دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان
نشریه پژوهش‌های تولید گیاهی
جلد بیست و ششم، شماره سوم، ۱۳۹۸
۱۶۷-۱۷۷
http://jopp.gau.ac.ir

افزایش انبوه درون‌شیشه‌ای میروبالان C ۲۹ (*Prunus cerasifera* L.): یک پایه رویشی برای میوه‌های هسته‌دار

زهرا شعبانی[۱]، *بهرام عابدی[۲]، ابراهیم گنجی‌مقدم[۳] و علی تهرانی‌فر[۴]

[۱]کارشناسی‌ارشد گروه باغبانی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران، [۲]استادیار گروه باغبانی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران، [۳]دانشیار بخش تحقیقات علوم زراعی و باغی، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی خراسان رضوی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، مشهد، ایران، [۴]استاد گروه باغبانی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران

تاریخ دریافت: ۹۷/۰۶/۱۰ ؛ تاریخ پذیرش: ۹۷/۰۹/۲۰

چکیده

سابقه و هدف: هدف اصلی این مطالعه بررسی تکنیک‌هایی برای افزایش درون‌شیشه‌ای پایه میروبالان C ۲۹ (یک پایه برای درختان هسته‌دار) بود. ازدیاد درختان میوه در شرایط درون‌شیشه‌ای یک روش قابل‌دسترس برای افزایش انبوه است. تکثیر درون‌شیشه‌ای گیاهان چوبی نسبت به گیاهان علفی دارای مشکلات بیش‌تری بوده و گیاهان چوبی از نظر باززایی درون‌شیشه‌ای شاخساره‌های نابجا از ریزنمونه و همچنین از نظر ریشه‌زایی درون‌شیشه‌ای سرسخت هستند، از این‌رو گزینش محیط‌های کشت مناسب‌تر برای انگیزش باززایی شاخساره از ریزنمونه‌ها، پرآوری و ریشه‌زایی برای توسعه سیستم ریزازدیادی در درختان میوه ضروری است.

مواد و روش‌ها: این آزمایش به‌منظور ارزیابی بهترین محیط کشت و تنظیم‌کننده رشد برای ریزازدیادی پایه میروبالان C ۲۹ به‌صورت آزمایش فاکتوریل بر پایه طرح کاملاً تصادفی با چهار تکرار و هر تکرار شامل پنج نمونه در مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی خراسان رضوی انجام شد. به‌منظور پرآوری، محیط کشت در دو سطح (*MS* و *QL*) و غلظت بنزیل آمینوپورین و تیدیازرون در پنج سطح (۰، ۱، ۲، ۳ و ٤ میلی‌گرم در لیتر) در مرحله ریشه‌زایی از دو محیط کشت *QL* و *DKW* و تنظیم‌کننده رشد نفتالین استیک اسید در غلظت‌های (۰، ۱، ۲ و۳ میلی‌گرم در لیتر) و در مرحله سازگاری از بستر کشت، کوکوپیت و پرلایت (۵۰ : ۵۰ حجمی) استفاده شد. در مرحله شاخه‌زایی بعد از سه بار واکشت به فواصل هر سه هفته تعداد گیاهچه، طول گیاهچه و تعداد برگ و در مرحله ریشه‌زایی پس از شش هفته، صفات تعداد و طول ریشه، تعداد برگ، طول ساقه گیاهچه و درصد ریشه‌زایی مورد ارزیابی قرار گرفت.

یافته‌ها: نتایج نشان داد بیش‌ترین ضریب تکثیر شاخه با ۳/٤۱ در محیط کشت *MS* حاوی دو میلی‌گرم در لیتر بنزیل آمینو پورین به‌دست آمد و همچنین بالاترین طول گیاهچه ۲/۵، ۲/۳۳ و ۲/۲۹ سانتی‌متر، به‌ترتیب در سه غلظت یک، دو و سه میلی‌گرم در لیتر بنزیل آمینو پورین مشاهده شد. بیش‌ترین درصد ریشه‌زایی (۱۰۰ درصد) و طول ریشه ۲/۱۲ سانتی‌متر در محیط *DKW* به‌ترتیب در غلظت یک و سه میلی‌گرم در لیتر *NAA*، ثبت شد. سازگاری گیاهچه‌ها با استفاده از سیستم مه‌افشانی، در گلخانه با

* مسئول مکاتبه: abedi@um.ac.ir

موفقیت انجام شد که بیش‌ترین درصد بقای گیاهچه (۵۰ درصد) در محیط *DKW* با یک میلی‌گرم در لیتر *NAA* و در بستر کوکوپیت و پرلایت (۵۰: ۵۰ حجمی) به‌دست آمد.

نتیجه‌گیری: ترکیب محیط کشت و غلظت تنظیم‌کننده رشد بر روی پرآوری و ازدیاد پایه‌های هسته‌دار تأثیر دارد. در این آزمایش غلظت بهینه بنزیل آمینو پورین و نفتالین استیک اسید برای پرآوری و ریشه‌زایی میروبالان C ۲۹، به‌ترتیب دو و یک میلی‌گرم در لیتر بود. لازم به ذکر است غلظت بالاتر از دو میلی‌گرم در لیتر بنزیل آمینو پورین و نفتالین استیک اسید برای این گیاه توصیه نمی‌شود. معمولاً تولید ریشه تحت‌تأثیر سنتز، متابولیسم و حرکت اکسین در گیاهچه است بنابراین سازگاری گیاهچه‌ها به‌طور مستقیم با کیفیت ریشه و بیش‌ترین ضریب ریشه‌زایی در ارتباط است.

