Iranian Journal of Horticultural Science
Vol 50, No 1, Spring 2019 (187-196)
DOI: 10.22059/ijhs.2018.248845.1370

علوم باغبانی ایران
دورهٔ ۵۰، شمارهٔ ۱، بهار ۱۳۹۸ (ص ۱۹۶-۱۸۷)

اثر محیط کشت و تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی بر ریزازدیادی پایه نیمه‌پاکوتاه‌کننده گیلاس CAB-6P

ملیحه فلاح‌پور[1*]، سید مهدی میری[2] و ناصر بوذری[3]
۱. دانشجوی سابق دکتری، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل، ایران
۲. دانشیار، دانشکده کشاورزی، واحد کرج، دانشگاه آزاد اسلامی، کرج، ایران
۳. دانشیار، مؤسسه تحقیقات علوم باغبانی، پژوهشکده میوه‌های معتدله، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران
(تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۱۰/۳۰ - تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۲/۸)

چکیده

پایه CAB-6P به‌عنوان پایه‌ای نیمه‌پاکوتاه برای درختان گیلاس و آلبالو استفاده می‌شود. هدف از این تحقیق، تعیین مناسب‌ترین محیط کشت و تنظیم‌کننده‌های رشد جهت ریزازدیادی پایه CAB-6P می‌باشد. در مرحله پرآوری ریزنمونه‌ها در ۳ محیط کشت MS، DKW و WPM با غلظت‌های مختلف تنظیم‌کننده رشد BA (۰/۵، ۱ و ۲ میلی‌گرم در لیتر) در ترکیب با کینتین (صفر و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر) کشت شدند. برای ریشه‌زایی از دو محیط کشت MS و WPM با ٤ غلظت IBA (۰، ۰/۵، ۱ و ۲ میلی‌گرم در لیتر) استفاده شد. نتایج آزمایش نشان داد که محیط کشت WPM حاوی ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BA، با نرخ تکثیر ۸/۱ شاخساره به‌ازای ریزنمونه، مناسب‌ترین تیمار پرآوری می‌باشد. بالاترین درصد ریشه‌زایی به‌میزان ٦۹ درصد در محیط کشت MS حاوی ۲ میلی‌گرم در لیتر IBA به‌دست آمد. گیاهچه‌های ریشه‌دارشده، به بستر کشت پیت‌ماس:کوکوپیت:پرلایت (۱:۲:۲ حجمی) منتقل و ۸۸ درصد گیاهچه‌ها با موفقیت سازگار شدند.

واژه‌های کلیدی: پرآوری، ریشه‌زایی، کشت بافت، محیط کشت، *Prunus*.

Effects of media cultures and plant growth regulators on micropropagation of CAB-6P cherry semi-dwarf rootstock

Maliheh Fallahpour[1*], Seied Mehdi Miri[2] and Naser Bouzari[3]
1. Former Ph.D. Student, Faculty of Agriculture and Natural Resources, Mohaghegh Ardabili University, Ardabil, Iran
2. Associate Professor, Faculty of Agriculture, Karaj Branch, Islamic Azad University, Karaj, Iran
3. Associate Professor, Horticultural Science Research Institute, Temperate Fruits Research Center, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran
(Received: Jan. 20, 2018 - Accepted: Apr. 28, 2018)

ABSTRACT

CAB-6P is used as a semi dwarf rootstock for sweet and sour cherries. The purpose of this study was to determine the best media culture and plant growth regulators on micropropagation of CAB-6P rootstock. Shoot-tips were cultured on three culture media (MS, DKW and WPM) containing different concentrations of BAP (0.5, 1 and 2 mg/L) in combination with Kin (0 and 0.5 mg/L) for proliferation. Multiplied shoots were rooted on MS or WPM media supplemented with IBA (0, 0.5, 1 and 2 mg/L). Results showed that the most suitable multiplication medium was WPM+0.5 mg/L BA with 8.1 shoots per explant. The highest rooting percentage (69%) was obtained with MS+2 mg/L IBA. Well rooted plantlets were transferred to peat moss:cocopeate:perlite (2:2:1 v/v) substrate and successfully hardened (88%).

Keywords: Culture medium, multiplication, *Prunus*, rooting, tissue culture.

* Corresponding author E-mail: falahpor.m88@gmail.com

مقدمه

یکی از مشکلات مهمی که در باغ‌های گیلاس کشور مشاهده می‌شود، رشد بیش از حد درختان روی پایه‌های موجود که عمدتاً پایه‌های بذری آلبالو تلخ بوده، می‌باشد (Gangi Moghadam *et al*., 2008). برای دستیابی به درختان میوه کم‌ارتفاع و یکدست، بایستی از پایه‌های رویشی پاکوتاه[1] و نیمه‌پاکوتاه[2] استفاده شود (Gyeviki, 2005). این پایه‌ها به دلایل متعدد از جمله یکنواختی اندازه درختان پیوندشده بر روی آنها، مدیریت کارآ در برنامه‌های داشت و برداشت در باغ، مقاومت به برخی از آفات و بیماری‌ها، تولید محصول یکنواخت و عملکرد بالا در واحد سطح، هر روزه اهمیت بیشتری پیدا می‌کنند (Mahdavian *et al*., 2010). باغداران با استفاده از پایه‌های پاکوتاه و نیمه‌پاکوتاه کننده قادر به احداث باغ‌های متراکم می‌شوند و علاوه بر افزایش بازده محصول، میوه‌هایی با کیفیت بیشتر برداشت خواهند نمود که سرانجام منجر به کاهش هزینه‌های تولید و ایجاد درآمد بالاتر برای باغدار می‌گردد (Erwin & Ribeiro, 1996; Long & Kaiser, 2010).

