Effect of Medium, Sugar and Plant Growth Regulators on Micropropagation of Saint Julien A (*Prunus domestica* spp. *Insititia*) Rootstock

Ostadsharif[1], O., Garoosi[2*], G., Haddad[3], R. and Nezami[4], E.

Abstract

Saint Julien A (*Prunus domestica* spp. *Insititia*) is known as one of the important semi-dwarfing rootstocks with good compatibility with the majority of stone fruits (especially with plum), which no enough research carried out of effective factors on its micropropagation. In this project the effect of 5 types medium (MS, WPM, TK, GNH and mGNH), the interaction effects of PGRs (BAP at concentration of 0.25, 0.5, and 1.0 mg/l and IBA at concentration of 0.0, 0.05, 0.1, and 0.2 mg/l]), and also the effect of carbohydrate source (Sucrose and Glucose) each at concentration of 0.0, 10, 20 g/l were studied on mentioned rootstock shoot promotion separately. Besides, for root induction two different methods application of IBA and NAA (gradually pre-application and pulsing) was independently conducted. Results indicated that the highest healthy shootlets N0. (2.125 per each explants) were observed on MS medium supplemented with BAP and IBA at concentrations of 0.5 and 0.1 mg/l, respectively, which had significant effect (α=0.05) in comparison with other treatments. Inspite, the result implicated clearly the significant interaction effects (α=0.01) of sucrose and glucose on both number and length of shootlet, in which the highest shootlet N0. (2.66) with desired growth quality was obtained when MS medium supplemented with both carbohydrates each at 20 g/l concentration, but the longest shoots (8.5 mm) were observed on MS containing 30 g/l sucrose which had significant difference (α=0.05) in comparison with other treatments The obtained results from root induction step significantly supported the reasonable efficiency of pulsing method (with 77.28% rooting and 1.8 root on each shoot) to other conventional method, as well as the superiority of NAA to IBA. The rooted plantlets with 60% success were acclimated in pots containing mixture of perlite and pitmass (3:1) and were transferred into greenhouse.

Keywords: Saint julien rootstock, Plum, Proliferation, Carbohydrate, Pulsing

References

Abou Rayya, M. S., Kassim, N. E. and Ali, E. A. M. 2011. Effect of different cytokinins concentrations and carbon sources on shoot proliferation of bitter almond nodal cuttings. Journal of American Science, 7(1): 135-139.

Ambrozic Turk, B., Smole, J. and Šiftar, A. 1990. Micropropagation of a plum ecotype (*Prunus domestica* L.) as rootstock for apricots. *In vitro* Culture, 300: 111-114.

Anderson, H., Abbott, A. and Wiltshire, S. 1982. Micropropagation of strawberry plants *in vitro* Effect of growth regulators on incidence of multi-apex abnormality. Scientia Horticulturae, 16: 331-341.

Andreu, P. and Marín, J. A. 2005. *In vitro* culture establishment and multiplication of the *Prunus* rootstock 'Adesoto 101' P. insititia L. as affected by the type of propagation of the donor plant and by the culture medium composition. Scientia Horticulturae, 106: 258-267.

Azar, E. V., Heravan, E. M., Azghandi, A. V. and Dejampour, J. 2010. Establishment and proliferation of two Apricot× Plum Hybrid Rootstocks for *In Vitro* Culture. Seed and Plant Production Journal, 25: 465-470.

Boyhan, G. E., Norton, J. D. and Pitts, J. A. 1995. Establishment, growth, and foliar nutrient content of plum trees on various rootstocks. HortScienc, 30(2): 219-221.

1. MSc student, Department of Agricultural Biotechnology, Imam Khomeini International University (IKIU), Qazvin

2. Assistant professor, Department of Agricultural Biotechnology, Imam Khomeini International University (IKIU), Qazvin

3. Associate professor, Department of Agricultural Biotechnology, Imam Khomeini International University(IKIU), Qazvin

4. MSc plant tissue culture lab. Technician, Department of Agricultural Biotechnology, Imam Khomeini International University (IKIU), Qazvin

※: Corresponding author Email: agaroosi90@yahoo.com

Channuntapipat, C., Sedgley, M. and Collins, G. 2003. Micropropagation of almond cultivars Nonpareil and Ne Plus Ultra and the hybrid rootstock TitanÕNemaguard. Scientia Horticulturae, 98: 473-484.

Da Silva, A. L., Rogalski, M. and Guerra, M. P. 2008. Effects of different cytokinins on in vitro multiplication of Prunus 'Capdeboscq' rootstock. Crop Breeding and Applied Biotechnology, 3: 149-156.

Digby, J. and Wangermann, E. 1965. A note on the effect of the shoot and root apex on secondary thickening in pea radicles. New Phytologist, 64: 168-170.

Foo, E., Bullier, E., Goussot, M., Foucher, F., Rameau, C. and Beveridge, C. A. 2005. The branching gene RAMOSUS1 mediates interactions among two novel signals and auxin in pea. Plant Cell, 17: 464-474.

García, J. L., Troncoso, J., Sarmiento, R. and Troncoso, A. 2002. Influence of carbon source and concentration on the in vitro development of olive (*Olea europaea* L.) zygotic embryos and explants raised from them. Plant Cell, Tissue and Organ culture, 69(1): 95-100.

Ghane Golmohammadi, F., Hosseini, R., Garoosi, G. A., Zarrabi, M. M. and Moradnezhad, M. 2012. Effect of different media, carbon sources and light quality in prolifretion of olive (Olea eurpaea L. c.v. Mari). 12rd Iranian Genetics Congress, 22-24 may, Tehran, Iran.

George, E. F., Hall, M. A. and Klerk, G. J. D., 2008. Plant propagation by tissue culture. Springer, 505 pp.

Hosseini, A. R. D., Moghadam, E. G., Khorasani, S. K. and Bihamta, M. R. 2011. Effects of Growth Regulators on Micro Propagation of some Mahaleb Dwarf Genotypes (*Prunus mahaleb* L.). Archives of Applied Science Research, 3: 118-125.

Lane, W. D. 1979. Regeneration of pear plants from shoot meristem-tips. Plant Science Letters, 16: 337-342.

Lloyd, G. and McCown, B. 1980. Commercially-feasible micropropagation of mountain laurel, Kalmia latifolia, by use of shoot-tip culture. Combined Proceedings, International Plant Propagators' Society, 30: 421-42.

Mante, S., Scorza, R. and Cordts, J. M. 1989. Plant regeneration from cotyledons of *Prunus persica*, *Prunus domestica*, and *Prunus cerasus*. Plant cell, tissue and organ culture, 19: 1-11.

Marino, G., Bertazza, G. and Magnanini, E. 1993. Comparative effects of sorbitol and sucrose as main carbon energy sources in micropropagation of apricot. Plant cell tissue and rgan culture, 34: 235-244.

Murashige, T. and Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. Physiologia plantarum, 15: 473-497.

Nacheva, L. and Gercheva, P. 2009. Micropropagation of Gisela 5 (cherry dwarf rootstock): The effect of the type and the concentration of the carbohydrates in the nutrient medium. Acta Horticulturae, 825: 261-268.

Nezami, E., Garoosi, G. A. and Haddad, R. 2010. The effect of PGRs on *In Vitro* shoot multiplication of GF677 hybrid (*Prunus persica*× *P. amygdalus*) rootstock on GNH medium. Iranian Journal of Genetics and Plant Breeding, 1: 134-141.

Nowak, B., Miczyński, K. and Hudy, L. 2004. Sugar uptake and utilisation during adventitious bud differentiation on *In Vitro* leaf explants of 'Wegierka Zwykła'plum (*Prunus domestica*). Plant cell, tissue and organ culture, 76: 255-260

Nowak, B., Miczyński, K. and Hudy, L. 2007. The effect of total inorganic nitrogen and the balance between its ionic forms on adventitious bud formation and callus growth of 'Węgierka Zwykła'plum (*Prunus domestica* L.). Acta Physiologiae Plantarum, 29: 479-484.

Pevalek-Kozlina, B. and Jelaska, S. 1987. Microclonal propagation of *Prunus avium* L. Symposium on *In Vitro* Problems Related to Mass Propagation of Horticultural Plants, 2: 599-602.