واژه‌های کلیدی: پرآوری، تنظیم‌کننده رشد ریشه‌زایی، محیط کشت

مقدمه

آلو[1] یکی از میوه‌های مهم مناطق معتدله است که دامنه پراکندگی آلو و گوجه از سایر میوه‌های خزان‌دار وسیع‌تر است (۸). در گذشته برخی ارقام آلو به راحتی از طریق پاجوش یا قلمه قابل تکثیر بودند، ولی امروزه به‌منظور دست‌یابی به درختان با اندازه‌های کوچک قابل مدیریت که زودبارده بوده و تولید منظم و با کیفیت داشته باشند و همچنین اگر استمرار تولید اقتصادی آلو، پا بر جا بماند روش‌های کاشت متراکم مورد نیاز است، بنابراین پیدا کردن پایه پاکوتاه مناسب ضروری می‌باشد (۷). میروبالان پایه بسیار مهمی است که به‌طور وسیعی برای آلو و گوجه استفاده می‌شود. از ویژگی‌های این پایه می‌توان به سهولت دسترسی، ارزان بودن، محصول‌دهی خوب پس از بلوغ، مقاومت به خشکی و مقاومت نسبی به بیماری پوسیدگی ریشه اشاره کرد. کشت بافت یکی از روش‌های ازدیاد این پایه است. به‌طورکلی کشت بافت گیاهان چوبی نسبت به گیاهان علفی دارای مشکلات بیش‌تری است. گیاهان چوبی (به‌ویژه درختان میوه هسته‌دار) از نظر باززایی درون‌شیشه‌ای شاخساره‌های نابجا از ریزنمونه (به‌ویژه از ریز نمونه‌های بالغ) و همچنین از نظر ریشه‌زایی درون‌شیشه‌ای سرسخت هستند، از این‌رو گزینش محیط کشت مناسب برای انگیزش باززایی شاخساره از ریزنمونه‌ها، پرآوری و ریشه‌زایی برای توسعه سیستم ریزازدیادی در درختان میوه ضروری است (١٤).

یدالهی و همکاران (۲۰۱۱) با بررسی تأثیر نفتالین استیک اسید و بنزیل آمینو پورین بر پرآوری پایه گزیلا بیش‌ترین تعداد ساقه را در تیمار حاوی یک میلی‌گرم در لیتر بنزیل آمینو پورین مشاهده کردند (۲۲). در بررسی روی ریزازدیادی میروبالان، بیش‌ترین شاخه‌زایی در محیط کشت *QL* که حاوی یک میلی‌گرم در لیتر *BA* بود، مشاهده شد (١٤). در پژوهشی اثر غلظت‌های مختلف بنزیل آدنین و تیدیازرون بر پرآوری شاخساره بادام[2] مورد بررسی قرار گرفت که بیش‌ترین درصد پرآوری شاخساره در محیط کشت حاوی ٤ میلی‌گرم در لیتر تیدیازرون به‌دست آمد (۱۹). در بررسی یانگ نینگ (۲۰۱۰) و مهدویان و همکاران (۲۰۱۱) روی آلو و محلب[3] بالاترین درصد ریشه‌زایی در محیط *DKW* به دست آمد و سازگار کردن شاخساره‌های ریشه‌دار شده به شرایط گلخانه‌ای با استفاده از سیستم مه‌افشانی با موفقیت انجام شد (۱۰ و ٢٤). در بررسی‌هایی که روی پایه‌های محلب، گیزلا و بادام انجام شد، غلظت یک میلی‌گرم بر لیتر نفتالین استیک اسید بیش‌ترین

1- *Prunus. domestica*

2- *Prunus. amygdalus*

3- *Prunus. mahaleb*

ریشه‌زایی را دارا بود و گیاهچه‌هایی که کیفیت ریشه بالایی داشتند، بهترین سرعت القا در مرحله سازگاری را نشان دادند (٤، ١٩ و ٢١).

این مطالعه با هدف بررسی اثر محیط کشت، غلظت تنظیم‌کننده‌های رشد و سازگاری پایه میروبالان C ٢٩ از طریق کشت بافت به‌منظور کاهش هزینه‌های تکثیر آن، در قالب سه آزمایش مستقل انجام شد.

مواد و روش‌ها

آزمایش اول (مرحله شاخه‌زایی): در این آزمایش از ریزنمونه‌های (جوانه‌های جانبی شاخه یک‌ساله) پایه میروبالان C ٢٩ که پس از ضدعفونی در اتانول ٧٠ درصد به‌مدت یک دقیقه و سه مرتبه شست و شو با آب مقطر و سپس ضدعفونی با هیپوکلریت سدیم ١٠ درصد به‌مدت ٢٠ دقیقه و سه مرتبه شست و شو با آب مقطر و استقرار در محیط پایه *MS* و بعد سه هفته جوانه فعال شدند که جوانه‌های فعال شده به محیط شاخه‌زایی برای تکثیر منتقل شده بودند، استفاده شد. تیمارهای مورد بررسی شامل: محیط کشت در دو سطح *MS*[1] و *QL*) و غلظت بنزیل آمینوپورین و تیدیازورن در پنج سطح (٠، ١، ٢، ٣ و ٤ میلی‌گرم بر لیتر) بود. ریزنمونه‌ها بعد از کشت به اتاقک رشد با دمای ٢١ درجه سانتی‌گراد و فتوپریود ١٦ ساعت روشنایی و هشت ساعت تاریکی با میزان نور ٢٠٠٠ تا ٢٥٠٠ لوکس منتقل شدند. این آزمایش به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با چهار تکرار (هر تکرار شامل پنج ریز نمونه) به اجرا در آمد. بعد از سه بار واکشت به فواصل هر سه هفته، ضریب تکثیر (تعداد شاخه تقسیم بر تعداد ریز نمونه)، طول گیاهچه و تعداد برگ مورد ارزیابی قرار گرفت.

