نشریه علوم باغبانی (علوم و صنایع کشاورزی)
جلد ۳۱، شماره ۳، پاییز ۱۳۹۶، ص. ۴۴۷-۴۳۸
شاپا: ۴۷۳۰ - ۲۰۰۸

Journal of Horticultural Science
Vol. 31, No. 3, Fall 2017, P. 438-447
ISSN: 2008 - 4730

بهینه‌سازی عوامل موثر در ازدیاد درون شیشه‌ای پایه میروبالان ۲۹c

زهرا شعبانی[۱]-بهرام عابدی[۲*]- ابراهیم گنجی مقدم[۳]- علی تهرانی فر[۴]

تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۰۲/۱۴
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۰۲/۳۱

چکیده

این مطالعه با هدف بررسی اثر محیط کشت و تنظیم کننده‌های رشد بر شاخه‌زایی، ریشه‌زایی و سازگاری میروبالان۲۹C انجام شد. در این مطالعه از آزمایش فاکتوریل بر پایه طرح کاملا تصادفی با ۴ تکرار و هر تکرار شامل ۵ نمونه استفاده شد. به منظور ضد عفونی نمونه های گیاهی از ۲ تیمار، شامل اتانول ۷۰ درصد در ۱ دقیقه و هیپوکلریت سدیم ۱۰ درصد در ۱۰ دقیقه استفاده شد. نتایج نشان داد هیپوکلریت سدیم ۱۰ درصد به مدت ۱۰ دقیقه، با ۴ درصد آلودگی ریز نمونه های سال جاری بهترین تیمار ضدعفونی بود. از دو نوع محیط کشت شامل MS و DKW و تنظیم کننده رشد بنزیل آمینوپورین در غلظت های ۰، ۱، ۲، ۳ و ۴ میلی گرم در لیتر در مرحله پرآوری و ایندول بوتیریک اسید در غلظت های ۰، ۱، ۲ و۳ میلی گرم در لیتر در مرحله ریشه زایی استفاده شد. نتایج نشان داد که محیط کشت MS حاوی 2 میلی گرم در لیتر بنزیل آمینو پورین با میانگین پر آوری ۶/۱۶ شاخساره، و طول ۲/۵۱ سانتی متر بیش ترین شاخه زایی و بیش ترین درصد ریشه زایی در محیط MS حاوی ۲ میلی گرم در لیتر IBA و طول ریشه به میزان ۱۰۰ درصد و ۶/۷۵ سانتی متر، به دست آمد. سازگاری گیاهچه ها به شرایط گلخانه ای با استفاده از سیستم مه افشانی، با موفقیت انجام شد بالاترین درصد بقای گیاهچه (۷۰/۰ درصد) در محیط کوکوپیت و پرلایت (۱:۱ حجمی) به دست آمد.

واژه‌های کلیدی: پرآوری، ریشه زایی، سازگاری، ضدعفونی

مقدمه

با توجه به نقش پایه های درختی در میزان رشد رویشی، زود رسی، میزان عملکرد و مقاومت در برابر بیماری ها، پایه مناسب نقش بسزایی در برنامه مدیریت باغ خواهد داشت، بطور کلی پایه های درختان میوه به دو روش جنسی و غیر جنسی تکثیر می شوند، ولی با توجه به اینکه در تکثیر جنسی تفرق صفات حاصل شده و نهال های حاصله از نظر خصوصیات ژنتیکی تغییر می یابند، از چند دهه پیش سعی بر این است تا از روش تکثیر غیر جنسی، به ویژه روش های کشت بافت برای تولید انبوه پایه های سالم و توسعه باغات میوه استفاده شود (۵). پایه های بذری میروبالان از گذشته تا به حال مورد استفاده بوده است. از ویژگی های مثبت این پایه می توان به سهولت دسترسی، ارزان بودن، محصول دهی خوب پس از بلوغ، مقاومت نسبی به خشکی، مقاومت نسبی به بیماری پوسیدگی ریشه، قدرت رشد زیاد، و قدرت استقرار بهتر اشاره کرد، که به طور وسیعی مورد استفاده قرار می گیرند. با تحقیقات بیشتر در آمریکا، سه کلون از میروبالان شناسایی شده است، که خصوصیات این کلون ها تا حدودی متفاوت می باشد ولی تمامی آن ها پایه های قوی الرشد می باشند. یکی از این کلون ها Myrobalan 29c است که مقاوم به نماتد ریشه، مقاوم به پوسیدگی ریشه بلوط و از قدرت رشد بالایی برخودار است. بیشترین محدودیت پایه Myrobalan 29c، استقرار ضعیف آن می باشد، اما به دلیل ویژگی قدرت القائ رشد، بیشتر از کلون های دیگر استفاده می شود (۶). یکی از ملزومات کشت بافت، آشنایی با رفتارهای فیزیولوژیکی و حساسیت گونه های گیاهی به آلودگی پاتوژن های مختلف می باشد. مواد مختلفی از جمله هیپوکلریت سدیم تجاری (۱۰-۵۰٪)، اتانول ۷۰ درصد و کلرید جیوه در غلظت های متفاوت و مدت زمان تیمار ازچند ثانیه تا چندین دقیقه با توجه به بافت گیاهی به منظور ضدعفونی سطحی و استقرار ریزنمونه‌ها تاکنون مورد بررسی قرار گرفته اند (۱). کمالی و همکاران در سال ۱۳۸۰ گزارش کردند بهترین روش گندزدایی برای دو رگه هلو × بادام (GF۶۷۷) استفاده از کلرید جیوه ۰/۱ درصد به مدت ۶ دقیقه می

۱، ۲ و ۴- به ترتیب دانشجوی ارشد، استادیار و استاد گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد
(*- نویسنده مسئول: Email: abedy@um.ac.ir)
۳- بخش تحقیقات علوم زراعی و باغی، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی خراسان رضوی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، مشهد، ایران
DOI: 10.22067/jhorts4.v0i0.33469