Pruski, K. W., Lewis, T., Astatkie, T. and Nowak, J. 2000. Micropropagation of Chokecherry and Pincherry cultivars. Plant cell, tissue and organ culture, 63: 93-100.

Quoirin, M. and Lepoivre, P. 1977. Improved media for *In Vitro* culture of *Prunus* sp. Acta Horticulturae, 78:437-442.

Raab, T. K. and Terry, N. 1994. Nitrogen source regulation of growth and photosynthesis in *Beta vulgaris* L. Plant Physiology, 105: 1159-1166.

Reighard, G. L., Ouellette, D. R. and Brock, K. H. 2008. Performance of new *Prunus* rootstocks for peach in South Carolina. Acta Horticulturae, 772: 237-240.

Ružić, D. V. and Vujović, T. 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.

Snowden, K. C., Simkin, A. J., Janssen, B. J., Templeton, K. R., Loucas, H. M., Simons, J. L., Karunairetnam, S., Gleave, A. P., Clark, D. G. and Klee, H. J. 2005. Analysis of the decreased apical dominance genes of Petunia in the control of axillary banching. Plant Cell, 17: 746-759.

Štefančič, M., Štampar, F., Veberič, R. and Osterc, G. 2007. The levels of IAA, IAAsp and some phenolics in cherry rootstock Gisela 5 leafy cuttings pretreated with IAA and IBA. Scientia Horticulturae, 112: 399-405.

Tabachnik, L. and Kester, D. E. 1977. Shoot culture for almond and almond-peach hybrid clones *In Vitro*. HortScience, 12: 545-547.

Tatari Varnousfaderani, M., Mousavi, S. A. and Bouzari, N. 2012. Micropropagation of some Clonal Rootstocks of Stone Fruits. Seed and Plant Improvment Journal, 28 (1): 53-66.

Tereso, S., Miguel, C., Mascarenhas, M., Roque, A., Trindade, H., Maroco, J. and Oliveira, M. 2008. Improved *In Vitro* rooting of *Prunus dulcis* Mill. cultivars. Biologia Plantarum, 52: 437-444.

Welander, M. 1983. *In Vitro* rooting of the apple rootstock M 26 in adult and juvenile growth phases and acclimatization of the plantlets. Physiologia plantarum, 58: 231-238.

Younas, M., Ur-Rahman, H. and Chaudhary, M. 2007. Effect of different carbon sources on *In Vitro* shoot proliferation and rooting of peach rootstock GF677. Pakistan Journal of botany, 40(3): 1129-1136.

Zarei, M., Garoosi, G. A., Nezami, E. and Hosseini, R. 2012. Effect of carbon source on micropropagation of cherry Gesila 6 rootstock. 3rd Iranian Agricultural Biotechnology congress 3-5 Sept. Mashhad, Iran.

Zulfiqar, B., Abbasi, N. A., Ahmad, T. and Hafiz, I. A. 2009. Effect of explant sources and different concentrations of plant growth regulators on *In Vitro* shoot proliferation and rooting of Avocado (*Persea americana* Mill. CV. Fuerte). Pakistanian Journal of Botany, 41(5): 2333-2346.

صفحه اصلی > شماره جاری

شماره جاری: دوره 5، شماره 1، تابستان 1393، صفحه 1-100 XML

1 استفاده از مشخصات ظاهری و نشانگر PCR- SCAR به‌منظور شناسایی تماند ریشه گرهی (Meloidogyne spp.) شایع در گلخانه‌های منطقه سردسیری استان کهگیلویه و بویراحمد
صفحه 1-7
کیومرث میره کی؛ محمد عبداللهی؛ مصطفی محقق دولت آبادی؛ نجمه عزلباش
مشاهده مقاله | اصل مقاله (K 475)

2 تاثیر محیط‌کشت، قند و تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی در ریزازدیادی پایه رویشی سنتجولین (A (Prunus domestica spp. Insititia
صفحه 9-18
امید استاد شریف؛ قاسمعلی گروسی؛ رحیم حداد؛ اسماعیل نظامی
مشاهده مقاله | اصل مقاله (K 502)

3 مطالعه تنوع آللی جایگاه‌ژنی GLU-B1 در برخی از گندم‌های دوروم ایران با استفاده از نشانگر STS
صفحه 19-25
الهام صبوری رباط؛ محمود سلوکی؛ مسیح فروتن
مشاهده مقاله | اصل مقاله (K 389)

4 بررسی روابط ژنتیکی توده‌های آویشن به‌وسیله نشانگر DNA چندشکل تکثیرشده تصادفی (RAPD)
صفحه 27-35
سیدمحمود ضابطی؛ احمد اسماعیلی؛ هادی احمدی
مشاهده مقاله | اصل مقاله (K 649)

5 خوشه‌بندی ژنتیکی گونه غالب باکتری‌های گرمزای ریشه باقلا بر پایه ژن rDNA 16 و الگوی توتیپ آن‌ها
صفحه 37-43
نگار سراج زاده؛ غلام خداکرمیان
مشاهده مقاله | اصل مقاله (K 283)

6 ارزیابی تغییرات میزان کلروفیل و بیان ژن‌های کاتالاز و DREB1 در ارقام سویا در شرایط تنش خشکی
صفحه 45-58
ابوالفضل مازندرانی؛ مهدی رحیم ملک؛ سعید نواب پور؛ ساناز رمضانپور
مشاهده مقاله | اصل مقاله (K 1337)

7 ارزیابی و خصوصیات ژنتیکی شتر دوکوهانه ایران با استفاده از آغازگرهای ریزماهواره شترسانان دنیای جدید
صفحه 59-65
رضا طالبی؛ فضل اله افراز؛ سید ضیاالدین میرحسینی؛ نعمت الله اسدی؛ سید بنیامین دلیرصفت
مشاهده مقاله | اصل مقاله (K 545)

8 شناسایی ساختار ژنی سویه‌های بومی باکتری thuringiensis Bacillus جداسازی شده از خاک‌های مناطق جنگلی استان مازندران
صفحه 67-76
فاطمه گرایلی مرادی؛ محمود محمدی شریف؛ علیرضا هادی زاده؛ ولی الله بابایی زاد
مشاهده مقاله | اصل مقاله (K 535)

9 اثر اتیل‌متان‌سولفونات (EMS) بر برخی از شاخص‌های رشد و نمو در گیاهان بازارزنی‌شده اطلسی (Petunia hybrida Vilm.)
صفحه 77-87
ندالسادات سهی؛ علی اکبر احسانپور
مشاهده مقاله | اصل مقاله (K 321)

10 بررسی مولکولی جمعیت جدایه‌های گونه کمپلکس Fusarium graminearum گندم استان اردبیل
صفحه 89-97
سجاد میات آبی؛ منصوره میرابوالفتحی؛ مریم عابت زمهریر
مشاهده مقاله | اصل مقاله (K 430)

11 چکیده
صفحه 1-23
مشاهده مقاله | اصل مقاله (K 366)

مقالات آماده انتشار
شماره جاری
شماره‌های پیشین نشریه
دوره 5 (1393)
شماره 1
دوره 4 (1392)
دوره 3 (1391)
دوره 2 (1390)
دوره 1 (1389)

تأثیر محیط‌کشت، قند و تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی در ریزازدیادی پایه رویشی سنت‌جولین A (*Prunus domestica* spp. *Insititia*)

Effect of Medium, Sugar and Plant Growth Regulators on Micropropagation of Saint Julien A (*Prunus domestica* spp. *Insititia*) Rootstock

امید استادشریف[۱]، قاسمعلی گروسی[۲*]، رحیم حداد[۳] و اسماعیل نظامی[۴]