آزمایش دوم (مرحله ریشه‌زایی): در این مرحله شاخساره‌های یک تا دو سانتی‌متری انتخاب شده و به محیط ریشه‌زایی منتقل شدند. اثرات نوع محیط کشت در دو سطح *QL* و *DKW*) و غلظت اسید نفتالین استیک در چهار سطح (٠، ١، ٢ و ٣ میلی‌گرم در لیتر) مورد بررسی قرار گرفت. پس از شش هفته صفات تعداد و طول ریشه، تعداد برگ، طول ساقه گیاهچه و درصد ریشه‌زایی بررسی گردید.

آزمایش سوم (مرحله انتقال و سازگاری): برای انتقال گیاهان به گلدان و سازگار نمودن آن‌ها با شرایط محیطی، پیش از کاشت گلدان‌ها و بسترهای کشت ضدعفونی شدند. بستر کشت، کوکوپیت و پرلایت (٥٠ : ٥٠ حجمی) بود. گیاهان پس از انتقال به گلدان در داخل ظرف‌هایی با سر پوش شفاف و دارای سوراخ در دستگاه مه‌افشان قرار داده شده، هفته اول پس از انتقال هر روز سرپوش‌ها به‌مدت ٥ دقیقه برای هوادهی برداشته شد. از هفته دوم گیاهچه‌ها با محلول غذایی *MS* ١/٢ تغذیه شدند و مدت هوادهی به ١٥ دقیقه در روز افزایش یافت. سپس با بازکردن تدریجی سوراخ‌ها و حذف سرپوش‌ها به‌تدریج گیاهان با شرایط محیطی جدید سازگار شدند. درصد بقا گیاهچه‌های به روش زیر به‌دست آمد:

$$\text{درصد بقا} = \frac{\text{تعداد گیاهچه‌های سازگارشده}}{\text{تعداد کل گیاهچه‌ها}} \times ١٠٠ \qquad (١)$$

محاسبات آماری: پس از ثبت داده‌ها در نرم‌افزار EXCEL، تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار JMP و مقایسه میانگین با آزمون HSD انجام شد.

1- Murashin & Skoog, Qurin & Lepoivre

نتایج و بحث

مرحله پرآوری

ضریب تکثیر: طبق جدول تجزیه واریانس بین محیط کشت، تنظیم‌کننده‌های رشد و اثر متقابل بین آن‌ها تفاوت معنی‌داری در سطح احتمال یک درصد در مقدار شاخه‌زایی گیاهچه‌ها مشاهده شد (جدول ۱). مقایسه میانگین شاخه‌زایی نشان داد بیش‌ترین ضریب تکثیر به‌میزان ۳/٤۱ شاخه در محیط کشت *MS* حاوی دو میلی‌گرم در لیتر بنزیل آمینو پورین و کم‌ترین ضریب تکثیر به‌میزان ۰/۵۹ شاخه در محیط کشت *QL* با سه میلی‌گرم در لیتر بنزیل آمینو پورین تشکیل شد (جدول ۲). در بررسی پایه *GF677* بیش‌ترین پرآوری در محیط *MS* با یک میلی‌گرم در لیتر بنزیل آمینو پورین به‌دست آوردند (۹). دانشور حسینی (۲۰۰۹) در ریزازدیادی پایه محلب بهترین نتیجه را در غلظت دو میلی‌گرم در لیتر بنزیل آمینو پورین گزارش کرده‌اند (۳).

ترکیب محیط کشت بر روی پرآوری و ازدیاد پایه‌های هسته‌دار تأثیر دارد، به‌طوری‌که پس از انجام واکشت‌های متعدد، تعداد شاخساره در محیط *QL* در مقایسه با محیط *MS* و *WPM* به‌طور معنی‌داری کاهش یافت (۱). غلظت عناصر غذایی ازت، پتاسیم، منیزیم و همه عناصر پرمصرف در محیط کشت *WPM*، *DKW* و *QL* نسبت به محیط *MS* کم‌تر است که این امر در کاهش پرآوری در این محیط‌های کشت تأثیرگذار است (٦). اما با در نظر گرفتن تأثیر نوع رقم بر درصد شاخه‌زایی، پایه میروبالان C ۲۹ بیش‌ترین شاخه‌زایی در محیط *MS* داشتند. این نتایج همگی نشان‌دهنده واکنش متفاوت ارقام به محیط‌های کشت و شرایط کشت می‌باشد.