CAB-6P پایه‌ای نیمه‌پاکوتاه‌کننده و مناسب برای گیلاس و آلبالو می‌باشد که توسط محققین ایتالیایی در دانشگاه بولونیا[3] گزینش شده است. این پایه با محدوده وسیعی از خاک‌ها و به‌ویژه خاک‌های سنگین و آهکی سازگاری دارد. CAB-6P سبب افزایش عملکرد شده و اندازه ارقام پیوندشده بر روی آن ۳۰ درصد کوتاه‌تر از ارقام پیوندی بر روی پایه‌های بذری است. همچنین، این پایه سبب القاء زودرسی محصول گردیده و میوه‌های تولیدشده بر روی آن دارای کیفیت و رنگ بهتر و همچنین اندازه‌ای مناسب می‌باشند (Sarropoulou *et al*., 2013).

روش مرسوم تکثیر پایه‌های گیلاس استفاده از قلمه و بذر بوده که این روش‌ها نسبتاً کُند بوده و نیازمند زحمت و نیروی کارگری زیاد می‌باشند. علاوه بر این، تکثیر از طریق بذر، سبب تنوع ژنتیکی در نتاج نیز می‌گردد. در حال حاضر، بهترین راه تکثیر انبوه و تجاری پایه CAB-6P، تکثیر رویشی از طریق کشت بافت است. کشت بافت، تولید در مقیاس وسیع با سرعتی بالا را تضمین می‌کند و با این روش می‌توان گیاهانی یکدست، مشابه پایه مادری و عاری از بیماری و آلودگی تولید نمود (Sarropoulou *et al*., 2013). میزان مواد غذایی (عناصر پرمصرف[4] و کم‌مصرف[5])، نوع ویتامین‌ها، نوع و غلظت تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی و مواد افزودنی آلی موجود در محیط کشت بر موفقیت کشت درون‌شیشه‌ای تأثیرگذار می‌باشند (Miri *et al*., 2003a; Hasanloo *et al*., 2014; Shi, 2014) و با توجه به واکنش ویژه هر جنس، گونه و رقم خاص به عوامل مختلف سهیم در محیط کشت، لازم است شرایط کشت برای هر گیاه بهینه شود (Miri *et al*., 2003b; Zarei *et al*., 2013). با استناد به پژوهش‌های انجام‌شده، به‌منظور پرآوری[6] پایه CAB-6P، غالباً سیتوکینین BA (بنزیل‌آدنین) مورد استفاده قرار می‌گیرد (Sarropoulou *et al*., 2014b). همچنین با بهره‌گیری از BA، به پرآوری مطلوبی نیز در *Prunus virginiana* L. و *P. pensylvanica* L. دست یافته‌اند (Pruski *et al*., 2000). Mahdavian *et al*. (2010) دریافتند محیط کشت DKW حاوی ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BA بهترین محیط برای پرآوری پایه SL-64 محلب می‌باشد. آنها همچنین دریافتند بهترین محیط کشت پرآوری و ریشه‌زایی پایه PHL-A به‌ترتیب MS حاوی ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BA و DKW بدون تنظیم‌کننده‌های رشد است (Mahdavian *et al*., 2011). Mihovilović Bošnjak *et al*. (2012) اثر محیط کشت QL حاوی غلظت‌های مختلف BA، TDZ (تیدیازورون) و Kin (کینتین) را بر پرآوری پایه Gisela 5 بررسی کرده و مشاهده کردند ضریب تکثیر شاخساره در محیط کشت حاوی ۱ میلی‌گرم در لیتر BA یا ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر TDZ بیشتر می‌باشد. Zarei *et al*. (2013) به‌منظور بهینه‌سازی ریزازدیادی پایه Gisela 6، اثر نوع محیط کشت، منبع کربن و شیوه کاربرد اکسین در

1. Dwarf rootstocks
2. Semi-dwarf rootstocks
3. Bologna
4. Macronutrients
5. Micronutrients
6. Proliferation

نوساقه‌زایی و ریشه‌زایی را مورد مطالعه قرار دادند. نتایج نشان داد که بیشترین تعداد و طول نوساقه در محیط کشت MS حاوی ۳۰ گرم در لیتر ساکارز به‌دست آمد. بیشترین تحریک ریشه‌زایی نیز در روش پالسینگ در حضور ۱ میلی‌گرم در لیتر IBA (ایندول‌بوتیریک‌اسید) در مدت ۱۰ و ۲۰ دقیقه اتفاق افتاد. Sarropoulou *et al.* (2013) تأثیر ال-متیونین و IBA بر ریشه‌زایی درون‌شیشه‌ای شاخساره‌های CAP-6P و Gisela 6 را بررسی کرده و بالاترین درصد ریشه‌زایی را در ترکیب ۲ میلی‌گرم در لیتر IBA و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر ال-متیونین به‌دست آوردند. همچنین آنها دریافتند دیکگولاک سدیم[1] تأثیری بر پرآوری شاخساره CAB-6P ندارد؛ اما در غلظت ۸۰ میکرومول موجب افزایش تعداد شاخساره در پایه Gisela 6 می‌شود (Sarropoulou *et al*., 2014a). در آزمایش دیگری به‌منظور مطالعه اثر پلی‌آمین‌ها بر ریزازدیادی پایه CAB-P مشاهده کردند که بالاترین تعداد و درصد پرآوری شاخساره با ۱ میلی‌گرم در لیتر اسپرمیدین و بیشترین تعداد ریشه و درصد ریشه-زایی به‌ترتیب با ۱ و ۲ میلی‌گرم در لیتر پوترسین به‌دست می‌آید (Sarropoulou *et al*., 2017).