تاریخ دریافت: ۹۱/۰۸/۲۰ تاریخ پذیرش: ۹۳/۰۲/۲۰

چکیده

پایه رویشی سنت‌جولین A به‌عنوان یکی از پایه‌های رویشی مهم نیمه‌پاکوتاه با سازگاری خوب با بیشتر ارقام میوه‌های هسته‌دار (به‌ویژه با آلو) به‌شمار می‌آید. در این پژوهش اثر ۵ نوع محیط‌کشت (MS، WPM، TK، GNH و mGNH)، اثر متقابل تنظیم‌کننده‌های رشدی (BAP در غلظت‌های ۰/۲۵، ۰/۵ و ۱ میلی‌گرم بر لیتر و IBA در غلظت‌های ۰/۰، ۰/۰۵، ۰/۱ و ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر)، و همچنین اثر منبع کربوهیدرات (گلوکز و ساکارز) هر کدام به‌طور جداگانه در غلظت‌های صفر، ۱۰، ۲۰ و ۳۰ گرم در لیتر روی میزان نوساقه‌زایی پایه رویشی یاد شده مورد مطالعه قرار گرفت. برای تحریک ریشه‌زایی تأثیر دو روش مختلف کاربرد IBA و NAA (پیش‌تیمار تدریجی و پالسینگ) نیز به‌طور مستقل مطالعه گردید. نتایج نشان داد که بیشترین تعداد نوساقه سالم (۲/۱۲۵ در هر ریزنمونه) در محیط‌کشت MS به‌همراه ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP و ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر IBA به‌دست آمد که اختلاف معنی‌داری در سطح α= ۰/۰۵ با سایر تیمارهای به‌کار برده شده داشت. هرچند نتایج بیانگر اثرات متقابل معنی‌دار ساکارز و گلوکز در سطح α=۰/۰۱ برای هر دو صفت تعداد و طول نوساقه بود ولی بیشترین تعداد نوساقه سالم (۲/۶۶) با کیفیت رشد مناسب در محیط‌کشت MS حاوی ترکیبی از دو قند هر یک ۲۰ گرم بر لیتر و بلندترین نوساقه‌ها با میانگین طول ۸/۵ میلی‌متر در محیط‌کشت MS حاوی ۳۰ گرم در لیتر ساکارز مشاهده شدند که در سطح α=۰/۰۵ اختلاف معنی‌داری با سایر تیمارها داشتند. نتایج به‌دست آمده از مرحله تحریک ریشه‌زایی بیانگر کارآیی بالای روش پالسینگ (با ۷۷/۲۸ درصد ریشه‌زایی و ۱/۸۲ ریشه در هر ساقه) نسبت به روش معمولی و برتری NAA نسبت به IBA در افزایش راندمان ریشه‌زایی بود. گیاهچه‌های ریشه‌دار شده با ۶۰٪ موفقیت پس از سازگاری در مخلوط پیت ماس و پرلیت در اتاقک رشد به گلخانه منتقل شدند.

واژه‌های کلیدی: پایه رویشی سنت‌جولین، آلو، پرآوری، کربوهیدرات، پالسینگ

۱. دانشجوی کارشناسی‌ارشد گروه بیوتکنولوژی، دانشکده فنی و مهندسی دانشگاه بین‌المللی امام خمینی(ره)، قزوین

۲. استادیار گروه بیوتکنولوژی، دانشکده فنی و مهندسی دانشگاه بین‌المللی امام خمینی(ره)، قزوین

۳. دانشیار گروه بیوتکنولوژی، دانشکده فنی و مهندسی دانشگاه بین‌المللی امام خمینی(ره)، قزوین

۴. کارشناس‌ارشد گروه بیوتکنولوژی، دانشکده فنی و مهندسی دانشگاه بین‌المللی امام خمینی(ره)، قزوین

*: نویسنده مسوول Email: agaroosi90@yahoo.com

مقدمه

سطح زیرکشت محصولات باغی کشور اعم از باغ‌های بارور و غیربارده نونهال در سال ۱۳۸۷، حدود ۲/۶ میلیون هکتار و تولیدات باغی در این سال حدود ۱۳/۴ میلیون تن برآورد شده است (آمارنامه کشاورزی ۱۳۸۹) و همراه با محصولات کشاورزی حدود ۱۴-۱۵٪ از درآمد غیرنفتی ایران را تأمین می‌کنند. بدیهی است آن‌چه ضامن رشد و ترقی در این عرصه خواهد شد، توجه به عوامل ژنتیکی و محیطی مؤثر بر هر یک از محصولات و به‌کارگیری علم و امکانات روز جهت افزایش سهم محصولات کشاورزی و باغی در تولیـد ناخالص ملی است. سنت‌جولین پایه‌ای نیمه‌پاکوتاه و سازگار با ارقام مختلف هلو، شلیل، آلو و گوجه می‌باشد *بوی‌هان* و همکاران (Boyhan *et al.*, 1995). پایه‌های رویشی درختان میوه، مانند سنت‌جولین نتیجه تکثیر گیاهان به روش‌های غیرجنسی هستند که می‌توانند از راه قلمه‌زدن، خوابانیدن، پاجـوش و همچنین روش‌های نوین کشت بافت تکثیر شوند. در کشت بافت گیاه برای رشدونمو نیاز به محیط‌کشت، شامل نمک‌های معدنی و آلی، منبع کربن به‌همراه تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی دارد *جورج* و همکاران (George *et al.*, 2008).

چانونتا پیپات و همکاران (Channuntapipat *et al.*, 2003) در یک بررسی جامع تأثیر محیط‌کشت‌های MS *موراشیگ* و *اسکوگ* (Murashige and Skoog, 1962)، WPM *لوید* و *مک‌کاون* (Lloyd and McCown, 1980)، TK *تاباچنیک* و *کستر* (Tabachnik and Kester, 1977) بر ریزازدیادی ارقام بادام (Nonpareil and Ne Plus Ultra) را مورد بررسی قرار داده و براساس نتایج به‌دست آمده محیط‌کشت MS انتخاب و در مراحل بعدی مورد استفاده قرار گرفت. در آزمایشی مشابه، محیط‌کشت GNH به‌عنوان محیط‌کشت منتخب جهت ریز ازدیادی پایه هیبرید GF677 معرفی شد *نظامی* و همکاران (Nezami *et al.*, 2010).

در رابطه با تنظیم‌کننده‌های رشد، غلظت‌های BAP ۰/۲۵ و IBA ۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر برای پرآوری پایه‌های آلو *آمبروزیک ترک* و همکاران (Ambrozic Turk *et al.*, 1990)، IBA ۰/۱ و BAP۱ میلی‌گرم بر لیتر جهت ریزازدیادی ارقام گیلاس *پروسکی* و همـــکاران (Pruski *et al.*, 2000)، BAP ۰/۵ و IBA ۰/۱ برای استقرار ریزنمونه‌های آلو *نواک* و همکاران (Nowak *et al.*, 2004)، ۰/۵ و ۴ میلی‌گرم بر لیتر BAP و ۳ GA به‌عنوان ترکیب مناسب نوساقه‌زایی پایه‌های هیبرید زردآلـــو و آلو معرفی شـــدند *آذر* و همکاران (Azar *et al.*, 2010). *تاتاری* و همـــکاران (Tatari *et al.*, 2012) نیز در آزمایشی محیط‌کشت MS حاوی ۱ و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر به‌ترتیب BPA و NAA را برای ریزازدیادی سنت‌جولین معرفی کردند، ولی به‌هرحال، بسته به شرایط ژنتیکی و محیطی ریزنمونه‌های مختلف واکنش‌های متفاوتی از خود نشان می‌دهند.

به‌علت قدرت فتوسنتزی کم بافت‌های درون شیشه حضور کربوهیدرات‌ها به‌عنوان منبع انرژی و پیش‌ماده کربنی برای بیوسنتز، و تنظیم خاصیت اسمزی محیط‌کشت ضروری است. هرچند ساکارز قند عمده به‌کارگرفته شده در کشت بافت است ولی سایر قندها نظیر گلوکز، سوربیتول و مانیتول نیز در برخی موارد به‌عنوان منبعی مفید در کشت تعداد زیادی از گیاهان چوبی از جمله خانواده Rosaceae و Olea به‌کار رفته است *گارسیا* و همکاران، *نواک* و همکاران (Nowak *et al.*, 2004; Garcia *et al.*, 2002). *مارینو* و همکاران (Marino *et al.*, 1993) اثر ساکارز و سوربیتول را بر ریزازدیادی دو رقم زردآلو (*Prunus armeniaca* L.) در غلظت‌های مختلف را مورد بررسی قرار دادند که نتایج از برتری سوربیتول در غلظت ۱۱۶/۸ میلی‌مولار برای نوساقه‌زایی و کیفیت مناسب رشد ریشه‌ها حکایت داشت. *یونس* و همکاران (Younas *et al.*, 2007) در مطالعه خود ترکیب گلوکز و ســـاکارز به‌نســـبت ۱/۵ /۱/۵٪ را برای تکثیر ساقه و ۲٪ گلوکز را برای رشد طولی نوساقه‌ها در پایه GF677 مناسب تشخیص دادند.