میانگین طول گیاهچه: بررسی نتایج حاصل از برهمکنش نوع محیط کشت و غلظت تنظیم‌کننده‌های رشد بر طول گیاهچه تشکیل شده در مرحله پرآوری نشان داد که بین محیط کشت، تنظیم‌کننده‌های رشد و اثرات متقابل بین آن‌ها تفاوت معنی‌داری در سطح احتمال یک درصد وجود دارد (جدول ۱). نتایج مقایسه میانگین طول گیاهچه تحت‌تأثیر اثر متقابل غلظت تنظیم‌کننده‌های رشد و نوع محیط کشت نشان داد، بیش‌ترین طول شاخه به‌میزان ۲/۵، ۲/۳۳ و ۲/۲۹ سانتی‌متر، در محیط کشت *MS* حاوی غلظت یک، دو و سه میلی‌گرم در لیتر بنزیل آمینو پورین تشکیل شد و کم‌ترین طول شاخه به‌میزان ۰/٤۵، ۰/۵۵، ۰/٦۰ و ۰/۵۰ سانتی‌متر در محیط *QL* با غلظت صفر، یک، دو و چهار میلی‌گرم در لیترتیدیازرون به‌دست آمد. رازیک و همکاران (۲۰۱۳) و مویسو و همکاران (۲۰۱۱) در ریز ازدیادی پایه میروبالان گزارش کردند محیط *MS* با غلظت یک میلی‌گرم در لیتر بنزیل آمینو پورین بیش‌ترین تعداد شاخه را دارا است (۱۲ و ۱۷). با افزایش غلظت بنزیل آمینو پورین در محیط *MS* از یک میلی‌گرم در لیتر به دو میلی‌گرم در لیتر شاخساره‌های بیشتر و طویل‌تری نسبت به محیط کشت *DKW* تولید شدند (۲۰). در این پژوهش نیز با افزایش غلظت بنزیل آمینو پورین، تعداد شاخساره تولید شده از هر ریزنمونه در *MS* افزایش یافت، به‌طوری‌که بالاترین میانگین تعداد شاخساره با دو میلی‌گرم در لیتر بنزیل آمینو پورین در محیط *MS* به‌دست آمد (شکل ۱ و جدول ۲).

میانگین تعداد برگ: طبق جدول تجزیه واریانس بین محیط کشت، تنظیم‌کننده‌های رشد و اثرات متقابل بین آن‌ها تفاوت معنی‌داری در سطح احتمال یک درصد وجود دارد (جدول ۱). نتایج بررسی میانگین تعداد برگ گیاهچه تحت اثر متقابل غلظت تنظیم‌کننده‌های رشد و نوع محیط کشت نشان داد بیش‌ترین تعداد برگ (۱۱/۳۳ عدد برگ در گیاهچه) در محیط *MS* با دو میلی‌گرم در لیتر بنزیل آمینو پورین و کم‌ترین تعداد برگ (چهار عدد برگ در گیاهچه) در محیط

QL با یک و دو میلی‌گرم در لیتر تیدیازرون به‌دست آمد. با توجه به این‌که تعداد بیش‌تری شاخه در محیط *MS* با دو میلی‌گرم در لیتر بنزیل آمینو پورین به‌دست آمده بنابراین می‌توان چنین بیان نمود با افزایش تعداد شاخه، تعداد برگ نیز افزایش نشان داد.

((الف a)) ((ب b))

شکل ۱- پرآوری میروبالان ۲۹C، الف) محیط کشت *MS* با ۲ میلی‌گرم در لیتر *BAP*. ب) محیط *QL* با ۳ میلی‌گرم در لیتر *BAP*.

Fig. 1. Myrobalan 29 C proliferation. a) MS medium with 2 mgL^{-1} of *BAP*. b) *QL* medium with 3 mgL^{-1} of *BAP*.

جدول ۱- آنالیز واریانس اثر متقابل محیط کشت و تنظیم‌کننده رشد بر صفات ضریب تکثیر، طول گیاهچه و تعداد برگ.

Table 1. Analysis of variance of interaction of culture media and growth regulator on Proliferation Ratio, Shoot length and Leaf number.

منبع تغییرات Source	درجه آزادی DF	میانگین مربعات Mean Square		
		ضریب تکثیر Proliferation Ratio	طول گیاهچه Shoot length	تعداد برگ Leaf number
محیط کشت Culture medium	1	1.13**	12.61**	53.59**
تنظیم‌کننده رشد Growth regulator	9	5.30**	0.75**	15.51**
محیط کشت × تنظیم‌کننده رشد Culture medium × Growth regulator	9	1.23**	0.21**	7.23**
خطا Error	39	7.35	12.46	13.37
ضریب تغییرات CV%		13.14	11.24	14.23

**، * و ns به‌ترتیب بیانگر معنی‌دار بودن در سطح ۱٪، ۵٪ و معنی‌دار نبودن است.

**, * and ns respectively indicate a meaningful level of 1%, 5% and not significant.

جدول ۲- برهمکنش نوع محیط کشت و غلظت تنظیم‌کننده‌های رشد بر ضریب تکثیر، تعداد برگ و طول گیاهچه در مرحله پرآوری.

Table 2. Interaction between kind of culture medium and growth regulators on the proliferation ratio, plantlets length and leaf number in proliferation phase.