از اهداف اصلی تحقیق حاضر بررسی پرآوری و ریشه‌زایی درون‌شیشه‌ای پایه CAB-6P در محیط کشت‌های مختلف با ترکیبات متفاوت تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی می‌باشد تا بتوان یک پروتکل مطلوب جهت ریزازدیادی پایه CAB-6P معرفی نمود.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی

از شاخه‌های نیمه‌خشبی نهال‌های دو ساله پایه CAB-6P واقع در گلخانه پژوهشکده میوه‌های معتدله و سردسیری موسسه تحقیقات علوم باغبانی در شهریور ماه به‌عنوان مواد گیاهی استفاده شد. شاخه‌ها درون پلاستیک قرار گرفت و جهت انجام آزمایشات مربوطه به آزمایشگاه تحقیقاتی دانشگاه آزاد اسلامی-واحد کرج منتقل گردید.

1. Dikegulac sodium

ضدعفونی و استقرار

برای استریل سطحی، قطعات شاخه به‌مدت یک ساعت در زیر جریان آب جاری قرار گرفتند و سپس به‌مدت ۱۵ دقیقه در محلول ۲/۵ درصد هیپوکلریت‌سدیم (وایتکس ۵۰ درصد) قرار گرفته و سپس سه مرتبه با آب‌مقطر استریل شستشو شدند. قطعه‌های گره‌دار[2] استریل جهت استقرار در لوله‌های آزمایش حاوی ۱۰ میلی‌لیتر از محیط کشت پایه MS بدون تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی قرار داده شدند. بعد از ۲ هفته، ریزنمونه‌های سالم رشدیافته به شیشه‌های بزرگ‌تر حاوی ۵۰-۴۰ میلی‌لیتر از محیط کشت مشابه قبل انتقال یافتند. بعد از سه بار واکشت[3] به فاصله زمانی چهار هفته، ریزنمونه‌های نوک شاخساره در محیط کشت‌های پرآوری قرار گرفتند. ریزنمونه‌های کشت‌شده، در اتاقک رشد با دمای ۲۳ درجه سانتی‌گراد و ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی زیر نور فلئورسنت سفید خنک و لامپ‌های زرد گازی با شدت نور ۴۰۰۰ لوکس مستقر شدند.

پرآوری

جهت بررسی پرآوری ریزنمونه‌ها از سه نوع محیط کشت پایه MS، DKW[4] و WPM[5] همراه با سه سطح از تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی بنزیل‌آدنین (BA) (۰/۵، ۱ و ۲ میلی‌گرم در لیتر) در ترکیب با ۲ غلظت از کینتین (Kin) (صفر و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر) استفاده شد. هر محیط حاوی ۳۰ گرم در لیتر ساکارز و هفت گرم در لیتر آگار بوده و pH برای همه محیط‌ها قبل از اتوکلاوکردن به‌مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد برابر با ۵/۷ تنظیم شد. ریزنمونه‌های نوک شاخساره به طول حدود ۲ سانتی‌متر در شرایط استریل در درون محیط‌های پرآوری قرار گرفتند. ۴۵ روز بعد از انتقال، درصد تولید شاخساره جانبی و تعداد و طول شاخساره‌های تولیدشده محاسبه شد. درصد تولید شاخساره جانبی

2. Nodal segments
3. Subculture
4. Driver-Kuniyuki Walnut medium (DKW), 1984
5. Woody Plant Medium (WPM); McCown & Lloyd, 1981

بر اساس ریزنمونه‌هایی که تولید شاخساره جانبی داشتند نسبت به کل ریزنمونه ها محاسبه و به‌صورت درصد بیان گردید.

ریشه‌زایی

به‌منظور تعیین محیط مناسب ریشه‌زایی، شاخساره‌های پرآوری‌شده با طول ۳-۲ سانتی‌متر داخل ظروف محتوی ۵۰-۴۰ میلی‌لیتر از محیط‌های MS و WPM همراه با چهار سطح مختلف از تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی ایندول‌بوتریک‌اسید (IBA) (صفر، ۰/۵، ۱ و ۲ میلی‌گرم در لیتر) قرار داده شدند. در نهایت ۴۵ روز بعد از قرارگیری ریزنمونه‌ها در محیط ریشه‌زایی، نتایج مربوط به درصد ریشه‌زایی و تعداد و طول ریشه اصلی یادداشت‌برداری شد. میزان ساکارز ۳۰ گرم در لیتر، آگار ۷ گرم در لیتر و pH تقریباً برابر با ۵/۷ تنظیم شد.