روش‌های متداول ریشه‌زایی در شرایط درون‌شیشه شامل القای ریشه‌زایی توسط اکسین به‌مدت چند روز در محیط حاوی اکسین و سپس انتقال به محیط بدون هورمون جهت تکمیل مراحل رشد ریشه، پیش از انتقال به خاک است *مانت* و همکاران (Mante *et al.*, 1989). در روش دیگر، نوساقه از محل پایه با محلول حاوی اکسین با غلظت بالا در مدت زمان کوتاهی تیمار (تیمار به روش پالسینگ) و بلافاصله پس از آن به محیط غذایی فاقد هورمون برای تکمیل مراحل بعدی ریشه‌زایی و رشد ریشه منتقل می‌شود. روش فوق روی تعدادی از گیاهان شامل *Prunus avium* با استفاده از پالس ۵۰ میلی‌گرم بر لیتر IBA *پوالک- کوزلینا* و *جلاسکا* (Pevalek-Kozlina and Jelaska, 1985)، پایه رویشی Gisela5 با ۴ گرم بر لیتر IBA و IAA *ترسو* و همکاران (Tereso *et al.*, 2008)، ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر IBA به‌مدت ۵ دقیقه جهت ریشه‌زایی ارقام *Prunus dulcis* *استفانسیس* و همکاران (Štefančič *et al.*, 2007)، ۲ گرم بر لیتر IBA برای ریشه‌زایی قلمه‌های گونه‌های پرونوس *ریگارد* و *لوریتی* (Reighard and Loreti, 2008) و پالس ۲ گرم

بر لیتر IBA جهت ریشه‌زایی گیلاس (*P. mahleb* L.) آزمایش و نتایج موفقیت‌آمیزی گزارش شده است.

زمان و هزینه صرف شده در تکثیر گیاهان دو عامل بسیار مهم و تأثیرگذار در هر پروژه به‌شمار می‌رود و به‌کار گرفتن روشی که صرفه‌جویی در این دو فاکتور را در نظر داشته باشد، همواره در ارجحیت است. در تحقیق حاضر تأثیر محیط‌کشت، منبع کربوهیدرات و تنظیم‌کننده‌های رشد بر ریزازدیادی و نحوه تیمار دو نوع اکسین بر ریشه‌زایی پایه سنت‌جولین A (*Prunus domestica* spp. *Insititia*) مورد مطالعه قرار گرفته است.

مواد و روش‌ها

به‌منظور تهیه ریزنمونه، گلدان‌های حاوی نهال پایه سنت‌جولین A (*Prunus domestica* spp. *Insititia*) از دانشگاه تربیت مدرس تهران تهیه شده و شاخه‌ها به قطعات کوچک دارای ۱ جوانه برش داده و به حدود ۱ ساعت در زیر آب لوله‌کشی شهری شستشو شدند. ریزنمونه ساقه سپس با الکل ۹۶٪ به‌مدت ۴ ثانیه، کلریدجیوه ۰/۰۵ درصد به‌مدت ۴ دقیقه و هیپوکلریدسدیم ۱۰ درصد حجمی (حاوی ۵/۲۵ درصد هیپوکلریدسدیم) به‌مدت ۱۰ دقیقه ضدعفونی و جهت استقرار و تهیه نوساقه درون شیشه (*In vitro*)، به‌عنوان ریزنمونه برای آزمایش‌های اصلی به محیط‌کشت MS حاوی BAP و IBA به‌ترتیب با غلظت‌های ۰/۶ و ۰/۲ میلی‌گرم بر لیتر، ۲۰ گرم بر لیتر ساکارز، pH=۵/۷ و ۷ گرم بر لیتر فیتوآگار به‌عنوان جامدکننده منتقل و سپس در اتاق رشد در دمای ۲۵±۲°c و شرایط نوری ۱۶/۸ ساعت (تاریکی/ روشنایی) با لامپ‌های سرد- سفید (با قدرت روشنایی $\mu mol.m^{-2}.S^{-1}$ ۶۵/۵) قرار گرفتند. جهت تعیین بهترین محیط‌کشت، ریزنمونه‌های به‌دست آمده از نوساقه‌های تکثیرشده به محیط‌های‌کشت MS *موراشیگ* و *اسکوگ* (Murashige and Skoog, 1962)، WPM (Woody Plant Medium)، TK *تاباچنیک* و *کستر* (Tabachnik and Kester, 1997)، GNH *گروسی، نظامی* و *حداد* (Garoosi, Nezami and Hadad, 2010) و mGNH (GNH تغییر یافته) حاوی ترکیب هورمونی مشابه مرحله استقرار منتقل شدند.

به‌منظور تعیین بهترین ترکیب هورمونی اکسین و سایتوکینین، BAP در غلظت‌های ۰/۲۵، ۰/۵ و ۱ میلی‌گرم و IBA در غلظت‌های صفر، ۰/۰۵، ۰/۱ و ۰/۲ میلی‌گرم بر لیتر در محیط‌کشت منتخب آزمایش قبل استفاده و پس از یک‌بار واکشت ۴ هفته پس از اعمال تیمار، یادداشت‌برداری شامل طول و تعداد نوساقه به‌عمل آمد. همچنین در آزمایشی مستقل تأثیر هورمون GA_3 بر پرآوری در غلظت‌های ۰، ۰/۵، ۱ و ۲ میلی‌گرم در محیط MS حاوی بهترین ترکیب هورمونی آزمایش قبل (۰/۵ و ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر به‌ترتیب BAP و IBA) مورد مطالعه و پس از یک‌بار کشت، در دوره زمانی مشابه صفات یاد شده یادداشت‌برداری گردید.

به‌منظور مطالعه اثر گلوکز و ساکارز و اثر متقابل آن‌ها بر نوساقه‌زایی و طول نوساقه‌ها، ۱۶ تیمار ترکیبی آن‌ها، هریک در غلظت‌های ۰، ۱۰، ۲۰ و۳۰ گرم بر لیتر در محیط MS حاوی ۰/۵ و ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر به‌ترتیب BAP و IBA مورد استفاده قرار گرفت.

تحریک ریشه‌زایی به دو روش انجام شد. در روش اول (روش معمول) نوساقه‌های ۴۵ روزه تکثیر یافته در محیط پرآوری به طول ۳-۴ سانتی‌متر ابتدا به‌مدت ۵ روز در محیط MS جامد حاوی ۱ میلی‌گرم در لیتر به‌طور مستقل از هر یک از هورمون‌های IBA و NAA در تاریکی کشت نموده و سپس به محیط MS بدون هورمون حاوی ۳۰ گرم بر لیتر ساکارز و ۷ گرم بر لیتر فیتوآگار در اتاقک رشد با دوره نوری ۸/۱۶ ساعت روشنایی/ تاریکی و دمای ۲۵±۲°c منتقل شدند. در روش دیگر (روش پالسینگ Pulsing) ۰/۵ سانتی‌متر ابتدایی پایه نوساقه‌های مشابه در محلول ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر به‌طور مستقل از هریک از هورمون‌های بالا با pH=۵/۷ در تیمارهای زمانی ۳ ثانیه، ۵، ۱۰ و ۲۰ دقیقه قرار داده شدند. ریزنمونه‌ها را پس از خشک کردن با کاغذ صافی اتوکلاو شده به محیط MS فاقد هورمون منتقل و به‌مدت ۵ روز در معرض تاریکی قرار گرفت و سپس به روشنایی با شرایط بالا انتقال یافتند. بعد از ۴۵ روز درصد ریشه‌زایی و تعداد ریشه در هر دو روش یادداشت‌برداری شد. در پایان نوساقه‌های ریشه‌دار شده به مخلوط پرلیت، پیت ماس به نسبت ۳ به ۱ منتقل شدند.