TDZ			BAP				
تعداد برگ Leaf number	طول گیاهچه (سانتی‌متر) plantlets length (cm)	ضریب تکثیر Proliferation Ratio	تعداد برگ Leaf number	طول گیاهچه (سانتی‌متر) Shoot length (cm)	ضریب تکثیر Proliferation Ratio	تنظیم‌کننده رشد (میلی‌گرم در لیتر) Growth regulator (mg/L)	محیط کشت Culture medium
6.31^{b}	1.49^{a}	1.08^{bc}	7.91^{c}	1.45^{cd}	1.00^{ef*}	0	
6.66^{b}	1.49^{a}	1.66^{b}	10.16^{a-b}	2.50^{a}	3.24^{ab}	1	
7.16^{a}	1.53^{a}	2.08^{ab}	11.33^{a}	2.33^{a}	3.41^{a}	2	*MS*
4.74^{d}	1.33^{ab}	1.66^{b}	9.66^{b}	2.29^{a}	1.99^{c}	3	
5.49^{c}	1.09^{ab}	2.63^{a}	9.41^{b}	1.84^{b}	1.99^{c}	4	
5.50^{c}	0.60^{bc}	1.00^{c}	5.91^{d}	0.93^{e}	1.04^{e}	0	
4.00^{de}	0.55^{bc}	1.00^{c}	4.91^{e}	0.88^{ef}	1.04^{e}	1	
4.00^{de}	0.45^{bc}	1.00^{c}	5.66^{de}	0.70^{f}	1.99^{c}	2	QL
6.50^{b}	0.93^{b}	1.00^{c}	5.74^{de}	0.96^{e}	0.59^{g}	3	
4.50^{d}	0.50^{bc}	1.00^{c}	4.83^{e}	0.87^{ef}	1.80^{cd}	4	

بر طبق آزمون HSD میانگین دارای حروف مختلف در هر ستون بیانگر اختلاف معنی‌دار در سطح ۵٪ می‌باشند.

According to the HSD test the mean in each column, with at least one similar letters are significant difference at the 5% level.

مرحله ریشه‌زایی

درصد ریشه‌زایی: نتایج حاصل از برهمکنش نوع محیط کشت و غلظت تنظیم‌کننده‌های رشد در مرحله ریشه‌زایی نشان داد که اثر ساده محیط کشت و تنظیم‌کننده رشد بر درصد ریشه‌زایی در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بود ولی در مورد اثر متقابل تیمارها بر درصد ریشه‌زایی تفاوت معنی‌داری وجود ندارد (جدول ۳). بیش‌ترین درصد ریشه‌زایی (۱۰۰٪) در محیط *DKW* با یک میلی‌گرم در لیتر نفتالین استیک اسید به‌دست آمد و کم‌ترین درصد ریشه‌زایی (۱/۴۹٪ و ۲/۰۰) در محیط *QL* و *DKW* فاقد هورمون به‌دست آمد (جدول ٤).

تعداد ریشه: تجزیه واریانس صفت موضوع مطالعه نشان داد بین محیط کشت، تنظیم‌کننده‌های رشد و اثرات متقابل بین آن‌ها تفاوت معنی‌داری در سطح یک درصد وجود دارد (جدول ۳). نتایج مقایسه میانگین بر تعداد ریشه تحت اثر متقابل غلظت تنظیم‌کننده‌های رشد و نوع محیط کشت نشان داد محیط *DKW* همراه با یک میلی‌گرم در لیتر *NAA* بهترین تیمار با تعداد ریشه (٦/٧٥) بود. در حالی‌که کم‌ترین تعداد ریشه (۱/۷۵) در ترکیب تیمار محیط کشت *QL* همراه با یک میلی‌گرم در لیتر *NAA* به‌دست آمد (شکل ۲)، (جدول ٤).

طول ریشه: طبق جدول تجزیه واریانس بین محیط کشت، تنظیم‌کننده‌های رشد و اثرات متقابل بین آن‌ها بر طول ریشه تفاوت معنی‌داری در سطح احتمال یک درصد وجود دارد (جدول ۳). نتایج مقایسه میانگین طول ریشه تحت‌تاثیر اثر متقابل نوع محیط کشت و تنظیم‌کننده رشد نشان داد گیاهچه‌ها در محیط *DKW* حاوی سه میلی‌گرم در لیتر *NAA* دارای بیش‌ترین

طول ریشه (۲/۱۲ سانتی‌متر) و در محیط *QL* فاقد هورمون کم‌ترین طول (۰/۵۰) را دارا بودند (جدول ٤). با افزایش غلظت هورمون از طول ساقه گیاهچه کاسته شده است و طول ریشه‌ها افزایش یافته است (جدول ٤).

میانگین تعداد برگ: طبق جدول تجزیه واریانس نوع محیط کشت و تنظیم‌کننده رشد بر تعداد برگ گیاهچه‌ها در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بود اثر متقابل بین آن‌ها تأثیر معنی‌داری نداشت (جدول ۳). طبق بررسی نتایج مقایسه میانگین بیش‌ترین تعداد برگ (۱۲/۷۵ عدد برگ در گیاهچه) در محیط *DKW* با یک میلی‌گرم در لیتر نفتالین استیک اسید و کم‌ترین تعداد برگ (۰/۷۷ عدد برگ در گیاهچه) در محیط *QL* با دو میلی‌گرم در لیتر تنفتالین استیک اسید به‌دست آمد (جدول ٤).