باشد. و محیط کشت DKW همراه با ۰/۵ میلی گرم در لیتر بنزیل آدنین با ضریب تکثیری حدود ۶/۰۶ شاخساره جدید به ازاء هر ریز نمونه اولیه بهترین محیط برای پرآوری این پایه بود (۱۰). در مطالعه تاثیر NAA و BAP بر پر آوری پایه ی گزیلا ۵ بیشترین تعداد ساقه در تیمار حاوی ۱میلی گرم در لیتر بنزیل آمینو پورین مشاهده شد (۲۱). و همچنین پایه میروبالان در محیط کشت MS با غلظت ۱و ۰/۵ میلی گرم در لیتر بنزیل آدنین و ۱ میلی گرم در لیتر جبرلین بیشترین پر آوری، و غلظت ۰/۱ گرم در لیتر اسید ایندول بوتریک بیشترین ریشه زایی را داشته اند (۱۳ و ۱۴). در بررسی پلاپ، پایه پاکوتاه آلو در محیط کشت MS ۱/۲ بالاترین درصد ریشه زایی را نشان داد (۱۸). یانگ نیگ در بررسی ریزازدیادی آلو چینی در شرایط درون شیشه ای نشان داد که ریشه زایی در محیط کشت MS ۱/۲ بالاترین مقدار بوده، و سازگار کردن گیاهچه های ریشه دار شده به شرایط گلخانه ای با استفاده از سیستم مه افشانی با موفقیت انجام شد (۲۳). ذوالفقاری نسب و همکاران پژوهشی در رابطه با کشت درون شیشه ای برروی دو رگه های طبیعی زردآلو× گوجه انجام دادند. نتایج نشان داد سازگار کردن شاخساره‌های ریشه‌دار به شرایط گلخانه‌ای با استفاده از سیستم مه افشانی ، با موفقیت (۳/۶۴٪) انجام شد (۲۵).

با توجه به اهمیت این پایه و لزوم تکثیر انبوه آن در کشور، لذا این مطالعه با هدف تعیین بهترین روش ضدعفونی، ارزیابی توانایی تکثیر درون شیشه ای و گزینش مناسب ترین محیط کشت با نسبت هورمونی مناسب برای ریز افزایی پایه میروبالان 29c (Myrobalan 29c) اجرا گردید.

مواد و روش‌ها

این مطالعه در آزمایشگاه بیوتکنولوژی مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی خراسان رضوی، در قالب چهار آزمایش جداگانه به شرح زیر اجرا شد.

آزمایش اول- ضدعفونی و استقرار ریزنمونه ها

تهیه ی مواد گیاهی مورد استفاده در این آزمایش، شاخه های پایه میروبالان29c که از خزانه مرکز تحقیقات کشاورزی اواخر خرداد ماه ۱۳۹۲ جمع آوری و پس از انتقال به آزمایشگاه، ابتدا به دو گروه (شاخه سال جاری وشاخه یکساله) تقسیم و سپس هر گروه از ریز نمونه ها حدود ۲۰ دقیقه زیر آب جاری شستشو داده شد. در مرحله بعد نسبت به اعمال تیمار ضدعفونی در اتاقک استریل (هود لامینار) اقدام شد. (الکل ۷۰ درصد به مدت ۱ دقیقه و هیپو کلریت سدیم ۱۰ درصد به مدت (۱۰)) بعد از هریک از مراحل فوق ۳ بار عمل آبکشی نمونه ها با آب مقطر سترون انجام شد. پس از اعمال تیمارها، نمونه‌ها در محیط کشت MS فاقد تنظیم کننده رشد کشت شده و به اتاقک رشد با میانگین دمای روز ۲۲ درجه ی سانتیگراد و دمای شب ۱۶ درجه ی سانتیگراد با فتوپریود ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی منتقل شدند. هر تیمار ضدعفونی شامل سه تکرار و هر تکرار شامل پنج ریز نمونه می باشد. پس از گذشت دو هفته، درصد آلودگی و درصد ریز نمونه های فعال یادداشت برداری و مورد ارزیابی قرار گرفت. برای کشت ریزنمونه ها از محیط کشت پایه ی MS در حالت جامد و تکمیل شده با ۳٪ ساکارز و ۷ گرم در لیتر آگار استفاده شد. pH محیط کشت به اندازه ۵/۷ تنظیم شد.

آزمایش دوم- مرحله پرآوری (شاخه زایی)

در این مرحله هدف، شناسایی تیمارهایی است که در مقایسه با سایر تیمارها براساس فاکتورهای شاخه زایی برتر هستند. تیمارهای مورد بررسی عبارتنداز: محیط کشت در دو سطح (MS، DKW) و غلظت بنزیل آمینوپورین در پنج سطح، (۰، ۱، ۲، ۳، ۴ میلی گرم برلیتر) به محیط کشت اضافه شد. ریز نمونه های بعد از کشت به اتاقک رشد با دمای روز۲۲درجه سانتیگراد و دمای شب ۱۶ درجه سانتیگراد با فتوپریود ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی با میزان نور ۲۰۰۰ تا۲۵۰۰ لوکس انتقال داده شدند. در این مرحله از آزمایش فاکتوریل دو عاملی در قالب طرح کاملا تصادفی با چهار تکرار و هر تکرار شامل پنج نمونه استفاده شد. عامل اول نوع محیط کشت در دو سطح (MS و DKW) و عامل دوم غلظت بنزیل آمینوپورین در پنج سطح، (۰، ۱، ۲، ۳، ۴ میلی گرم برلیتر) بود. که بعد از ۳ بار واکشت به فواصل هر ۳ هفته، تعداد، طول و کیفیت شاخه ها مورد ارزیابی قرار گرفت. در این پژوهش، کیفیت ریز نمونه در سه سطح A (ریز نمونه های قوی و پر رشد: فاقد نشانه های شیشه ای شدن، نکروزه شدن مریستم انتهایی و زرد شدن برگ هستند)، B (ریز نمونه های متوسط رشد: کم تر از ۱۵ درصد نمونه ها دارای نشانه های شیشه ای شدن، نکروز شدن مریستم انتهایی و زرد شدن برگ هستند) و C (ریزنمونه ها ضعیف رشد: ۱۵ تا ۳۰ درصد نمونه ها دارای نشانه های شیشه ای شدن، نکروز شدن مریستم انتهایی و زرد شدن برگ هستند) اندازه گیری شدند.