آزمایش‌های تعیین محیط‌کشت مناسب، غلظت بهینه اکسین و سایتوکینین، تأثیر منبع کربن و ریشه‌زایی به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی و آزمایش تأثیر GA_3 در قالب طرح کاملاً تصادفی اجرا گردید. آزمایش محیط‌کشت با ۵ مشاهده در ۴ تکرار و سایر آزمایش‌ها شامل ۴ مشاهده در ۴ تکرار انجام شد پیش از تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار آماری SAS نسخه ۹/۲، نرمال‌بودن داده‌های گسسته بررسی شد و در صورت نرمال‌نبودن پس از نرمال‌سازی مورد استفاده قرار گرفتند؛ در صورت نیاز برای داده شمارشی از تبدیل لگاریتمی و برای داده‌های مربوط به درصد ریشه‌زایی از تبدیل زاویه‌ای (آرک سینوس) استفاده گردید و میانگین‌ها با

استفاده از آزمون چنددامنه دانکن در سطح ۵ درصد با یکدیگر مقایسه شدند.

نتایج و بحث

تأثیر محیط‌کشت

نتایج حاصل از تجزیه واریانس داده‌های به‌دست آمده از آزمایش محیط‌کشت نشان داد که تأثیر محیط‌کشت بر صفات طول و تعداد نوساقه در سطح یک درصد معنی‌دار می‌باشد (جدول ۱). مقایسه میانگین‌ها نشان داد بیشترین تعداد نوساقه در محیط‌کشت MS (شکل ۱- a) و بیشترین طول نوساقه در محیط‌کشت GNH (شکل ۱- b) به‌دست آمده است.

براساس مشاهدات به‌عمل آمده نوساقه‌ها در محیط‌کشت‌های MS، GNH و mGNH از نظر کیفی وضعیت مطلوبی داشتند؛ با این وجود محیط‌کشت MS در هردو واکشت عملکرد یکسانی داشت.

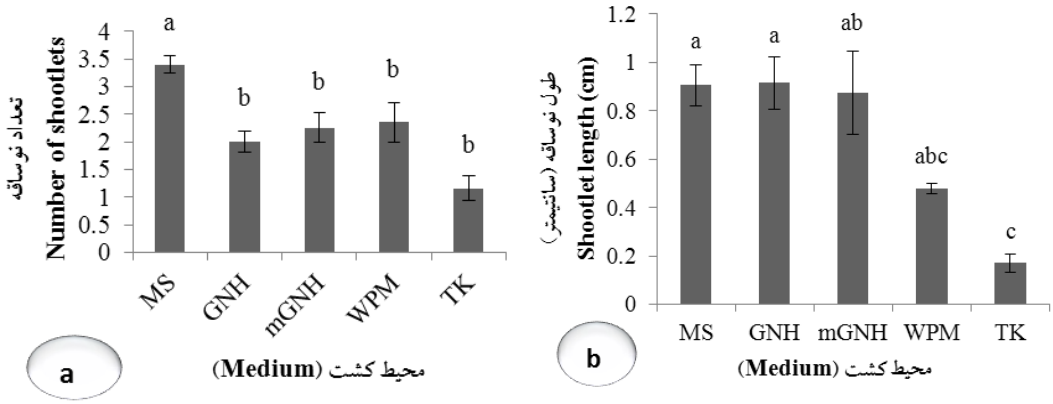
جدول ۱: تجزیه واریانس تأثیر محیط‌کشت، منبع کربوهیدرات و تنظیم‌کننده‌های رشد بر صفات اندازه‌گیری شده

Table 1: ANOVA analysis for the effect of media, sugar and PGRs on measured characters

منبع تغییرات S.O.V.	درجه آزادی df	میانگین مربعات (MS) تعداد نوساقه Shootlet Number	طول نوساقه Shootlet Length
محیط‌کشت (Medium)	4	0.479**	2.640**
خطای نمونه‌برداری (Sampling error)	80	0.104ns	0.012ns
خطای کل (Total error)	99	0.097	0.006
ضریب تغییرات٪ (CV)	-	16.180	11.497
BAP	2	0.339**	28.029**
IBA	3	0.293**	20.154**
BAP×IBA	6	0.116**	10.548ns
خطای نمونه‌برداری (Sampling error)	36	0.014	4.619
خطای کل(Total error)	144	0.020	4.046
ضریب تغییرات٪ (CV)	-	5.818	23.315
GA_3	3	0.071ns	0.013ns
خطای نمونه‌برداری (Sampling error)	8	0.043	0.012
خطای کل(Total error)	43	0.036	0.009
ضریب تغییرات٪ (CV)	-	11.67	9.71
ساکارز (Sucrose)	3	0.055**	142.269**
گلوکز (Glucose)	3	0.072**	29.333**
ساکارز×گلوکز (S×G)	9	0.063**	38.282**
خطای کل (Total error)	192	0.011	4.272
خطای نمونه‌برداری (Sampling error)	48	0.012	2.971
ضریب تغییرات٪ (CV)		9.244	27.277

**: معنی‌دار در سطح احتمال ۱٪، ns عدم وجود اختلاف معنی‌دار

**: Significant at 1% probability level, ns: Non significant



شکل ۱: تأثیر محیط‌کشت بر **a**) تعداد نوساقه در هر ریزنمونه و **b**) طول نوساقه

Fig. 1: Effect of media on, a) Shootlet number per explants and b) Shootlet length

براساس مشاهدات به‌عمل آمده نوســاقه‌ها در محیط‌کشت‌های MS، GNH و mGNH از نظر کیفی وضعیت مطلوبی داشتند. درحالی‌که نوساقه‌های کشت شده در دو محیط GNH و mGNH در واکشت دوم به سبز کم‌رنگ تغییر رنگ داده و میزان نوساقه‌زایی در آن‌ها نسبت به محیط MS پایین‌تر بود. به‌نظر می‌رسد این پاسخ ناشی از نصف شدن مقادیر آمونیوم و نیترات در محیط‌کشت‌های GNH و mGNH در مقایسه با محیط MS باشد. به‌طوری‌که مقادیر بالای این عناصر علاوه بر اثرات سمی منجر به مهار سنتز سایتوکینین یا جلوگیری از انتقال آن در محور ساقه شده *نواک* و همکاران (Nowak *et al.*, 2007) و حذف یا کاهش مقدار آمونیوم و نیترات نیز تأثیر منفی بر رشد و ریخت‌زایی خواهد داشت *رعب* و *تری* (Raab and Terry, 1994). پاسخ گیاه به دو محیط WPM و TK کاملاً متفاوت بود، به‌طوری‌که نوساقه‌های کشت شده در محیط WPM در واکشت اول به شکل روزت و در واکشت دوم علائم شیشه‌ای شدن در آن‌ها مشاهده شد. ریزنمونه‌های قرار گرفته در محیط TK در ۴ هفته اول تنها موفق به جوانه‌زنی شده و پس از واکشت تغییر چندانی در رشد آن‌ها حاصل نشد. به‌طورکلی به‌نظر می‌رسد پس از هر واکشت علائم کمبود عناصر غذایی قابل ملاحظه‌تر خواهد بود. *اندرو* و *مارین* (Andreu and Marín, 2005) در بررسی خود روی پایه ادسوتو (Adesoto) ترکیب محیط‌کشت را عاملی بسیار تأثیرگذار بر پرآوری معرفی کردند و پس از ۹ واکشت در محیط مشابه، محیط‌کشت QL *کواین و لپوویو* (Quoirn and Lepoivre, 1977) در مقایسه با محیط‌های WPM و MS تعداد نوساقه کمتری تولید کرد. آن‌ها نتایج مشابهی دال بر تأثیر مثبت محیط‌کشت MS در مقایسه با سایر محیط‌ها بر نوساقه‌زایی را گزارش نمودند. تاتاری و همکاران (Tatari *et al.*, 2012) نیز در مطالعه خود محیط‌کشت MS را به‌عنوان محیط‌کشت مناسب جهت پرآوری ۳ پایه جنس پرونوس از جمله پایه رویشی سنت‌جولین A معرفی کردند. به‌هرحال محیط MS به‌عنوان محیط مناسب برای پایه مورد استفاده تشخیص داده شده و از آن به‌عنوان محیط پایه در مطالعات بعدی مورد استفاده قرار گرفت.