طول ساقه گیاهچه: طبق جدول تجزیه واریانس نوع محیط کشت، تنظیم‌کننده‌های رشد و اثرات متقابل بین آن‌ها بر طول ساقه گیاهچه در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بود (جدول ۳). نتایج مقایسه میانگین نشان داد بیش‌ترین طول ساقه به‌میزان ٦/۷۵ ساتی‌متر در محیط *DKW* حاوی یک میلی‌گرم در لیتر نفتالین استیک اسید و کم‌ترین طول ساقه ۱/۵۰ سانتی‌متر در محیط *QL* قاقد هورمون و غلظت یک میلی‌گرم در لیتر نفتالین استیک اسید مشاهده گردید (جدول ٤). نتایج همچنین نشان داد با افزایش غلظت اکسین در محیط کشت، از طول ساقه گیاهچه کاسته شده است در توضیح این موضوع عنوان شده هورمون‌های اکسینی افزوده شد به محیط در تسریع رشد یا صدور شاخه‌های جدید اثری ندارند در واقع به رشد عمومی گیاه تعادل می‌بخشد. یانگ (۱۹۹٤) در پژوهشی بروی گیلاس[1] نشان داد ترکیب نفتالین استیک اسید به تنهایی نسبت به ترکیب نفتالین استیک اسید با ایندول بوتریک اسید ریشه‌زایی بیش‌تری را دارد و همچنین پانچیا بر روی گونه دیگری از همین جنس برتری نفتالین استیک اسید را گزارش کرد. نفتالین استیک اسید نسبت به ایندول بوتریک اسید باعث افزایش میانگین تعداد ریشه می‌شد (۱۵ و ۲۳). علاوه بر این نفتالین استیک اسید سطح هورمون‌های درونی‌زا در مرحله ریشه‌زایی بالا می‌برد و ممکن است به‌عنوان کوفاکتوری برای ریشه‌زایی عمل کند با وجودی که معمولاً استفاده از نفتالین استیک اسید در محیط ریشه‌زایی به ایجاد پینه منجر می‌شود، اما در این آزمایش گیاهچه‌های قرار گرفته در محیط کشت حاوی نفتالین استیک اسید پینه‌زایی نکرده و تعداد ریشه بیش‌تری نیز تولید کردند و کیفیت مطلوبی داشتند. هورمون‌های طبیعی و درون‌زا در نهایت می‌توانند ریشه‌زایی بهتری را القا کنند (۱۱). در بررسی حاضر با افزایش غلظت نفتالین استیک اسید میانگین تعداد ریشه افزایش یافته در توضیح این مطلب می‌توان چنین بیان کرد هرچه تعداد ریشه در هر ریز نمونه زیاد باشد از میانگین طول ریشه کاسته می‌شود و افزایش تعداد ریشه در هر ریزنمونه می‌تواند با تأثیر بر جذب بیش‌تر آب و مواد غذایی از محیط کشت، طول ساقه گیاهچه‌ها را افزایش دهد (۲۵).

1- *P. avium*

((الف a)) ((ب b)) ((ج c)) ((د d))

شکل ۲- اثر غلظت‌های *NAA* در محیط *DKW* بر تعداد ریشه میروبالان ۲۹C، الف) ۰ میلی‌گرم در لیتر، ب) ۱ میلی‌گرم در لیتر، ج) ۲ میلی‌گرم در لیتر و د) ۳ میلی‌گرم در لیتر.

Fig. 2. The effect of *NAA* concentrations in *DKW* media on the root number Myrobalan 29C. a) 0 mgl^{-1}, b) 1 mgl^{-1}, c) 2 mgl^{-1} and d) 3 mgl^{-1}.

جدول ۳- آنالیز واریانس اثر متقابل محیط کشت و تنظیم‌کننده رشد بر صفات درصد ریشه‌زایی، تعداد ریشه، طول ریشه، تعداد برگ گیاهچه و طول ساقه گیاهچه.

Table 3. Analysis of variance of interaction of culture media and growth regulator on Percent Root, Root number, Root length, Leaf number plantlets and plantlets stem length.

منبع تغییرات Source	درجه آزادی DF	میانگین مربعات Mean Square					
		درصد ریشه‌زایی Percent Root	تعداد ریشه Root number	طول ریشه Root length	تعداد برگ گیاهچه Leaf number plantlets	طول ساقه گیاهچه Plantlets stem length	درصد بقا survival percent
محیط کشت Culture medium	1	3.75^{**}	30.29^{**}	612.22^{**}	296.02^{**}	138.48^{**}	50.12^{*}
تنظیم‌کننده رشد Growth regulator	3	12.75^{**}	17.85^{**}	48.42^{**}	10.14^{**}	23.58^{**}	24.52^{*}
محیط کشت × تنظیم‌کننده رشد Culture medium × Growth regulator	3	1.41^{ns}	4.49^{**}	19.72^{**}	4.86^{ns}	10.52^{**}	15.45^{*}
خطا Error	27	12.37	9.41	10.51	18.41	22.25	13.58
ضریب تغییرات CV%		19.75	22.50	31.49	29.96	32.14	19.25

**، * و ns به‌ترتیب بیانگر معنی‌دار بودن در سطح ۱٪، ۵٪ و معنی‌دار نبودن است.

**, * and ns respectively indicate a meaningful level of 1%, 5% and not significant.

جدول ٤- برهمکنش نوع محیط کشت و غلظت تنظیم‌کننده‌های رشد بر درصد ریشه‌زایی، تعداد شاخه، طول شاخه، طول ساقه گیاهچه و تعداد برگ در مرحله ریشه‌زایی میروبالان ۲۹C.

Table 4. Interaction kind of culture medium and growth regulators on rooting plantlets, root percent, number and root length, leaf number and plantlets stem length in rooting phase Myrobalan 29C.