آزمایش سوم- ریشه زایی

در این مرحله شاخساره های به طول ۲-۱ سانتی متر انتخاب، و به محیط کشت ریشه زایی منتقل شدند. در این مرحله نوع محیط کشت در دو سطح (MS و DKW)، غلظت اسید ایندول بوتیریک در چهار سطح (۰، ۱، ۲، ۳ میلی گرم درلیتر)، مورد بررسی قرار گرفت. پس از ریشه دار شدن ریز نمونه ها برای تعیین بهترین محیط کشت و ترکیب تنظیم کننده های رشد ریشه زایی، تعداد و طول ریشه، تعداد برگ و طول ساقه و کیفیت ریز نمونه با درجه بندی در سه سطح A

(ریزنمونه‌های قوی و پر رشد: فاقد نشانه های شیشه ای شدن، نکروز شدن مریستم انتهایی و زرد شدن برگ هستند)، B (ریز نمونه های متوسط رشد: کم تر از ۱۵ درصد نمونه ها دارای نشانه های شیشه ای شدن، نکروز شدن مریستم انتهایی و زرد شدن برگ هستند) و C (ریزنمونه های ضعیف رشد: ۱۵ تا ۳۰ درصد نمونه ها دارای نشانه های شیشه ای شدن، نکروز شدن مریستم انتهایی و زرد شدن برگ هستند) اندازه گیری شدند. جهت آنالیز آماری از آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملا تصادفی با چهار تکرار و هر تکرار شامل سه ریز نمونه استفاده شد.

آزمایش چهارم- سازگاری

برای انتقال گیاهان به گلدان و سازگار نمودن آن ها با شرایط محیطی، پیش از کاشت بسترهای کشت ضدعفونی شدند. در این مرحله از پنج بستر کشت، شامل کوکوپیت و پرلایت (۱:۱حجمی)، کوکوپیت و پرلایت (۰/۵: ۳ حجمی)، کوکوپیت و پرلایت با نسبت (۳: ۰/۵ حجمی)، کوکو پیت (۱ حجمی) و پرلایت (۱ حجمی) استفاده شد. گیاهان پس از انتقال به گلدان در داخل ظرف هایی با سر پوش شفاف و دارای سوراخ در دستگاه مه افشان قرار داده شده، هفته اول پس از انتقال، هر روز سرپوش ها به مدت ۵ دقیقه برای هوادهی برداشته شد. از هفته دوم گیاهچه ها با محلول غذایی MS ۱/۲ تغذیه شدند و مدت هوادهی به ۱۵ دقیقه در روز افزایش یافت. سپس به تدریج با بازکردن تدریجی سوراخ ها و حذف سرپوش ها گیاهان با شرایط محیطی جدید سازگار شدند.

محاسبات آماری

پس از ثبت داده ها در نرم افزار EXCEL، تجزیه و تحلیل داده ها با استفاده از نرم افزار JMP و مقایسه میانگین به روش HSD انجام شد.

نتایج و بحث

ضدعفونی و استقرار جوانه

مطابق نتایج مقایسه میانگین (جدول۱) واکنش نوع ریز نمونه به فاکتورهای ضدعفونی سطحی متغیر می باشد. هیپوکلریت سدیم ۱۰درصد کمترین مقدار آلودگی را داشتند و روند کاهش آلودگی حاکی از افزایش غلظت هیپوکلریت سدیم است . اما سایر فاکتورهای ضدعفونی، از جمله اتانول دارای بیشترین درصد آلودگی بودند. به عبارت دیگر نوع ریزنمونه بر درصد آلودگی تاثیر دارد، کمترین میزان آلودگی مربوط به ریزنمونه سال جاری می باشد. لازم به ذکر است با این که درصد آلودگی در تیمار اتانول بسیار بالا بوده است ولی شستشوی ریز نمونه ها با آب و مایع ظرف شویی و سپس غوطه وری در اتانول ۷۰٪ و در ادامه بطور جداگانه در هیپو کلریت سدیم ۱۰ درصد توانست درصد آلودگی را به حدود صفر برساند (شکل ۱). به نظر می رسد نوع ریز نمونه نقش بسزایی در چگونگی تاثیر مواد ضدعفونی سطحی دارد. علاوه بر این زمان نمونه گیری می تواند بر درصد آلودگی و پاسخ ریز نمونه به کشت درون شیشه ای موثر باشد. مشاهده شده است که جوانه ها فعال در مقایسه با زمانی که در حال خواب هستند میزان آلودگی کم تری را نشان دادند. در این آزمایش زمان نمونه گیری خرداد ماه بود که نتایج آن با نتایج کمالی و همکاران مطابقت دارد (۱۰). ریز نمونه سال جاری نسبت به ریز نمونه یکساله از کم ترین آلودگی برخودار بود. به نظر می رسد جوان بودن ریز نمونه، صاف بودن سطح پوست، داشتن مقدار کمتری کرک و فرورفتگی سطحی وابسته به نوع ریز نمونه است (۵) و هر قدر میزان کرک و فرورفتگی سطحی در ریز نمونه کم تر باشد، سطح تماس مواد ضد عفونی سطحی افزایش یافته و اثر گذاری آن ها نیز بهبود می یابد. علاوه بر این شستشو با آب جاری و مایع ظرف شویی با افزایش کشش سطحی احتمالا تماس مواد ضدعفونی با ریز نمونه را افزایش می دهد و باعث از بین بردن آلودگی هایی همانند گرد و خاک می شود (۲۲).