انتقال به خاک و سازگاری

گیاهچه‌های دارای ریشه‌های مطلوب به ظروف درب‌دار حاوی مخلوط حجمی از پیت‌ماس، کوکوپیت و پرلایت (۱:۲:۲) منتقل شدند. برای حذف کامل بقایای آگار و محیط کشت، ریشه‌ها قبل از انتقال با دقت زیر جریان آب جاری شستشو داده شدند. بعد از ۴۰ روز، گیاهچه‌های سازگارشده به گلدان‌های کوچک پلاستیکی انتقال یافتند. شرایط محیطی مرحله پرآوری، ریشه‌زایی و سازگاری مشابه مرحله استقرار بود.

طرح آماری

آزمایش به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۳ تکرار در مرحله پرآوری و هر تکرار با ۲ مشاهده و ۴ تکرار و هر تکرار با ۴ مشاهده در مرحله ریشه‌زایی به اجرا درآمد. تجزیه واریانس داده‌ها و محاسبه ضریب همبستگی به‌روش پیرسون با استفاده از نرم‌افزار SPSS.21 صورت گرفت و مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ۱ انجام شد. کلیه نمودارها توسط نرم‌افزار Excel رسم گردید.

نتایج و بحث

استریل سطحی

نرخ آلودگی در مرحله استقرار ریزنمونه‌ها ۲٪ بود. گزارش‌های زیادی مبنی بر موفقیت ضدعفونی سطحی ریزنمونه‌های گیلاس با استفاده از هیپوکلریت‌سدیم وجود دارد (Pruski *et al*., 2005; Kalinina & Brown, 2007).

پرآوری

نتایج تجزیه واریانس داده‌ها بیانگر اثر معنی‌دار محیط‌های رشد و BA بر تعداد و طول شاخساره تولیدشده بود. استفاده از هورمون، اختلاف معنی‌داری را در پرآوری ریزنمونه‌ها سبب نشد. درصد شاخساره‌زایی در ۳ محیط MS، DKW و WPM به‌ترتیب برابر با ۱۰۰، ۱۰۰ و ۹۷ درصد بود که تفاوت آماری معنی‌داری را با هم نشان ندادند. تجزیه و تحلیل‌های آماری نشان داد که بیشترین تعداد شاخساره تولیدی ۸/۱۶ شاخساره به‌ازای هر ریزنمونه اولیه و همچنین بالاترین طول شاخساره ۱/۴۶ سانتی‌متر مربوط به محیط WPM+0.5 mg/L BA بوده است (شکل ۱-A, B). همچنین شکل ظاهری و کیفیت شاخساره‌های تولیدشده در محیط کشت WPM از سایر محیط‌های کشت بهتر بوده و پدیده شیشه‌ای‌شدن[1] در ریزنمونه‌های حاضر در این محیط مشاهده نشد و در نتیجه شاخساره‌های تولیدشده در این محیط برای ریشه‌دار شدن و تولید گیاهچه، مطلوب‌تر بودند. اختلاف پرآوری در محیط‌های مختلف در شکل ۴-A، B و C نشان داده شده است (جدول ۱).

نتایج به‌دست‌آمده با بررسی‌های Sisko (2011) و Fallahpour *et al*. (2015) که گزارش نمودند محیط کشت WPM بیشترین نرخ تکثیر را در ریزنمونه‌های پایه Gisela5 داشته است، مشابهت دارد. همچنین Karamad *et al*. (2014) نیز از بین سه محیط کشت MS، DKW و WPM مورد استفاده به‌منظور پرآوری ریزنمونه‌های Gisela6، مطلوب‌بودن محیط کشت

1. Vitrification

WPM با بیشترین تعداد و طول شاخساره را نسبت به سایر محیط‌ها نشان دادند. در بررسی حاضر، محیط کشت DKW به‌عنوان محیط مطلوب بعد از WPM قرار گرفت و نسبت به محیط MS پرآوری بهتری از نظر تعداد و طول شاخساره نشان داد. Bell *et al.* (2009) نیز برتری DKW را نسبت به MS از نظر تولید شاخساره در دو رقم گلابی گزارش نموده‌اند. از سویی دیگر Zhang *et al.* (2000) این‌چنین گزارش کردند که استقرار و پرآوری *P. virginiana* در محیط MS بهتر از WPM می‌باشد. Hammatt & Grant (1993) نیز در استقرار ریزنمونه‌های گیلاس وحشی، به نتیجه مشابهی با Zhang *et al.* (2000) دست یافته‌اند. نتایج دو پژوهش اخیر با نتایج آزمایش حاضر مطابقت ندارد که دلیل آن اثرات متقابل پایه رویشی و محیط کشت یا به‌عبارت دیگر وابستگی کارایی محیط کشت با ژنوتیپ می‌باشد (Janekova, 1985; Tatari Varnousfaderani *et al.*, 2012). ترکیبات معدنی موجود در محیط کشت یک عامل مهم تأثیرگذار در تکثیر درون‌شیشه‌ای می‌باشد (Fallahpour *et al.*, 2015; Erfani *et al.*, 2017). اگرچه هنوز به‌طور گسترده از محیط کشت MS استفاده می‌شود؛ اما در مواردی با محیط‌های دیگر و به‌ویژه محیط‌هایی با غلظت کمتر نیتروژن به شکل نیترات‌آمونیوم جایگزین می‌شود. میزان نیترات‌آمونیوم در محیط MS برابر با ۱۶۵۰ میلی‌گرم در لیتر و در دو محیط DKW و WPM به‌ترتیب برابر با ۱۴۱۶ و ۴۰۰ میلی‌گرم در لیتر می‌باشد. اکثر گیاهان نیترات را به آمونیوم ترجیح می‌دهند (Pierik 1997; Mansseri-Lamrioui *et al.*, 2011)، چرا که نیترات در صورت فزونی می‌تواند در واکوئل‌ها تجمع بیابد؛ اما زیادی آمونیوم می‌تواند اثر سمیت داشته باشد (Glass *et al.*, 2002). از سویی دیگر دو محیط کشت WPM و DKW در مقایسه با محیط کشت MS دارای کلسیم بیشتری بوده و کلسیم نقش پراهمیتی را در سیگنال‌دهی بین سلول‌های گیاه ایفا می‌کند (Reddy, 2001). به‌علاوه ممکن است کلسیم اثر مستقیم بر رشد سلول و اندام داشته باشد و بر کشیدگی و تقسیم سلولی تأثیرگذار باشد. کلسیم بر pH درون سلولی اثر گذاشته و همچنین به‌عنوان یون تنظیمی جهت تعیین منبع-مقصد و جابه‌جاشدن کربوهیدرات‌ها عمل می‌کند و به‌همین واسطه بر سلول‌ها و دیواره سلولی اثر می‌گذارد (Hirschi, 2004).