محیط کشت Culture medium	تنظیم‌کننده رشد (میلی‌گرم در لیتر) growth regulators (mg/L)	درصد ریشه‌زایی Percent Root	تعداد ریشه Root number	طول ریشه (سانتی‌متر) Root length (cm)	تعداد برگ گیاهچه Leaf number plantlets	طول ساقه گیاهچه (سانتی‌متر) Stem length plantlets (cm)
	NAA					
DKW	0	1.49[e*]	2.75[c]	1.00[f]	9.50[c]	5.35[bc]
	1	100.00[a]	6.75[a]	1.12[e]	12.75[a]	6.62[a]
	2	68.56[c]	4.25[b]	2.00[b]	9.50[c]	3.87[c]
	3	81.25[b]	4.25[b]	2.12[a]	10.50[b]	5.85[b]
QL	0	2.00[e]	0.52[f]	0.50[g]	5.75[d]	1.50[ef]
	1	33.33[d]	1.75[e]	1.62[d]	5.75[d]	1.50[ef]
	2	33.33[d]	2.00[d]	1.87[c]	0.77[e]	1.87[e]
	3	43.03[cd]	2.75[c]	1.12[e]	5.25[de]	2.25[d]

بر طبق آزمون HSD میانگین دارای حروف مختلف در هر ستون بیانگر اختلاف معنی‌دار در سطح ۵٪ می‌باشند.

According to the HSD test the mean in each column, with at least one similar letters are significant difference at the 5% level.

سازگاری: طبق نتایج مربوط به اثر برهمکنش نوع محیط کشت و تنظیم‌کننده‌های رشد بر درصد بقای گیاهچه ریشه‌دار شده، بین محیط کشت، تنظیم‌کننده‌های رشد و اثر متقابل بین آن‌ها تفاوت معنی‌داری در سطح پنج درصد مشاهده شد (جدول ۳). طبق بررسی مقایسه میانگین بیش‌ترین درصد زنده‌مانی به‌میزان (٪۵۰) در محیط *DKW* با یک میلی‌گرم در لیتر نفتالین استیک اسید دیده شد و کم‌ترین درصد زنده مانی در محیط *QL* با غلظت صفر، یک، دو و سه میلی‌گرم در لیتر نفتالین استیک اسید به‌دست آمد (جدول ۵).

در این پژوهش مشخص شد که نوع محیط کشت تأثیر به‌سزایی بر سلامت گیاهچه‌ها و در نتیجه استقرار موفق ریزنمونه‌ها داشت. کلسیم عنصری است که نقش بسیار مهمی در ساختار دیواره یاخته‌ای 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 درون‌شیشه‌ای زمانی که میزان رطوبت بالا باشد تعرق گیاه و در نتیجه جذب کلسیم کاهش پیدا کرده و قهوه‌ای شدن و مرده شدن بافت‌ها در نتیجه تجزیه و تخریب یاخته‌ها رخ می‌دهد (۲، ۱۳ و ١٦). کیفیت گیاهچه در مرحله سازگاری نقش مهمی دارد. در این پژوهش از محیط *DKW* به‌دلیل داشتن نیترات کم باعث کاهش رشد رویشی شده و گیاهچه‌های دچار این نارسایی‌ها نشدند و نفتالین استیک اسید با افزایش تعداد ریشه در هر ریزنمونه می‌تواند با تأثیر بر جذب بیش‌تر آب و مواد غذایی از محیط کشت، طول ساقه گیاهچه‌ها را افزایش دهد. این دو عامل باعث شده گیاهچه‌ها در این مرحله در گلدان‌های حاوی بستر ضدعفونی‌شده کوکوپیت و پرلیت سازگاری موفقی داشتند (٤ و ۱۳). این یافته‌ها با نتایج هانگ (۲۰۰۳) و سدلاک (۲۰۰۳) بر روی پایه گزیلا ٦ که درصد بقا حدود ۸۰ و ۷۹/۲ درصد است، مطابقت دارد (۱۸ و ۲۳).

جدول ۵- برهمکنش نوع محیط کشت و غلظت تنظیم‌کننده‌های رشد بر درصد بقای گیاهچه میروبالان ۲۹C.

Table 5. Interaction kind of culture medium and growth regulatur on the survival percent plantlets Myrobalan 29C.

درصد بقا Survival percent		
NAA	تنظیم‌کننده رشد (میلی‌گرم در لیتر) growth regulators (mg/L^{-1})	محیط کشت culture medium
1.33^{d*}	0	*DKW*
50.00^{a}	1	
12.50^{c}	2	
39.53^{b}	3	
1.33^{d}	0	*QL*
3.55^{d}	1	
1.33^{d}	2	
5.32^{d}	3	

بر طبق آزمون HSD میانگین دارای حروف مختلف در هر ستون بیانگر اختلاف معنی‌دار در سطح ۵٪ می‌باشند.

According to the HSD test the mean in each column, with at least one similar letters are significant difference at the 5% level.

نتیجه‌گیری کلی

با توجه به نتایج حاصل از پژوهش می‌توان نتیجه گرفت که محیط *MS* و *DKW* محیط مناسبی برای پایه میروبالان ۲۹C می‌باشد. پایه میروبالان ۲۹C در غلظت‌های نسبتاً بالای *BAP* و *NAA* به‌ترتیب از شاخه‌زایی و ریشه‌زایی پایینی برخوردار است. با افزایش میزان *BAP* و *NAA* محیط تعداد شاخه‌ها و ریشه‌ها کاهش یافت اما طول شاخه و ریشه افزایش یافت. در این آزمایش بیش‌ترین درصد بقای گیاهچه در محیط *DKW* حاوی یک میلی‌گرم در لیتر *NAA* اتفاق افتاد.