تأثیر تنظیم‌کننده‌های رشد

تأثیر BAP و IBA

نتایج تجزیه واریانس نشان داد که BAP و IBA در سطح یک درصد معنی‌داری بر تعداد و طول نوساقه مؤثر بوده و اثر متقابل BAP در IBA در تعداد نوساقه نیز در سطح یک درصد معنی‌دار می‌باشد (جدول ۱).

میانگین تعداد نوساقه تحت تأثیر هر یک از غلظت‌های BAP در سطوح IBA با یکدیگر مقایسه شد (جدول ۲). با توجه به نتایج به دست آمده، بیشترین تعداد نوساقه (۲/۱۲۵ در هر ریزنمونه) در کلیه غلظت‌های IBA همراه با ۰/۵ میلی‌گرم بر لیترBAP و کمترین آن در غلظت‌های ۰/۲۵ و ۱ میلی‌گرم بر لیتر BAP تولید شدند. *داسیلوا* و همکاران (da Silva *et al.*, 2008) در پژوهش خود تأثیر منبع سایتوکینین بر تکثیر یکی از پایه‌های پرونوس (Capdeboscq) را مورد بررسی قرار دادند و BAP را به‌عنوان منبع مناسب سایتوکینین انتخاب و تأثیر آن بر تعداد نوساقه، معنی‌دار گزارش نمودند. گرچه با افزایش مقدار BAP به تنهایی، تعداد نوساقه افزایش می‌یابد ولی با اضافه‌شدن IBA به‌عنوان منبع اکسین علاوه‌بر افزایش در تعداد نوساقه (جدول ۲)، کیفیت نوساقه‌ها نیز به طرز چشمگیری افزایش یافت به‌طوری‌که در کلیه تیمارهای فاقد IBA علائم زردرنگی و بدشکلی در نوساقه‌ها مشاهده شد که با اضافه شدن IBA به محیط این مشکل رفع گردید. با این همه در صفات تعداد و طول نوساقه بین غلظت‌های ۰/۰۵، ۰/۱ و ۰/۲ میلی‌گرم بر لیتر IBA اختلاف زیادی مشاهده نشد. *روزیچ*

و *ووجوویچ* (Ružić and Vujović, 2008) گزارش مشابهی مبنی بر نقش اصلی و تعیین‌کننده سایتوکینین بر پرآوری و تأثیر مثبت حضور IBA در محیط را ارائه کردند. در آزمایش انتخاب محیط‌کشت مشاهده شد که تعداد نوساقه در محیط استقرار MS حاوی BAP و IBA به‌ترتیب با غلظت ۰/۶ و ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر، با کیفیت رویشی مشابه بیشتر از نتایج این آزمایش می‌باشد که ضمن اثبات تأثیر مثبت IBA، نشان‌دهنده‌ی اثر متقابل نسبی این دو هورمون در نوساقه‌زایی و کیفیت رویشی آن‌ها دارد. بنابراین، تیمار ترکیبی از این دو هورمون با دامنه وسیع و فاصله افزایشی کم غلظت، با رعایت نوع و وضعیت ریزنمونه برای تعیین غلظت بهینه اجتناب‌ناپذیر می‌باشد. با این‌حال، *ذوالفقار* و همکاران (Zulfiqar *et al.*, 2009) در آووکادو، *اسنودن* و همکاران (Snowden *et al.*, 2005) که در گیاهان متفاوت و بسته به جایگاه جوانه‌ها در روی ساقه با نسبت‌های متفاوتی از سایتوکینین‌ها و اکسین‌ها فعال می‌شوند و سطح بالای اکسین‌های درون‌زا می‌توانند به‌عنوان بازدارنده ساقه‌زایی عمل کنند. بنابراین سایتوکینین‌ها به همراه اکسین‌ها نقش خود را در کنترل چرخه سلولی ایفا می‌کنند و اغلب وجود تعادلی بین این دو دسته از تنظیم‌کننده‌های رشد جهت شکل‌گیری مریستم‌های ساقه و ریشه ضروری به‌نظر می‌رسد و غلظت بهینه هر یک بسته به نوع گیاه، شرایط کشت و ترکیبات مورد استفاده متفاوت است *جورج* و همکاران (George *et al.*, 2008).

طول نوساقه نیز الگوی مشابهی را نشان داد؛ به‌طوری‌که بیشترین طول (۶/۱۸۷ میلی‌متر) در محیط MS حاوی BAP با غلظت ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر مشاهده شد و حضور IBA تأثیر مثبتی از خود را بر طول نوساقه‌ها نشان داد (جدول ۲).

براساس نتایج این آزمایش BAP و IBA به‌ترتیب با غلظت‌های ۰/۵ و ۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر، با بیشترین طول (۶/۱۸۷ میلی‌متر) و بیشترین تعداد نوساقه (۲/۱۲۵ در هر ریزنمونه) به‌عنوان غلظت بهینه اکسین و سایتوکینین جهت پرآوری پایه سنت‌جولین معرفی و در مراحل بعدی مورد استفاده قرار گرفت.

جدول ۲: جدول مقایسه میانگین تأثیر تنظیم‌کننده‌های رشد بر میانگین تعداد و طول نوساقه

Table 2: Effect of plant growth regulators on mean number and length of shootlet

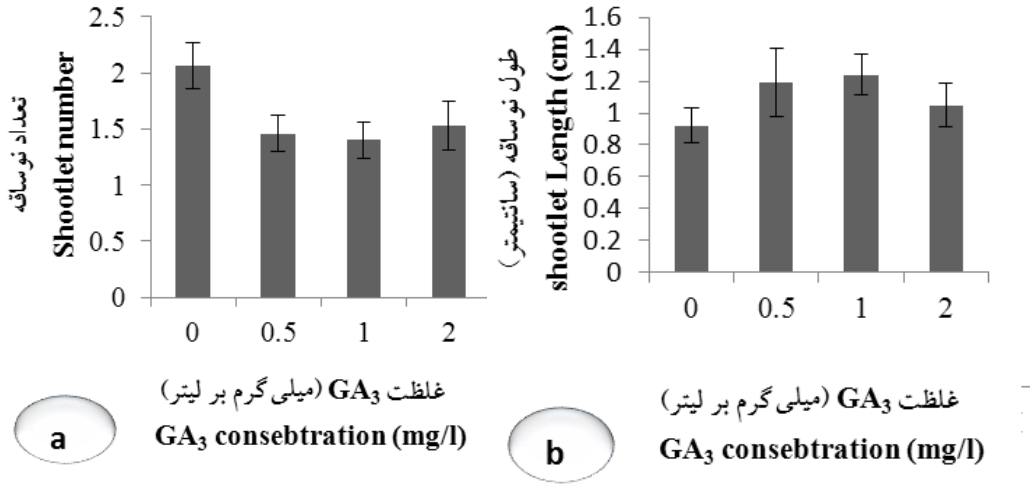
غلظت هورمون (mg) Hormone concentration		تعداد نوساقه Shootlet Number	طول نوساقه (mm) Shootlet Length
BAP	IBA		
0.25	0	0.250±0.118f	2.250±0.281d
0.25	0.05	1.500±0.158abcd	4.062±0.432bc
0.25	0.1	1.687±0.176 abc	5.312±0.545ab
0.25	0.2	1.750±0.170 abc	4.750±0.445abc
0.5	0	1.375±0.286bcd	4.562±0.632abc
0.5	0.05	2.125±0.221a	5.062±0.469abc
0.5	0.1	2.125±0.286a	6.187±0.659a
0.5	0.2	2.00±0.258ab	5.312±0.560ab
1	0	0.937±0.213ed	4.250±0.608bc
1	0.05	1.375±0.179 bcd	4.937±0.495abc
1	0.1	1.312±0.236cd	4.687±0.530abc
1	0.2	0.437±0.128f	3.375±0.314cd