تجزیه و تحلیل داده های درصد رشد نشان داد (جدول ۱) که درصد رشد جوانه های با توجه به نوع نمونه یک هفته پس از کشت در محیط استقرار اولیه، متفاوت بود. درصد رشد تنها در بهترین فاکتورهای ضدعفونی سطحی (هیپو کلریت سدیم ۱۰ درصد در ۱۰دقیقه) مورد بررسی قرار گرفت و مشاهده شد غلظت هیپوکلریت سدیم بر رشد جوانه ها تاثیر گذاشته است. هچنین نوع ریز نمونه تاثیر مثبتی بر درصد رشد دارد با توجه به (جدول ۲) و شکل (۱) بالاترین درصد رشد مربوط به نمونه های سال جاری و هیپوکلریت سدیم ۱۰درصد به مدت ۱۰ دقیقه است. هیپو کلریت سدیم سبب اکسید شدن سلول های میکروارگانیسم شده و اتانول، ماده ای دهیدراته کننده بوده که باعث تخریب غشای سلولی، از هم پاشیدگی سریع پروتئین ها و در ادامه برهم خوردن متابولیسم سلول می شود (۸ و ۱۱). لذا، می توان چنین نتیجه گرفت که کاربرد متناوب این دو ماده سبب تخریب بهتر سلول باکتری و پاتوژن ها شده و غلظت و زمان بالاتر تیمار، اثر بخشی آن ها را بهبود بخشیده است. با این وجود نوع ریز نمونه بر چگونگی نفوذ هیپوکلریت سدیم تاثیر گذاشته و به همین دلیل بیشترین درصد رشد جوانه در نمونه سال جاری مشاهده شد (۱۴).

پرآوری

تعداد شاخساره: نتایج حاصل از مقایسه میانگین نشان داد که تعداد شاخه در محیط کشت های مختلف با هم تفاوت های معنی دار

داشته و نوع تنظیم کننده رشد نیز بی تاثیر نیست (جدول ۲). در بین فاکتورهای مختلف تعداد شاخه می توان این طور بیان کرد که تنظیم کننده رشد BAP با غلظت ۲میلی گرم در لیتر در محیط کشت MS و غلظت ۱ میلی گرم در لیتر آن در محیط کشت DKW بیشترین درصد پرآوری را داشته است (شکل ۲، ۳ و ۴).

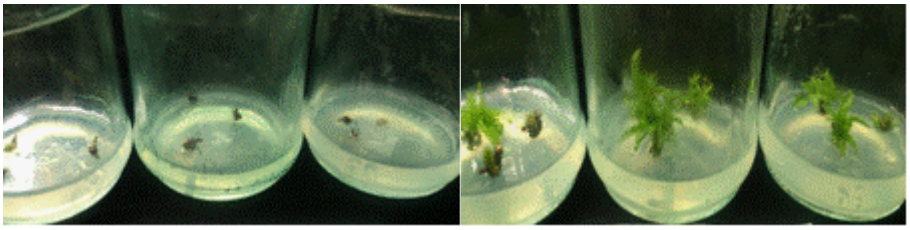
جدول۱- اثر تیمارهای ضدعفونی بر درصد آلودگی وفعالی ریزنمونه ی میروبالان۲۹c

Table 1. The effects of sterilization treatments on contamination and active percent of explants Myrobalan29C

نوع نمونه Explant type	تیمار ضد عفونی Estrelization treatment	درصد فعالی Active precent	درصد آلودگی Polletion precent
شاخه سال جاری Herbaceous shoot	اتانول 70٪ ۱ دقیقه Etanol 70% 1 min	8.0c*	80.0a
	هیپوکلریت سدیم ۱۰٪ ۱۰ دقیقه Hypo chlorit edium10% 10 min	66.6a	4.0c
شاخه یکسال Annual shoot	اتانول ۷۰٪ ۱ دقیقه Etanol 70% 1 min	8.5c	80.0a
	هیپوکلریت سدیم ۱۰٪ ۱۰ دقیقه Hypo chlorit edium10% 10 min	60.0b	4.0b

میانگین دارای حروف مختلف در هر ستون بیانگر اختلاف معنی‌دار در سطح ۵٪ نمی‌باشند.

* Mean values followed by the sameletters within a column are not significantly different according at 5 % level



شکل ۱- اثر تیمار ضدعفونی بر درصد آلودگی و فعال شدن از چپ به راست نمونه .ضدعفونی با اتانول ۷۰٪ - ضدعفونی با هیپوکلریت سدیم ۱۰٪

Figure 1- The effects of sterilization treatments on contamination and active explant. Left to right. (Ethanol, 70%, 1 min)-(Sodium hypochlorite, 10%, 10 min).

میانگین طول شاخساره : میانگین طول شاخساره ها در محیط کشت های مختلف و غلظت های مختلف تنظیم کننده‌ها رشدی مورد بررسی، متفاوت بود. در عین حال واکنش این پایه به فاکتورهای بکاربرده شده، متفاوت بود. محیط کشت MS و غلظت ۱ میلی گرم در لیتر بیشترین تاثیر رادر رشد طولی شاخساره داشتند. با افزایش غلظت BAP طول شاخساره کمتر شد (جدول ۲)

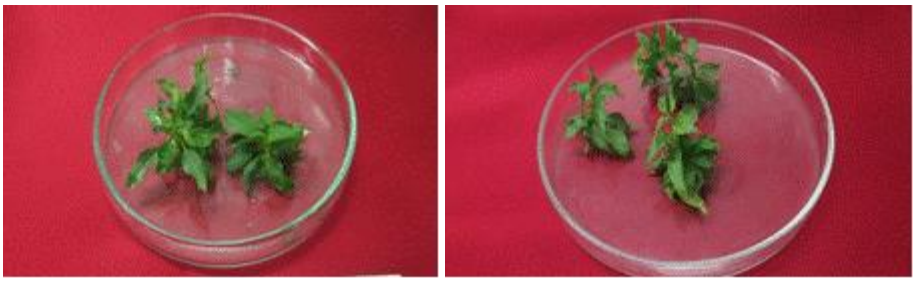
میانگین تعداد برگ : میانگین تعداد برگ ها در محیط های کشت و فاکتورهای مورد بررسی، متفاوت بود. تاثیر محیط‌های کشت بر تعداد برگ در سطح یک درصد معنی دار بود ولی تاثیر غلظت های مختلف تنظیم کننده ها رشد معنی دار نبود (جدول ۲). بر اساس نتایج بدست آمده، محیط کشت MS حاوی۲ میلی گرم در لیتر بنزیل آمینو پورین بیشترین تعداد برگ را داشتند. محیط های کشت عاری از تنظیم کننده رشد و یا غلظت های بالاتر BAP کمترین تعداد برگ را شامل شدند (جدول ۲).