با توجه به نتایج آزمایش، مشخص گردید با افزایش غلظت BA، تعداد و طول شاخساره‌ها در محیط کشت WPM کاهش یافته است (شکل ۱). این نکته توسط Pruski *et al.* (2005) نیز تأیید شده است. در محیط کشت پرآوری، تغییر در نوع و میزان سیتوکینین‌ها ممکن است در پرآوری شاخساره‌ها تأثیرگذار باشد. بدین معنی که با افزایش غلظت BA در محیط کشت، طول شاخساره‌ها کاهش یابد (Miri *et al.*, 2003b; Khosravinezhad *et al.*, 2016). Mahdavian *et al.* (2010) محیط کشت DKW همراه با ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BA را مناسب‌ترین محیط برای پرآوری پایه رویشی محلب سنت‌لوسی ۶۴ معرفی کردند که هم‌سو با مشاهدات بررسی حاضر که محیط کشت WPM و DKW حاوی ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BA را به‌عنوان محیط مطلوب معرفی نموده‌ایم، می‌باشد.

نتایج همبستگی نشان داد که بین تعداد و طول شاخساره رابطه مثبت معنی‌داری وجود دارد، به این معنی که با افزایش تعداد شاخساره، طول شاخساره افزایش می‌یابد (جدول ۱). در واقع محیط کشت مناسب پرآوری، موجب شکستن غالبیت انتهایی و افزایش تعداد شاخساره‌های جانبی شده و از طرفی با تحریک رشد و تقسیم سلولی سبب طویل‌شدن شاخساره‌ها گردید. Fallahpour *et al.* (2015) نیز دریافتند با افزایش تعداد شاخساره‌ها، طول شاخساره‌ها نیز افزایش می‌یابد.

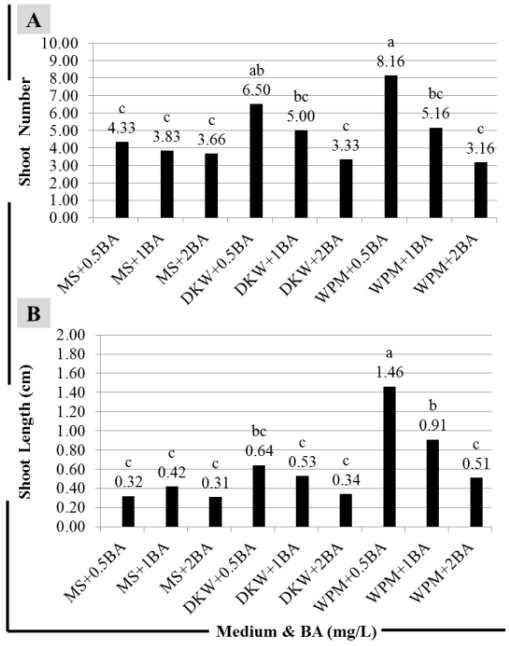
جدول ۱. ضریب همبستگی بین درصد شاخساره‌زایی و تعداد و طول شاخساره‌های CAB-6P

Table 1. Correlation coefficient between shoot multiplication percentage, shoot number and shoot length of CAB-6P

Trait	Shoot No	Shoot length
Shoot length	0.71**	
Shoot multiplication (%)	0.17	0.08

**: معنی‌دار در سطح احتمال ۱ درصد

**: significant at 1% of probability level.



شکل ۱. مقایسه میانگین تأثیر محیط کشت و BA بر پرآوری شاخساره‌های CAB-6P در شرایط درون‌شیشه‌ای. A) تعداد شاخساره، B) طول شاخساره

Figure 1. Mean comparison for effect of media and BA on proliferation of CAB-6P shoots in *in vitro* conditions. A) shoot number, B) shoot length