منابع

1. Andreu, P. and Marin, J.A. 2005. *In vitro* culture establishment and multiplication of the *prunus*. Acta Hort. Pp: 15-20.
2. 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.
3. Daneshvar Hossini, A., Ganji Moghadam, E. and Anahid, S. 2010. Effects of media cultures and plant growth regulators in micropropagation of Gisela6 rootstock. A. Bio. Res. 1: 135-141. (In Persian)
4. Demiral, S. and Ulger, S.A. 2008. Research on propagation of Gisela 5 cherry rootstock by tissue culture. Akd. Uni. Zir Fac. 21: 117-121.
5. Huang, V.J. 2003. *In vitro* propagation of dwarf cherry rootstock Gisela. J. Nat. Sci. 26: 2. 161-164.
6. Izad Panah, Sh. 2004. The effects of age and genotype on the way propagation Sweet Cherry (*Prunus avium*) *in vitro*. Nat. Sou. 64: 63-70. (In Persian)
7. Ganji Moghadam, E. and Abdollahzadeh, A. 2009. Guide fruit trees rootstock (Translate). AREEO. Pp: 155-184. (Edited book). (In Persian)
8. Ganji Moghadam, E., Bolandi, H.R. and Anahid, S. 2008. *In vitro* multiplication of four genotypes dwarf selected *Mahalab*. Res. Deve. Nat. Res. 79: 55-61. (In persian)

9.Kamali, K., Majidi, A. and Zarghami, R. 2002. Determine the most suitable culture medium and growth conditions micropropagation of vegatative GF677 (*hyberid Paech* × *Almound*) rootstock. J. Sap. Seed. 17: 38-47. (In Persian)
10.Mahdavyan, M., Bozari, N. and Abdollahi, H. 2010. Effect of media and plant growth regulators on proliferation and rooting Mahaleb (*Sent losi 64*) of vegetative rootstock. J. Sap. Seed. 1: 15-26. (In Persian)
11.Mohamed, A. 2012. Establishment of regeneration system for Taif peach (*Prunus persica* L. *Batsch*) cultivar (*Balady cultivar*) in Taif, KSA. J. Am. Sci. 8: 4. 232-239.
12.Movsiuw, A. 2011. *In vitro* propagation of virus-free *Myrobalan* 29C rootstock. GRI. 7349: 101-102.
13.Perez-Tornero, O. and Lopez, J.M. 2000. Effect of basal media and growth regulators on the *in vitro* propagation of apricot (*prunus armenica* L.) cv. Cannino. J. Hort. Sci. Bio. 75: 283-286.
14.Plopa, C., Dutu, N., Isac, V., Mazilu, C. and Ancu, S. 2010. Factors influencinrg *in Vitro* propagation of Myrobolan dwarf Plum root stock. ISHS. Acta. Hor. 966: 221-223.
15.Punchia, G. 1992. Research on *in vitro* propagation of *Prunus laurecerasus* cv. Otto Layken. Aca. Hort. 300: 177-186.
16.Ruzic, D., Saric, M., Cerovic, R. and Culafic, L. 2001. Change in macro element content of the media and in sweet cherry in mil GM 9 shoots during *in vitro* culture. J. Hort. Sci. Bio. 78: 295-299.
17.Ruzic, D.V. and Vajovic, T.I. 2013. The effect of cytoknins types and their concentration on *in vitro* multiplication of sweet cherry. Hort. Sci. 35: 12-21.
18.Sedlak, J. and Paprstein, F. 2003. Influence of growth regulator on *in vitro* propagation of *pyrus communis* c.v. koporeka. Acta. Hort. 616: 379-382.
19.Shekafandeh, A. and Qasemi, M. 2008. Effects of *BA* and *TDZ* on bud growth and somatic embryogenesis of immature almond (*Prunus dulcis* L.) blooming late shahrody varieties 7. J. Hort. Sci. 2: 148-152. (In Persian)
20.Soleymanpor, A. and Bozari, N. 2012. Effect of media and plant growth regulators in micro propagation Mahaleb (*SL-64*) of vegitative rootstock. STGI. 12: 1-5. 9. (In Persian)
21.Tatari, M. and Mosavi, A. 2013. Evaluation *in vitro* culture of vegetative Tetra, Nemagard and GF677 rootstock. Bu. Agri. 3: 103-115. (In Persian)
22.Yadollahi, A., Nazari Moghadam Aghaee, R. and Moeeni, A. 2009. Effect composition *BAP* and *NAA* on prolifiration Gisela rootstock. STGI. 3: 1-5. (In Persian)
23.Yang, H.Y. and Schmitid, H. 1994. Influnece of different auxin on *in vitro* sweet cherry cultivares. Agric. Sci. 59: 1. 45-47.
24.Ying-Ning, Z. 2010. Micropropagation of chinese plum (*Prunus salicina* Lindl.) using mature stem segments. Not. Bot. Hort. Agr. Clu. 38: 3. 214-218.
25.Zolfaghari Nasab, R., Khosroshahi, M., Gergoryan, V. and Matlabi Azar, A. 2005. Study *in vitro* natural hybrid *Apricot* × *Plum*. J. Hort. Sci. Tec. I. 5: 81-92. (In Persian)