ارزیابی کیفیت گیاهچه: نتایج حاصل از مقایسه میانگین نشان داد، کیفیت گیاهچه تحت تاثیر غلظت های مختلف تنظیم کننده های رشد در سطح یک در صد معنی دار بود. ولی تاثیر محیط های کشت و اثر متقابل آنها بی معنی بود (جدول ۲). با این وجود محیط کشت MSعاری از تنظیم کننده های رشد بهترین کیفیت گیاهچه را داشت (جدول ۲).

تکثیر و پرآوری شاخساره در کشت درون شیشه ای تحت تاثیر عوامل زیادی از جمله گونه، ژنوتیپ، رقم، محیط کشت، نمک های معدنی موادآلی، کربوهیدرات ها، تنظیم کننده های رشد و شرایط محیطی قرار می گیرد که از بین آنها، نقش نسبت اکسین به سایتوکنین از همه مهم تر است (۱۷). نقش و اثر BAP در شکستن غالبیت انتهایی و تحریک رشد شاخساره های جدید است. بنابراین با افزایش غلظت BAP در محیط کشت MS از۱ میلی گرم در لیتر به ۲ میلی گرم در لیتر شاخساره های بیشتر و طویل تری نسبت به محیط کشت DKW تولید شدند (۲۵).

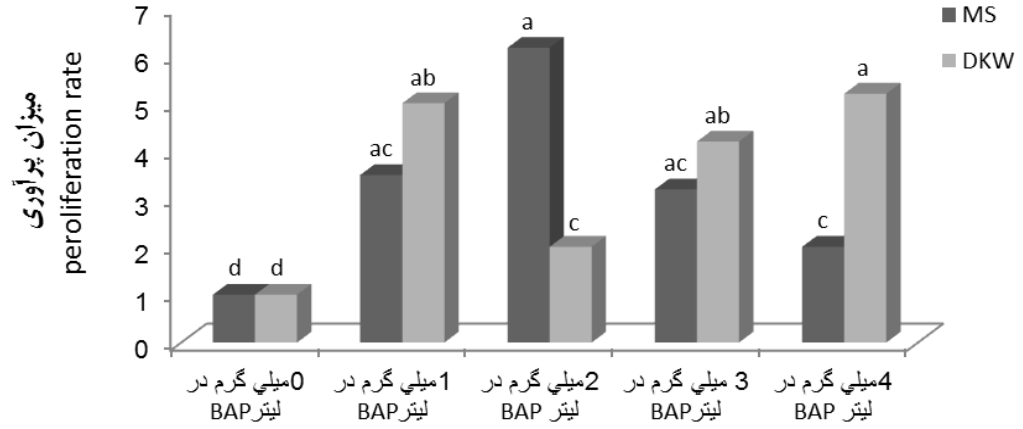
نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که اثرات متقابل بین محیط

کشت و تنظیم کننده رشد از نظر تعداد شاخساره و طول شاخساره در سطح یک معنی دار بود. سلیمانپور و همکاران (۱۶) گزارش کردند با کاهش غلظت کلسیم و منیزیم در محیط کشت DKW و با افزایش غلظت BAP شاخه زایی SL-64 افزایش می یابد.اما با در نظر گرفتن تاثیر نوع ژنوتیپ بر درصد شاخه زایی، پایه میروبالان 29c بیشترین شاخه زایی در محیط MS داشتند (۹). این در حالی است که برای دورگه گوجه × زردآلو ذوالفقاری نسب و همکاران (۲۵) بهترین نتیجه را در مرحله شاخه زایی از محیط WPM گرفتند. این نتایج همگی موید واکنش متفاوت ژنوتیپ ها به محیط های کشت، تنظیم کننده های رشد و شرایط کشت می باشد، به طوری که چاننونتا و همکاران (۳) نیز ریزافزایی دو رقم بادام نن پاریل و نوپلوس اولترا را از نظر نوع محیط کشت و غلظت تنظیم کننده های رشد بررسی کرده و گزارش نمودند که بهترین محیط کشت برای پرآوری رقم نن پاریل محیط AP به همراه BAP و IBA می باشد و برای رقم نوپلوس اولترا محیطMS با BAP و IBA است. باتوجه به اینکه تعداد شاخه در محیط کشت MS بیشتر است، در نتیجه تعداد برگ های گیاهچه ها هم نسبت به محیط کشتDKW بیشتر می باشد. اما در مورد کیفیت گیاهچه، بهترین کیفت مربوط به محیط کشت DKW به دلیل کم بودن غلظت نمک ها در این محیط است (۹). در این پژوهش مشخص شد که نوع محیط کشت تاثیر بسزایی بر سلامت گیاهچه ها و در نتیجه پرآوری موفق ریز نمونه ها دارد، به طوری که زردی و نکروز شدن برگ ها و مردن انتهای بافت برگ ها از جمله نارسایی های رشد بودند که در محیط کشت MS مشاهده شدند و این نتایج با یافته های پرز تورنر و همکاران (۱۹) که محیط کشت WPM را برای ریزافزایی ارقام مختلف زردآلو مناسب تشخیص دادند، مطابقت دارد. در کلسیم عنصری است که نقش بسیار مهم در ساختار دیواره یاخته ای دارد، ولی دارای تحرک بسیار کمی در داخل بافت گیاهی بوده و بازده و حرکت آن در داخل گیاه تابع تعرق گیاه است و در شرایط درون شیشه ای زمانی که میزان رطوبت بالا باشد تعرق گیاه و در نتیجه جذب کلسیم کاهش پیدا کرده و قهوه ای شدن و مردن بافت ها در نتیجه تجزیه و تخریب یاخته ها رخ می دهد (۱۴).



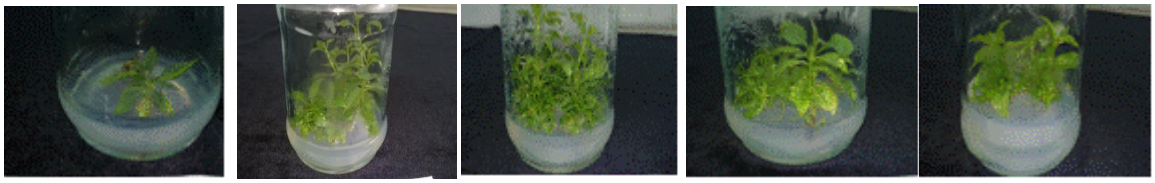
شکل۲- مقایسه پرآوری پایه رویشی میروبالان c۲۹ گیاهچه ها در محیط کشت مختلف از چپ به راست. محیط کشتDKW – محیطMS

Figure 2- Compersiune in different culture mediaof plants Proliferation vegetative rootstock Myrobalan29c. From left to right. (DKW)- (MS).



