لیتر NAA بزرگتر از گیاهچه های کشت شده در محیط کشت LP با ترکیبات مشابه هورمونی بود. بعکس برای این صفت پاسخ گیاهچه‌هایی که در محیط LP با ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP و ۰/۲۵ میلی‌گرم NAA کشت شده بودند بهتر از گیاهچه‌های کشت شده در محیط MS با ترکیبات مشابه هورمونی بود. در این تحقیق همچنین درصد شاخه‌زایی در محیط LP محتوای ۲ میلی‌گرم در لیتر BAP و ۰/۷۵ میلی‌گرم NAA برابر ۵۵٪ بود که این مقدار در محیط MS با مقادیر مشابه هورمون برابر ۴۰٪ بود.

منابع

۱- مهدویان م.، بوذری ن. و عبداللهی ح. ۱۳۸۹. اثر محیط کشت و تنظیم کننده‌های رشد بر پرآوری و ریشه‌زایی پایهٔ رویشی محلب (سنت لوسی ۶۴). مجله به نژادی نهال و بذر. ۲۶ (۱): ۲۶-۱۵.

Inhibitory effects of riboflavin (vitamin B_2) on the *in vitro* rooting and nutrient concentration of explants of peach rootstock GF677 (*Prunus amygdalus* × *P. persica*). Scientia Horticulturae, 106: 268-272.

5. Dobránszki J, and Teixeira JA. 2010. Micropropagation of apple- A review. Biotechnology Advances, 28: 462-488.

6. Driver JA, and Kuniyuki AM. 1984. *In vitro* propagation of Paradox walnut rootstock. Horticultural Science, 19 (4): 507–509.

2. Ahmad T, Rahman H, Ahmad MS, and Laghari MH. 2003. Effect of culture media and growth regulators on micropropagation of peach rootstock GF 677. Pak. J. Bot. 35 (3): 331-338.

3. Andreu P, and Marin JA. 2004. Micropropagation enhances *in vitro* establishment and multiplication of new cultivars from field grown plants of Adesoto 101 (*Prunus insititia*) rootstock. Acta Horticulturae, 658: 605–609.

4. Antonopoulou C, Dimassi K, Therios I, Chatzissavvidis C, and Tsirakoglou V. 2005.

7. Fotopoulos S, and Sotiropoulos TE. 2005. *In vitro* rooting of PR 204/84 rootstock (*Prunus persica* × *P. amygdalus*) as influenced by mineral concentration of the culture medium and exposure to darkness for a period. Agronomy Research, 3(1): 3–8**.**

8. George EF. 1996: Plant propagation by tissue culture: in Practice. Exegetics Ltd. London, 447–470.

9. Hartmann HT, Kester DE, Davies FT, and Geneve RL. 1997. Plant propagation principles and practices. Englewood Cliffs, NJ: Prentice Hall. pp. 770.

10. Hasan SZ, Ahmad T, Hafiz IA and Hussain A. 2010. Direct plant regeneration from leaves of Prunus rootstock GF-677 (*Prunus amygdalus* × *P. persica*). Pakistan Journal of Botany, 42 (6): 3817-3830.

11. Kamali K, Majidi E, and Zarghami R. 2006. Micropropagation of GF677 rootstocks (*Prunus amygdalus*×*P. persica*). Plant Genetic and Breeding. 56: 175-177.

12. Karimpour S, Davarynejad GH, Bagheri A, and Tehranifar A. 2013. *In vitro* establishment and clonal propagation of Sebri pear cultivar. J. Agr. Sci. Tech., 15: 1209-1217.

13. Kornova K, and Popov S. 2010. Effect of growth regulators for *ex vitro* rooting during adaptation of *in vitro* propagated plants to non-sterile condition. General and Applied Plant Physiology, 36 (1–2): 69–72.

14. Lloyd G, and Mc Cown B. 1981. Commercially feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by the use of shoot tip culture. Proccedings of Plant Propagation Society, 30: 421-427.

15. Loreti F, Muleo R and Morini S. 1990: Effect of light quality on growth of in vitro cultured organs and tissues. Comb. Proc. Int. Pl. Prop. Soc. 40, 615–623.

16. Marini RP, and Reighard GL. 2008. Crop load management. The Peach: Botany, Production and Uses. CAB International. (eds Layne D.R. and Bassi D.). Pp: 289-302.

17. Massai R, and Loreti F. 2004. Preliminary observations on nine peach rootstocks grown in a replant soil. Acta Horticulturae, 658: 185–192.

18. Matt, A and Johannes AJ. 2005; *In vitro* plant regeneration from leaves and internodes sections of sweet cherry cultivars (*Prunus avium* L.). Plant Cell Reports 24(8):468-476.