حروف مشابه نشانگر تفاوت معنی‌دار در سطح ۵٪ توسط آزمون دانکن

Same letters are non significant at 5% by Duncan test

تأثیر جیبرلیک‌اسید

با توجه به طول نسبتاً کوتاه نوساقه‌ها در محیط حاوی غلظت بهینه BAP و IBA، تأثیر اسیدجیبرلیک بر صفات طول و تعداد نوساقه مورد مطالعه قرار گرفت. تجزیه واریانس داده‌ها نشان‌دهنده‌ی عدم اختلاف معنی‌دار در غلظت‌های مختلف GA_3 در صفات یاد شده در مقایسه با شاهد (محیط فاقد GA_3) بود (جدول ۱). میانگین‌داده‌ها نشان داد که بلندترین نوساقه‌ها (۱/۲۴ سانتیمتر) در محیط حاوی ۱ میلی‌گرم GA_3 و بیشترین تعداد نوساقه (۲/۰۶±۰/۲۰) در محیط فاقد GA_3 حاصل به‌دست آمد و افزایش هورمون موجب کاهش اندازه هر دو صفت شد (شکل ۲- a و b). *پروسکی* و همکاران (Pruski *et al.*, 2000) در مطالعه‌ای روی ارقام گیلاس نتایج مشابهی مبنی بر تأثیر بازدارنده این هورمون بر ساقه‌زایی گزارش کردند. *حسینی* و همکاران (Hosseini *et al.*, 2011) نیز در بررسی خود اثر GA_3 روی پرآوری *P. mahleb* را منفی گزارش کردند. *اندرسون* و همکاران (Anderson *et al.*, 1982) در پژوهش خود به بررسی تأثیر تنظیم‌کننده‌های رشد بر ریزازدیادی توت‌فرنگی پرداختند، نتایج آن‌ها با مشاهدات به‌دست آمده این آزمایش مبنی بر کاهش تعداد نوساقه (شکل ۲- a) و کاهش طول آن‌ها (شکل ۲- b) در اثر به‌کارگیری جیبرلیک‌اسید مطابقت دارد. به‌هر حال نتایج این آزمایش نشان داد که GA_3 هورمون مؤثری بر پرآوری تعداد نوساقه و افزایش طول آن‌ها در پایه رویشی سنت‌جولین نمی‌باشد. با توجه به امکان وجود اثر متقابل هورمون‌ها بر یکدیگر، شایسته است سه هورمون در ترکیب با هم نیز مورد مطالعه قرار گیرد.



شکل ۲: تأثیر جیبرلیک اسید بر میانگین a) تعداد نوساقه و b) طول نوساقه در محیط MS حاوی BAP و IBA به‌ترتیب ۰/۵ و ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر

Fig. 2: Effect of GA_3 on, a) shootlet Number per explants and b)shootlet Length on MS containing BAP and IBA at concenteration of 0.5 and 0.2 mg/l respectively

تأثیر نوع منبع کربن بر پرآوری و طول نوساقه

تجزیه آماری داده نشان داد که اثرات مستقل و متقابل هر دو قند ساکارز و گلوکز در سطح ۱٪ معنی‌دار می‌باشد (جدول ۱). در محیط حاوی ترکیبی از دو قند با غلظت برابر (۲۰ گرم در لیتر) بیشترین متوسط تعداد نوساقه در هر ریزنمونه (۲/۶۶±۰/۲۳) مشاهده شده شد (جدول ۳). هرچند که این تعداد با متوسط تعداد نوساقه‌ها به‌دست آمده در محیط حاوی ۲۰ میلی‌گرم در لیتر گلوکز و یا به‌طور نسبی با سایر تیمارها تفاوت معنی‌داری نداشت ولی کیفیت رشد نوساقه‌ها در این تیمار به‌مراتب بهتر از سایر تیمارها بود. بلندترین نوساقه‌ها (۸/۵۰ میلی‌متر) در محیط‌کشت حاوی ۳۰ گرم در لیتر ساکارز مشاهده شدند. *یونس* و همکاران (Younas *et al.*, 2007) نیز خود ترکیبی از گلوکز و ساکارز به‌نسبت ۱/۵ /۱/۵٪ را برای تکثیر ساقه با کیفیت مناسب را در پایه GF677 تشخیص دادند، ولی آن‌ها در مطالعه رشد طولی بیشینه نوساقه‌ها را در محیط حاوی ۲۰٪ گلوکز مشاهده کردند. *ابو ریا* و همکاران (Abou Rayya *et al.*, 2011) در مطالعه انفرادی قندهای متفاوت، به‌ترتیب قندهای گلوکز، ساکارز و فروکتوز را در پرآوری ساقه و طول بادام تلخ مناسب گزارش کردند، درحالی‌که در بین آنها ساکارز تأثیر بهتری در کیفیت رشد داشت. در

ریزازدبادی نوساقه در زیتون دیده شد که به‌ترتیب مانیتول و ساکارز بیشترین تعداد نوساقه را تولید کرده ولی محیط حاوی ساکارز نوساقه‌های سالم‌تری تولید می‌کند *گارسیا* و همکاران، *قانع گلمحمدی* و همکاران (Garcia *et al.*, 2002 و Ghane Golmohammadi *et al.*, 2012). *زارعی* و همکاران (Zarei *et al.*, 2012) نیز در مطالعه تأثیر انواع منابع کربوهیدرات در ریزازدیادی پایه گزیلا۶ (Gesila6) بیشترین تعداد و طول نوساقه‌ها به‌ترتیب در محیط‌های حاوی ۳۰ گرم در لیتر شکر معمولی و ساکارز مشاهده کردند: ولی *ناچوا* و *گرچوا* (Nacheva and Gercheva, 2009) در پرآوری پایهٔ رویشی Gisela5 ترکیب ساکارز با سوربیتول به‌نسبت ۲ به ۱ را در بیشترین نرخ تکثیر و طول نوساقه مؤثر دانستند. بنابراین به‌نظر می‌رسد که گیاهان واکنش‌های متفاوتی نسبت به منابع کربوهیدرات، به‌ویژه ترکیب آن‌ها با ساکارز به‌عنوان منبع انرژی از خود نشان می‌دهند که باید بیشتر مورد بررسی قرار گیرد.

تحریک ریشه‌زایی

نتایج کیفی نشان داد که شادابی گیاهچه‌ها در روش پالسینگ به‌مراتب بالاتر از روش معمولی بوده و IBA مؤثرتر از NAA در تحریک ریشه‌زایی عمل می‌کند. لذا در اینجا تنها داده‌های مربوط به پیش‌تیمار IBA ذکر شده است. نتایج تجزیه واریانس نشان داد که مدت زمان پیش‌تیمار IBA در هر دو صفت تعداد و درصد ریشه‌زایی در سطح ۱٪ معنی‌دار می‌باشد (جدول ۴). بیشترین تعداد ریشه (۱/۸۲±۰/۰۶) در تیمار زمانی ۲۰ دقیقه و کمترین مقادیر در تیمارهای ۵ ثانیه و ۵ دقیقه مشاهده شد (شکل ۳-a). افزایش تعداد ریشه در تیمار IBA ممکن است به‌علت تغییر در فعالیت بافت کامبیوم در پاسخ به تیمار IBA باشد *دیگبی و وانگرمن* (Digby and Wangermann, 1965). *ولاندر* (Welander, 1983) افزایش تعداد ریشه را در به‌کارگیری IBA نتیجه افزایش قابلیت ارتجاعی بافت کامبیوم و افزایش سرعت تقسیم سلولی در ریزنمونه‌های به‌کار گرفته شده بیان کرد. در تیمار با NAA بیشترین تعداد ریشه (۲/۴۳) در مدت زمان ۵ دقیقه مشاهده شد و با افزایش زمان پالسینگ کاهش یافت. بیشترین درصد ریشه‌زایی (۷۷/۲۸٪) در تیمار IBA با ۱۰ دقیقه پالسینگ (شکل ۳-b) و در تیمار NAA به ۲۰ دقیقه پالسینگ (۷۵٪) اختصاص یافت. تحقیقات نشان می‌دهد که مدت زمان تیمار اکسین در آزمایش‌های ریشه‌زایی به‌دلیل تأثیر اکسین بر شکل‌گیری ساختارهای اولیه ریشه امری حیاتی است که اثر آن بر ریشه‌زایی تا یک دوره زمانی افزایشی و از آن به بعد به‌عنوان عامل محدودکننده ریشه‌زایی به شمار می‌رود *ترسو* و همکاران (Tereso *et al.*, 2008).