شکل۳- اثر متقابل محیط کشت× غلظت تنظیم کننده رشد بر میزان پرآوری تکثیر میروبالان۲۹c

Figure 3- The effecte interaction between culture media × growth regulators on propagation proliferation rate of Myrobalan29C



شکل٤- مقایسه سرعت پرآوری پایه ی رویشی میروبالان c۲۹ در غلظت های مختلف BAP در محیط کشتMS. از چپ به راست . شاهد- غلظت ۱ میلی گرم درلیتر - غلظت ۲ میلی گرم درلیتر - غلظت ۳میلی گرم درلیتر - غلظت ٤ میلی گرم درلیتر

Figure 4- Compersiune differente growth regulatorsBAP in culture media MS proliferation rate vegetative rootstock Myrobalan29c. from left to right .A (0mg/LBAP).B(1mg/l BAP).C(2mg/l BAP).D(3mg/l BAP).E(4mg/l BAP)

ریشه‌زایی

نتایج حاصل از مقایسه میانگین داده های مرحله ریشه زایی نشان داد با افزایش غلظت IBA از ۰ به۲ میلی گرم در لیتر درصد ریشه زایی، طول ریشه، تعداد ریشه، تعداد برگ و کیفیت گیاهچه افزایش می یابد (جدول۲). بطوری که بهترین تشکیل ریشه در محیط کشت MS با ۱۰۰٪ ریشه زایی و بطور متوسط با ۶/۷۵ سانتی متر طول مشاهده شد (جدول ۲ و شکل ۵). گوراج و همکاران طی تحقیقی اعلام کرد کلسیم برای انقباض دیواره سلولی مناسب می باشد و کمبود کلسیم باعث ضعیف شدن رشد ریشه می شود (۸). دامیناو و همکاران همچنین گزارش کرد که محیط کشت MS ½ (غلظت عناصر پر مصرف و کم مصرف به نصف کاهش یافت) بیشترین تعداد ریشه را در پایه آلو القاء کرد (۴). القای ریشه با کاربرد ۲ میلی گرم در لیتر IBA در کشت درون شیشه ای برای چند گونه از جنس Prunus گزارش شده است (۲۰). معمولا تولید ریشه در گیاهان تحت تاثیر سنتز، متابولیسم، انتقال و مسیرهای انتقال علایم اکسین می‌باشد (۸ و۲۳).

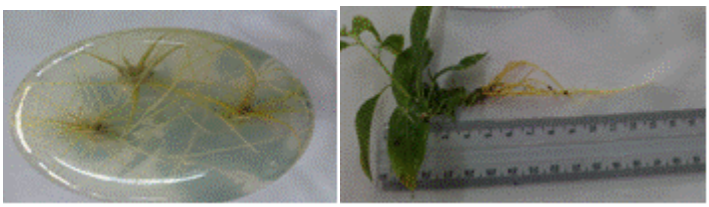
جدول۲- اثر متقابل محیط کشت × تنظیم کننده رشد بر تعداد شاخه، طول شاخساره، تعداد برگ و کیفیت گیاهچه

Table 2- The effecte interaction between culture media × growth regulators on the numbers, the length and quality of the shoots and number leaf

محیط کشت Culture medium	تنظیم کننده رشد(میلی گرم در لیتر) Growth regulator(mg/L^{-1})	تعداد شاخه Shoot number	طول شاخه Shoot length	تعداد برگ Leaf number	کیفیت Quality
MS	0	1.00d	1.95b	7.91c	a
	1	3.58ab	2.51a	10.16ab	b
	2	6.16a	2.33a	10.33a	b
	3	3.25bc	2.31a	9.66b	b
	4	1.83c	1.86b	9.41b	b
DKW	0	1.00d	1.39c	7.08cd	ab
	1	4.83a	1.22cd	6.99c	cd
	2	1.75c	1.06cd	5.49de	d
	3	3.92bc	1.04d	6.91cd	bc
	4	4.08ab	0.88d	5.16e	cd

میانگین دارای حروف مختلف در هر ستون بیانگر اختلاف معنی دار در سطح ۵٪ می‌باشند

* Mean values followed by the sameletters within a column are not significantly different at 5 % level



شکل۵- ریشه زایی در محیط کشت MS حاوی ۲ میلی گرم در لیتر IBA.

Figure 5- Rooting in culture media MS contain 2mg/l IBA

سازگاری

موفقیت ریزازدیادی به توانایی انتقال گیاهچه ها به بستر گلدان و سازگار کردن موفق آن ها به شرایط محیط بیرون بستگی دارد. در سازگاری گیاهچه های میروبالانc۲۹، مشخص شد که گیاهچه هایی به دلیل آمادگی قرار گرفتن در مقابل تنش محیطی ناشی از تغییر شرایط محیط بود و همچنین بهترین بستر کشت برای سازگاری، بستر کوکوپیت و پرلایت (۱:۱ حجمی) بود (شکل ۶). سازگاری مستقیما تحت تاثیر ریشه زایی بوده و بنابراین گیاهچه هایی که کیفیت ریشه بالایی دارند بهترین سرعت القا را داشته اند (۱۲). همچنین سازگاری موفق گیاهچه های زردآلو را با انتقال آن ها به گلدان های دارای پیت و پرلیت به نسبت۱ به۱ و کاهش تدریجی رطوبت به دست آوردند (۱۹).

تشکر و قدردانی: از مسئولین دانشکده کشاورزی و مرکز تحقیقات و منابع طبیعی خراسان رضوی به خاطر مساعدت در انجام این طرح صمیمانه سپاسگزاری می شود.

جدول۳- اثر متقابل محیط کشت × تنظیم کننده رشد بر گیاهچه ریشه دار، طول ریشه، تعداد ریشه، ارتفاع ریشه، تعداد برگ و کیفیت گیاهچه.