ریشه‌زایی

بر اساس نتایج آماری حاصل‌شده، محیط کشت به‌تنهایی بر هیچ یک از صفات تعداد، طول و درصد ریشه‌زایی اثر معنی‌داری را سبب نشده است. غلظت‌های مختلف IBA بر تعداد و درصد ریشه‌زایی ریزنمونه‌ها اثر معنی‌داری را ایجاد کرد اما بر طول ریشه‌ها اثر معنی‌دار نداشت. بیشترین تعداد ریشه در محیط دارای ۲ میلی‌گرم در لیتر IBA حاصل شد که میانگین آن برابر با ۶/۷۵ بوده است. کمترین میزان این شاخص مربوط به محیط بدون تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی می‌شد که به‌طور میانگین برابر با ۱/۶۲ ریشه به‌ازای هر ریزنمونه به‌دست آمد (شکل۲). اثر متقابل محیط کشت و هورمون IBA بر طول ریشه و درصد ریشه‌زایی معنی‌دار بود. بالاترین طول ریشه مربوط به محیط کشت MS حاوی ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر IBA و WPM بدون تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی (به‌ترتیب ۱۰/۲۴ و ۹/۳۴ سانتی‌متر) بود که البته اختلاف معناداری با سایر محیط‌ها به‌جز محیط کشت MS بدون تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی که ریشه‌ای در آن تشکیل نشد، نشان ندادند (شکل A-۳). بیشترین درصد ریشه‌زایی نیز در محیط کشت‌های MS حاوی ۲ میلی‌گرم در لیتر IBA (۶۸/۷ درصد) و WPM حاوی ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر IBA (۵۶/۲ درصد) به‌دست آمد که اختلاف معنی‌داری با سایر محیط‌ها به‌جز MS بدون تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی نداشت (شکل B-۳). به‌طور کلی و با نظر به مشاهدات آماری حاصل از این آزمایش و با در نظر داشتن تمامی صفات در این مرحله، می‌توان محیط MS حاوی ۲ میلی‌گرم در لیتر IBA را به‌عنوان مناسب‌ترین محیط ریشه‌زایی برای این پایه معرفی نمود. درصد ریشه‌زایی و طول ریشه در این محیط به‌ترتیب برابر با ۶۸/۷۵ درصد و ۶/۰۳ سانتی‌متر بود. شاخساره‌های ریشه‌دار شده در غلظت‌های مختلف IBA را می‌توان در شکل ۵ مشاهده نمود. گزارش شده است در پایه Gisela5، ریشه‌زایی در محیط کشت WPM نسبت به محیط MS افزایش یافته است (Fallhpour *et al*., 2015) که دلیل آن می‌تواند غلظت پایین‌تر مواد معدنی و به‌ویژه نیتروژن موجود در آن باشد که گزارشات دیگری مبنی بر افزایش توان ریشه‌زایی با رقیق‌شدن محیط کشت MS در پایه‌های CAB-6P، GF 677 و PR 204/84 (Dimassi-Theriou, 1995; Fotopoulos & Sotiropoulos, 2005; Sarropoulou *et al*., 2013) وجود دارد. در سال ۲۰۰۸، طی پژوهشی اعلام شد که با کاهش غلظت نیترات‌آمونیوم، تعداد ریشه‌ها بیشتر اما طول آنها کمتر می‌شود (Buyukdemirci, 2008). در این آزمایش نیز طول ریشه در محیط کشت WPM که نیترات‌آمونیوم کمتری نسبت به محیط MS دارد پایین‌تر بود؛ هرچند که از نظر آماری تفاوت معنی‌داری بین دو محیط وجود نداشت.

نتایج به‌دست‌آمده در این مرحله با نتایج پژوهشی که بر روی ریزازدیادی پایه Gisela6 (Sarropoulou *et al*., 2013; Karamad *et al*., 2014) انجام شد و بیشترین تعداد ریشه را مربوط به غلظت ۲ میلی‌گرم در لیتر اعلام نمودند، مطابقت دارد. از طرفی Mansseri-Lamrioui *et al*. (2011) با محیط کشت حاوی ۱ میلی‌گرم در لیتر IBA از بین غلظت‌های ۰/۵، ۱، ۲ و ۴ میلی‌گرم در لیتر، بالاترین میزان میانگین تعداد و طول ریشه را در گیلاس وحشی به‌دست آوردند که دلیل این تفاوت ممکن است نیاز هورمونی متفاوت گونه‌ها و ارقام مختلف باشد.

بر اساس نتایج ضرایب همبستگی مشاهده گردید که بین درصد ریشه‌زایی و تعداد و طول ریشه همبستگی مثبت معنی‌داری وجود دارد (جدول ۲) که مشابه نتایج Fallahpour *et al.* (2015) روی پایه Gisela5 بوده و بیانگر آن است که کیفیت ریشه‌زایی شاخساره‌ها از نظر تعداد و طول ریشه در تیمارهایی که موجب افزایش ریشه‌زایی شدند بهتر است.