مشاهده‌ها نشان داد که نوساقه‌های تیمار شده با IBA کاملاً سالم و از نظر کیفی وضعیت مطلوبی داشتند (شکل ۴-b) درحالی‌که تیمار NAA با افزایش مدت زمان تأثیر نامطلوبی بر شکل ظاهری و رشد طبیعی نوساقه‌ها داشت (شکل ۴-a). به‌نظر می‌رسد که علائم فوق به‌علت خارج کردن نوساقه از داخل محیط‌کشت و قرار دادن در محلول ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر NAA، علاوه‌بر افزایش خطر آلودگی گیاه، به‌علت شوک وارد شده به گیاه ناشی از تغییر محیط، همچنین تأثیر سمی NAA در غلظت‌های بالا باشد که علاوه‌بر کاهش عملکرد ریشه‌زایی *لین* (Lane, 1979) بر کیفیت نوساقه‌ها نیز تأثیر می‌گذارد.

گیاهچه‌های ریشه‌دار شده با وضعیت مطلوب کیفی و رشد مناسب ریشه (شکل ۴-c) جهت سازگاری انتخاب و به گلدان‌های حاوی مخلوط پرلیت/پیت‌ماس، به‌نسبت ۱/۳ در داخل اتاقک سازگاری با رطوبت بالا و شرایط نوری مشابه اتاق رشد منتقل شدند. پس از گذشت ۱ هفته به‌تدریج رطوبت اتاقک رشد را در طول ۳ هفته کاهش داده تا پس از تشکیل لایه کوتیکول بر سطح بافت به‌تدریج در معرض نور طبیعی خورشید قرار گرفتند. چهار هفته پس از شروع عملیات سازگاری نهال‌ها به‌طور کامل از اتاقک سازگاری خارج و در گلخانه مستقر شدند (شکل ۴-d). راندمان سازگاری در گذر از مراحل فوق معادل ۶۰٪ به ثبت رسید.

جدول ۳: جدول مقایسه میانگین تأثیر منبع کربن بر میانگین تعداد و طول نوساقه

Table 3: Effect of carbon source on mean number and length of shootlet

غلظت منبع کربن(g/l) Carbon source concentration		تعداد نوساقه Shootlet Number	طول نوساقه(mm) Shootlet Length
گلوکز(glucose)	ساکارز(sucrose)		
0	0	1.00b	1.50±0.18d
	10	1.38±0.13ab	2.88±0.20c
	20	1.99±0.13a	5.63±0.52b
	30	1.75±0.14ab	8.50±0.71a
10	0	1.25±0.11b	3.33±0.57c
	10	1.500±0.20ab	5.56±0.75b
	20	1.60±0.13a	7.13±0.52a
	30	1.82±0.18a	6.18±0.44ab
20	0	2.13±0.20ab	6.38±0.35b
	10	1.63±0.15bc	5.44±0.34c
	20	2.66±0.23a	7.81±l.52a
	30	1.44±0.13c	5.19±0.26c
30	0	1.69±0.15a	4.44±0.46b
	10	1.56±0.20a	5.00±0.52b
	20	1.60±0.13a	8.13±0.65a
	30	1.65±0.17a	5.71±0.60b

حروف مشابه نشانگر تفاوت معنی‌دار در سطح ۵٪ توسط آزمون دانکن

Same letters are non significant at 5% by Duncan test

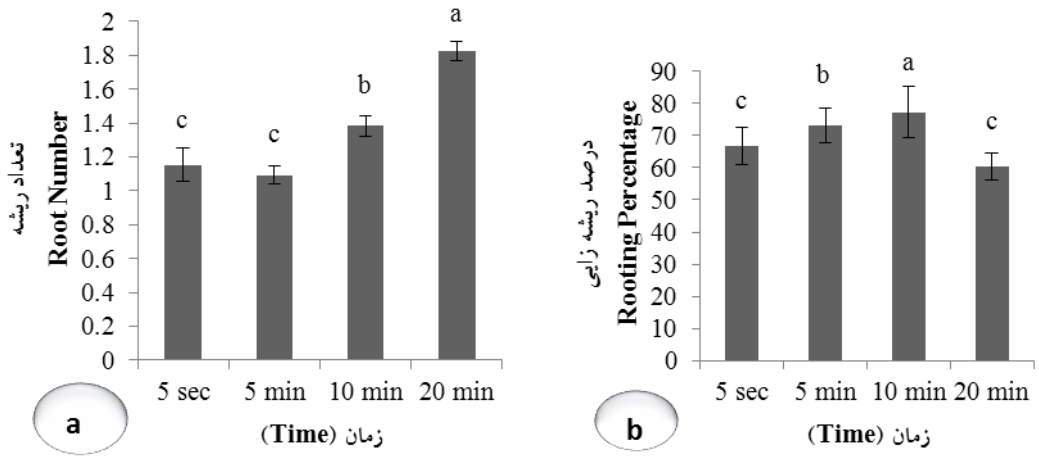
جدول ۴: تجزیه واریانس در روش پالسینگ IBA در ریشه‌زایی

Table 4: Analysis of variance for the effect of IBA pulsing method on rooting.

منبع تغییرات S.O.V.	درجه آزادی df	میانگین مربعات (MS) درصد ریشه‌زایی Rooting percentage	تعداد ریشه Root Number
زمان پالس (Pulse time)	3	0.033**	1.760**
خطای نمونه‌برداری (Sampling error)	12	0.053	0.043
خطای کل (Total error)	48	0.059	0.098
ضریب تغییرات ٪(CV)	-	3.39	23.003

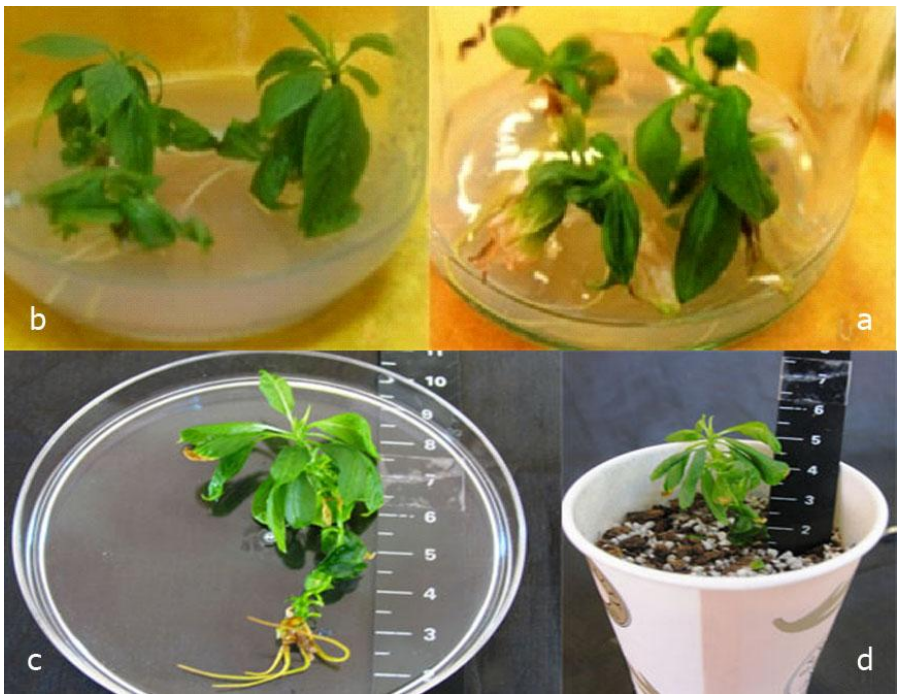
**: معنی‌دار در سطح احتمال ۱٪.

**: Significant at 1% probability level respectively



شکل ۳: تأثیر مدت زمان پیش‌تیمار IBA بر a) تعداد ریشه و b) درصد ریشه‌زایی

Fig. 3: Effect of IBA pretreatment time on, a) Root Number and b) Rooting Percentage



شکل ۴- a) گیاهچه ریشه‌دار شده با NAA، b) گیاهچه ریشه‌دار با IBA، c)گیاهچه ریشه‌دار انتخاب شده جهت سازگاری، d) گیاهان سازگار شده انتقال‌یافته به گلخانه

Fig. 4: a)Rooted explants by NAA, b) Rooted explants by IBA, c) Rooted explants selected for acclimatization and d) acclimatized plants transferred to greenhouse

منابع:

جهت ملاحظه منابع به صفحه‌های ۳-۵ متن انگلیسی مراجعه شود.