19. Murashige T, and Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiolgia Plantarum, 15: 473-497.

20. Nazary Moghaddam R, and Yadollahi A. 2012. Micropropagation of GF 677 rootstock. Journal of Agricultural Science. 4 (5): 131-138.

21. Nissen SJ, and Sutter EG. 1990. Stability of IAA and IBA in nutrient medium of several tissue culture procedures. Horticultural Science, 25: 800-802.

22. Oukabli A, Mekaoui A, Lahlou M, and Bari A. 2007. Selection de porte-greffes damandier tolerant a la secheres se (Al-Awamia). CRRA-Meknes.

23. Pinochet J, Fernandez C, Cunill M, Torrents J, Felipe A, Lopez MM, Lastra B, and Penyalver R. 2002. Response of new interspecific hybrids for peach to root-knot and lesion nematodes, and crown gall. Acta Horticulturae, 592: 707–716.

24. Reighard GL, and Loreti F. 2008. Rootstock development. The Peach: Botany, Production and Uses. CAB International. (eds Layne D.R. and Bassi D.). Pp: 193-220.

25. Rehman HU, Gill MIS, Dhillon WS, and Bedi S. 2014. Micropropagation of Pathernakh (*Pyrus pyrifolia* (Burm F.) Nakai) pear using explants obtained from forced cuttings. International Journal of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine. 2 (2): 54-65.

26. Ruzič DV, and Vujovič TI. 2008. The effects of cytokinin types and their concentration on *in vitro* multiplication of sweet cherry cv. Lapins (*Prunus avium* L.) Horticultural Science, 35: 12-21.

27. Shanjani PS. 2003. Nitrogen effects on callus induction and plant regeneration of Juniperus excelsa. Int. J. Agri. Biol., 5: 419-422.

28. Sotiropoulos TE, and Fotopoulos S. 2005. In vitro propagation of the PR 204/84 peach rootstock (*Prunus persica* × *P. amygdalus*): The effect of BAP, GA3, and activated charcoal on shoot elongation. Europ.J.Hort.Sci., 70 (5): 253–255.

29. Syrgiannidis GD. 1985. Control of iron chlorosis and replant diseases in peach by using the GF677 rootstock. Agricultural Research, 9: 337-345.

30. Tabachnick L, and Kester DE. 1977. Shoot culture for almond and almond×peach hybrid clones *in vitro*. Horticultural Science, 12 (6): 545-547.

31. Taha NM, and Mohamed AI. 2011. Morphological and anatomical evaluation of a new five stone fruit rootstocks. Journal of American Science, 7(3): 135.

32. Tsipouridis C, Thomidis T and Elena K. 2005. Effect of peach cultivars, rootstocks and phytophthora on iron chlorosis. World Journal of Agricultural Sciences, 1 (2): 137-142.

33. Vaez B and Salehi Z. 2006. *In vitro* rooting of hybrid GF677 (*Prunus dulcis×P. persica*). Acta Horticulturae (ISHS), 726: 171-178.

34. Zarrouk O, Aparicio J, Gogorcena Y, and Moreno MA. 2006. Graft compatibility for new peach rootstocks in nursery. Acta Horticulturae, 713: 327–329.

Effects of culture media and growth regulators on propagation of rootstock GF677 in tissue culture conditions

Bolandi A.R.[1], Hamidi H.[1] and Rezagholy A.A.[2]

[1] Agriculture and Natural Resources Research Center of Khorasan-e-Razavi, Mashhad, I.R. of Iran

[2] Islamic Azad Univercity, Khorasgan Branch, Esfahan, I.R. of Iran

Abstract

In order to study on the effects of growth regulators and culture media on micropropagation potential of GF677 rootstock, this experiment was conducted by a RCB design with three replications at the plant biotechnology laboratory "Razavi Khorasan Agricultural and Natural Resources Research Center" in 2012. In this Research, three culture media containing MS, WPM and DKW supplemented with 0, 0.5 and 1 mg l^{-1} benzylaminopurine (BAP) and with same concentrations of naphthalene acetic acid (NAA) were investigated. Studied traits were leaves number, shoot length, number of lateral branch, root number and root length. Results of variance analysis showed that there were significant differences between culture media, hormone and their interactions for all traits studied. The best answers were achieved of MS and WPM for studied traits, whereas the weakest results were related to DKW. Interaction effects revealed that in WPM medium, the highest values for number of leaves, shoot length and number of lateral branch were obtained supplemented with 1 mg l^{-1} BAP without NAA. In this experiment, the highest mean root number and root length were obtained in the WPM medium supplemented with 0.5 mg l^{-1}NAA without BAP.

Key words: Micropropagation, Tissue culture, Hormone, Hybrid, Almond, Peach