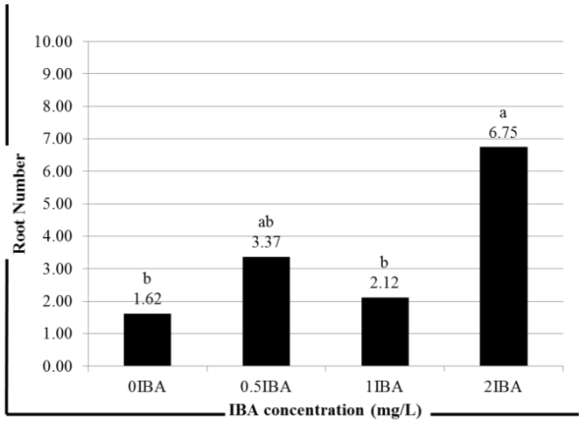
جدول ۲. ضریب همبستگی بین درصد ریشه‌زایی و تعداد و طول ریشه شاخساره‌های CAB-6P

Table 2. Correlation coefficient between rooting percentage, root number and root length of CAB-6P shoots

Trait	Root No.	Root length
Root length	0.21	
Rooting (%)	0.82**	0.49*

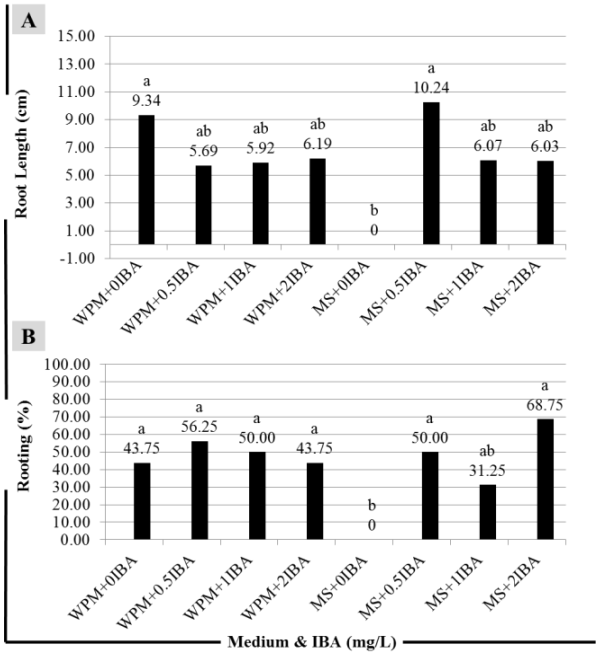
** و *: معنی‌دار در سطح احتمال ۱ و ۵ درصد.

**, *: Significant at 1 and 5 % probability level, respectively.



شکل ۲. مقایسه میانگین تأثیر IBA بر تعداد ریشه شاخساره‌های CAB-6P در شرایط درون‌شیشه‌ای

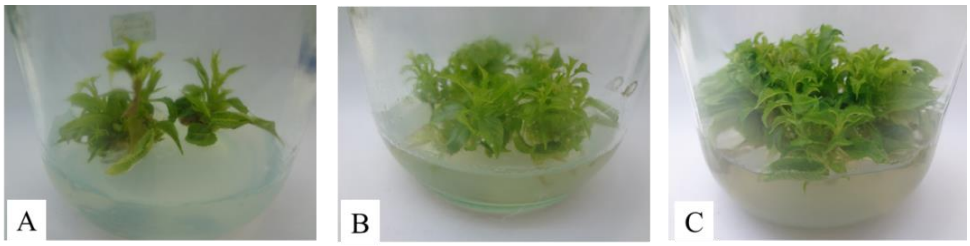
Figure 2. Mean comparison for effect of IBA on root number of CAB-6P shoots in *in vitro* conditions



شکل ۳. مقایسه میانگین تأثیر محیط کشت و IBA بر ریشه‌زایی شاخساره‌های CAB-6P در شرایط درون‌شیشه‌ای.

A) طول ریشه‌ها، B) درصد ریشه‌زایی

Figure 3. Mean comparison for effect of media & IBA on rooting of CAB-6P shoots in *in vitro* conditions.
A) root length, B) rooting percentage



شکل ۴. پرآوری شاخساره‌های CAB-6P در محیط کشت‌های مختلف حاوی ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BA.
A) MS، B) DKW و C) WPM
Figure 4. Proliferation in various growth media containing 0.5 mg/L BA. A) MS, B) DKW & C) WPM

شکل ۵. ریشه‌زایی شاخساره‌های CAB-6P در غلظت‌های مختلف IBA (میلی‌گرم در لیتر): A) ۰، B) ۰/۵، C) ۱ و D) ۲
Figure 5. Rooting of CAB-6P shoots in different concentration of IBA (mg/L): A) 0, B) 0.5, C) 1 & D) 2

سازگاری

آخرین مرحله و یکی از عوامل اصلی موفقیت در کشت بافت، تولید گیاهچه‌هایی با ریشه مناسب و سازگاری گیاهچه‌های ریشه‌دار به شرایط برون‌شیشه‌ای است. شاخساره‌های پرورش‌یافته در شرایط درون‌شیشه ای به‌علت تابش کم و تبادل محدود گاز، فعالیت‌های فتوسنتزی پایینی دارند که این امر ممکن است منجر به رشد کند و نرخ بقای کم بعد از سازگاری با شرایط محیط بیرون شود؛ به‌همین خاطر سیستم ریشه قوی اجازه می‌دهد تا گیاهان سازگاری آسان‌تر و سریع‌تری به شرایط برون‌شیشه‌ای داشته باشند (Mousavi *et al*., 2017; Miri, 2018). سازگاری گیاهچه‌ها تحت تأثیر مستقیم شرایط مرحله ریشه‌دهی بود و قرارگرفتن طولانی‌مدت گیاهچه‌ها در محیط ریشه‌زایی موجب قهوه‌ای‌شدن و طویل‌شدن بیش از حد ریشه‌ها شده و انتقال را با مشکل مواجه می‌کرد. ۸۸ درصد گیاهچه‌ها مرحله سازگاری را با موفقیت طی کرده و گیاهچه‌های سالم و شادابی را ایجاد نمودند.