Table 3- The effecte interaction between culture media × growth regulators on rooting plants, numbar plants, number and root length, leaf number and stem length and quality of explants

محیط کشت Culture medium	تنظیم کننده رشد growth regulators(mg/L^{-1})	تعداد گیاهچه ریشه دار Root Percent	طول ریشه Root length	تعداد ریشه Root number	ارتفاع گیاهچه stem length	تعداد برگ Leaf number	کیفیت Quality
MS	0	1.75b	5.75ab	7.00bc	5.75bc	15.75a	a
	1	2.75ab	3.75bc	10.25ab	5.75bc	13.25a	a
	2	3.25a	6.75a	10.75a	7.00ab	13.25a	a
	3	2.00b	5.50ab	13ab	8.75a	16.50a	a
DKW	0	1.75b	2.75c	2.75c	6.50b	1.50a	a
	1	2.25ab	3.00c	3.50c	3.75c	14.50a	a
	2	2.50ab	3.62bc	11.00ab	7.00ab	13.75a	a
	3	1.75b	4.00bc	6.50bc	6.50b	14.00a	a

میانگین‌های دارای حروف مختلف در هر ستون بیانگر اختلاف معنی‌دار در سطح ۵٪ نمی‌باشند

*** Mean values followed by the sameletters within a column are not significantly different at 5 % level**

شکل ٦- مقایسه سازگاری گیاهچه در بسترهای کشت، از راست به چپ. کوکوپیت و پرلایت (۰/۵: ۳) - کوکوپیت - کوکوپیت و پرلایت (۳: ۰/۵) – پرلایت- کوکوپیت و پرلایت (۱: ۱)

Figure 6- Compersiune plants acclimatization in substrate from right to left .A (Coco Peat and Perlite 3:0/5 V).B(Coco Peat 100%V). C (Coco Peat and Perlite 0.5:3V).D (Perlite100%V). E (Coco Peat and Perlite1:1V).

منابع

1- Asadi A. A., Vedadi C., Rahimi M., and Naserian B. 2009. Effect of plant growth hormones on root and shoot regeneration in rose (*Morrasia*) under in-vitro conditions, Bioscience Research, 6(1): 40-45.

2- Azadi P., Khosh- Khui M., Beyramizadeh E., and Bagheri H. 2007. Optimization of factors affecting in vitro proliferation and rooting of Rosa hybrida L. cv. 'Rafaela', International Journal of Agricultural Research, 2(7): 626-631.

3- Channuntapipat Ch., Sedgley M., and Collins G. 2003. Micropropagation of almond cultivars Nonpariel and Ne Plus Ultra and the hybrid rootstock *Titan* × *Nemagard*. Sci. Hort. 98:473-484.

4- Damiano.C., Delia G. 2009. In vitro multiplication, rooting acclimatization and related protein profiles of rootstock citation (*Prunus.Salicina* × *prunus. Persica*). Acta Horticulturas, 812: 218-227.

5- Hartmann H.T., Kester D.E., and Davies F.T. 1990. Plant propagation, principles and practices. Prentice-Hall

International, New Jersey, USA, Pp, 145-89.

6- Ganji Moghadam, A., and Abdollahzadeh A. 2009. Guide fruit trees rootstock (Translate). Khorasan Razavi Agricultural and Natural Resources Research Center،S155-184. (Edited book).

7- Gudin S. 2000. Rose: genetics and breeding. Plant Breeding Review, 17: 59-189.

8- George E. F. 2008. Plant propagation by tissue culture. Plant Cellular Reproduction, 18: 6-113.

9-Izad Panah. 2004. The effects of age and genotype on theway propagation Sweet Cherry (*Prunus avium*) in vitro.Natural Sources،64:63-70. (in Persian)

10-Kamali K., Majidi A., and Zarghami R. 2002. Determine the most suitable culture medium and growth conditions Micropropagationof vegitative GF677 (hyberid Paech×Almound) rootstock. Journal and seed, 17:38-47. (in Persian)

11- Larson E. L., and Morton H. E. 1991. Disinfection, Sterilization and Preservationon, In Alcohols.

12-Mahdavyan M., Bozari N., and Abdollahi H. 2010. Effect of media and plant growth regulators on proliferation and rooting Mahaleb (Sent losi 64) of vegitative rootstock .Journal and seed، 1:15-26. (in Persian)

13- Movsiuw A. 2011. In vitro propagation of virus-free Myrobalan 29c rootstock. GRI, 7349:101-102.

14- Ruzic D. V., Vajovic. T. I., 2013. The effect of cytoknins types and their concentration on in vitro multiplication of sweet cherry. Horticulture Scienc, 35: 12-21.

15- Sana B., Ghosh D., Saha M., and Mukherjee J. 2006. Purification and characterization of a salt, solvent, detergent and bleach tolerant protease from a new gamma- Proteobacterium isolated from the marine environment of the Sundarbans. Process Biochemistry, 41(1): 208-215.

16- Soleymanpor A., and Bozari N. 2012. Effect of media and plant growth regulators in micro propagation Mahaleb (SL- 64) of vegitative rootstock.Especially a genetic Congress Iran, 12:1-5.9. (in Persian)

17- Pati P. K., Rath S. P., Sharma M., and Ahuja P. S. 2005. Micropropagation, protoplast cu lture and its implications in the improvement of scented rose. Acta Horticulturae, 547: 147-158.

18- Plopa C., Dutu N., Isac V., Mazilu C., Ancu S. 2010. Factors Influencinrg in Vitro Propagation of Myrobolan Dwarf Plum Root stock**.** ISHS Acta Horticulturae, 966:221-223**.**

19- Perez-Tornero O., Opez J.M.L. 2000. Effect of basal media and growth regulators on the in vitro propagation of apricot (*prunus armenica* L.) cv. Cannino, j. Hort. ci, Biotech, 75: 283-286.

20- Pruski K., Astatkle T. 2005. Tissue culture propagation of monogolian cherry (*prunus froticosa*) and nanking cherry (*Prunus tomentosa*). Plant Cellular Tissue and Organ Culture, 82: 207-211.

21- Yadollahi A., Nazari Moghadam Aghaee R., and Moeeni A. 2009.Effect composition BAP and NAA on prolifiration Gisela rootstock. Especially a genetic Congress Iran, 3:1-5. (in Persian)

22- Yari F., and Mosavi A. 2012. Optimization in vitro five varieties of cut roses (Roza hybrida L.). Biotechnology in agriculture، 10: 17-26.

23- Ying-Ning Z. 2010. Micropropagation of Chinese Plum (*Prunus salicina* Lindl.) Using Mature Stem Segments. Not. Bot. Hort. Agrobot. Cluj, 38 (3): 214-218.

24- Zlesak D. 2006. Rose. In Flower Breeding and Genetics, 695-740 (Ed N. Anderson). Springer Netherlands.

25-Zolfaghari Nasab R., Khosro shahi M., Gerigoryan V., and Matlabi azar A. 2005. The effects in vitro propagation natural hybrid Apricot×plum. Journal of Horticultural Science and Technology, 5: 81-92 (in Persian)

Journal of Horticultural Science
Vol. 31, No. 3, Fall 2017, P. 438-447
ISSN: 2008 - 4730

نشریه علوم باغبانی (علوم و صنایع کشاورزی)
جلد ۳۱، شماره ۳، پاییز ۱۳۹۶، ص. ۴۴۷-۴۳۸
شاپا: ۴۷۳۰ - ۲۰۰۸

Optimization of Factors Affecting in vitro Propagation of 'Myrobalan 29c' Rootstock

Z. Shabani[1]- B. Abedi[2*]- E. Ganji Moghadam[3]- A. Tehranifar[4]

Received: 04-05-2014
Accepted: 21-05-2017

Introduction: This study was conducted aimed to consider the effects of culture medium and the concentration of growth regulators on proliferation, rooting and the acclimatization of Myrobalan29C. This study was performed as a factorial experiment in a completely randomized design (CRD) with four replications where each plot contained five explants. Given the role of trees rootstock of growth rate vegetative in the early maturity، yield and disease resistance will be suitable rootstock that has an important role in program garden management. In total rootstock of fruit trees have be propagation sexual and asexual methods, however، given that in sexual reproduction the resulting dispersion characteristics and the resulting seedlings changed by genetics, it is tried for decades to asexual propagation methods in specially tissue culture methods healthy rootstock for mass propagation and used the development of orchards. Seedling rootstock Myrobalan had been used in the past. The rootstock can be positive features cited the ease of access, to be cheap, good yields after maturity. In study, the effects of NAA and BAP on proliferation of Gisala5 rootstock showed the most shoot treated in mediacontaining 1mg/l BAP. Investigated Chinese plum in vitro micropropagation showed that 1/2 MS media had the highest percentage rooting, and acclimatization rooted plantlets to greenhouse conditions was using the system miss successfully. Due to the importance and essential to achieve an efficient protocol for the mass propagation of Myrobalan 29C in Iran, this study was conducted with the main purpose of evaluating the most suitable media culture and plant growth regulators in micropropagation of Myrobalan 29C.

Material and Methods: The explants were collected from shoots of Myrobalan 29C rootstock maintained in the experimental greenhouse of Khorasan Razavi Agricultural and Natural Resources Research Centre (of Mashhad, Iran), on June 25, 2013. The explants were washed by water and dishwashing liquid to removed surface contamination. Then they were divided to some parts containing one bud and were sterilized with ethanol 70% 1 min and sodium hypochlorite 10% at 10 min. Proliferation was performed in two kind of culture medium (MS and DKW) that supplemented with plant growth regulators BAP (0, 1, 2, 3, 4 mg l^{-1}). The rootstocks of in this step, after subculture three (21 days between each subculture), the numbers, the length and quality of the shoots (explants strong growth, with no signs of vitrification, necrosis of leaf are yellowing terminal meristem), b– less than 15% have the symptoms of vitrification, necrosis of leaf are yellowing terminal meristem, and c– explant weak, 15-30% have the symptoms of vitrification, necrosis of leaf are yellowing Terminal meristem) were measured. This stage was carried with four replications and each replicates with five samples. Two culture media (MS and DKW) were used for rooting, which supplemented with indole-3-butyric acid (IBA) at four levels (0, 1, 2, 3 mg l^{-1}). This stage was carried with four replications and each replicates with three samples. After being rooted explants, the best cultured media and combination of rooting growth regulators number and root length, leaf number and stem length and quality of explants were recorded. Acclimatization used in substrate including Coco Peat - Perlite 3:0/5 V, Coco Peat 100%V، Coco Peat - Perlite 0.5:3V, Perlite100%V and Coco Peat - Perlite1:1V).

Results and Discussions: Results showed that the 10% sodium hypochlorite for 10 min, with 4% decay was the best treatment for sterilization. The results showed that the proliferation average was 6/16 in MS medium with 2 mgl^{-1} BAP and the most percent of rooting and root length were about 100% and 2/51 cm in MS medium with 2mgl^{-1} of IBA, respectively. The acclimatization of plantlets to greenhouse conditions was successful. The highest rate of plantlets survival (about 70%) was obtained from substrate Cocopit and Prlit (1; 1 V). In the

1, 2 and 4- Master Horticulture, Assistant Professor and Professor, Department of Horticulture, Ferdowsi University of Mashhad, Respectively
(*- Corresponding Author Email: abedy@um.ac.ir)
3- Crop and Horticultural Science Research Department, Khorasan Razavi Agricultural and Natural Resources and Education Center, AREEO, Mashhad, Iran

present study, explants year compared annual explant least contamination had enjoyed. It seems that the young explants, smooth the surface of the skin, having the least amount of crack depend on the type of surface depressions explants and the crack and lower depressions the surface explants increase surface contact area disinfectants and also improve its impact. In this study found that the type of medium a significant impacted on the health of plants and so the proliferation of explants was successful. Usually root production in plants under the influence of synthesis, metabolism, and transport is auxin signaling pathways. Therefore acclimatization directly affected the rooting of plants that had high quality and the best rate of induction.

Conclusions: The results of this research showed that we can duplicate Myrobalan29c rootstock by in vitro method. According in this research, MS media including BAP and IBA plant growth regulators are the most suitable for micro propagation.

Keywords: Acclimatization, Disinfection, Rooting and Proliferation