نتیجه‌گیری

در مجموع نتایج این تحقیق نشان داد که می‌توان پایه رویشی CAB-6P را به‌روش درون‌شیشه‌ای با موفقیت تکثیر نمود که با توجه به لزوم احداث باغ‌های یکنواخت گیلاس، ریزازدیادی موفق این پایه می‌تواند نویدبخش باشد. طبق نتایج به‌دست آمده از تجزیه آماری، مناسب‌ترین محیط برای پرآوری این پایه محیط WPM حاوی ۰/۵ میلی گرم در لیتر IBA و در مورد ریشه‌زایی تیمار MS حاوی ۲ میلی‌گرم در لیتر IBA می‌باشد. همچنین پیشنهاد می‌شود سایر ترکیبات و تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی همچون پلی‌آمین‌ها بر تکثیر درون‌شیشه‌ای پایه CAB-6P مورد بررسی و مقایسه قرار گیرند.

REFERENCES

1. Bell, R. L., Srinivasan, C. & Lomberk, D. (2009). Effect of nutrient media on axillary shoot proliferation and preconditioning for adventitious shoot regeneration of pears. *In vitro Cellular and Developmental Biology-Plant*, 45, 708-714.
2. Buyukdemirci, H. (2008). The effects of medium ingredients on shoot propagation and rooting of cherry rootstocks *in vitro*. *Acta Horticulturae*, 795, 419-422.

3. Dimassi-Theriou, K. (1995). *In vitro* rooting of rootstock GF 677 (*Prunus amygdalus* × *P. persica*) as influenced by mineral concentration of the nutrient medium and type of culture-tube sealing material. *Journal of Horticultural Science*, 70(1), 105-108.
4. Erfani, M., Miri, S. M. & Imani, A. (2017). *In vitro* shoot proliferation and rooting of Garnem rootstock as influenced by basal media, plant growth regulators and carbon sources. *Plant Cell Biotechnology and Molecular Biology*, 18(3&4), 101-109.
5. Erwin, D. & Ribeiro, O. (1996). *Phytophthora diseases worldwide*. American Phytopathological Society Press, USA.
6. Fallahpour, M., Miri, S. M. & Bouzari, N. (2015). *In vitro* propagation of 'Gisela 5' rootstock as affected by mineral composition of media & plant growth regulators. *Journal of Horticultural Research*, 23 (1), 57-64.
7. Fotopoulos, S. & Sotiropoulos, T. E. (2005). *In vitro* propagation of the PR 204/84 (*Prunus persica* × *P. amygdalus*) rootstock: Axillary shoot production and rhizogenesis. *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science*, 33 (1), 75-79.
8. Gangi Moghadam, E., Bolandi, A. R. & Anahid, S. (2008). Micropropagation of four selected dwarf mahaleb (*Prunus mahaleb* L.) genotypes. *Pajouhesh-va-Sazandegi*, 79, 54-61. (in Farsi)
9. Glass A. D. M., Britto, D. T., Kaiser, B. N., Kinghorn, J. R., Kronzucker, H. J. & Kumar, A. (2002). The regulation of nitrate and ammonium transport systems in plants. *Journal of Experimental Botany*, 53(370), 855-864.
10. Gyeviki, M. (2005). The effect of three rootstocks on yield and fruiting of sweet cherry. *Acta Horticulturae*, 667, 562-568.
11. Hammatt, N. & Grant, N. G. (1993). Apparent rejuvenation of mature wild cherry during micropropagation. *Journal of Plant Physiology*, 141(3), 341-326.
12. Hasanloo, T., Jafarkhani Kermani, M., Malmir Chegini, M., Sepehrifar, R., Mohajeri Naraghi, S. & Miri, S. M. (2014). Optimization of *in vitro* propagation of Qare-Qat (*Vaccinium arctostaphylus*). *Journal of Medicinal Plants and By-products*. 2: 21-26.
13. Hirschi, K. D. (2004). The calcium conundrum. Both versa-tile nutrient & specific signal. *Plant Physiology*, 136(1), 2438-2442.
14. Janekova, M. (1985). *In vitro* shoot growth from the buds of selected vegetatively propagated bird cherries (*Cerasus avium*). *Zahradnictvi - UVTIZ*, 12(3), 165-168.
15. Kalinina, A. & Brown, D. C. W. (2007). Micropropagtion of ornamental *Prunus* spp. and GF305 peach, a *Prunus* viral indicator. *Plant Cell Reports*, 26(7), 927-935.
16. Karamad, Z., Gangi Moghadam, E. & Bolandi, A. R. (2014). Effects of culture media and growth regulators on micropropagation of Gisela 6 rootstock. *Journal of Crops Improvement*, 16(2), 339-351. (in Farsi)
17. Khosravinezhad, F., Abdollahi, H., Kashefi, B., Hassani, M. & Salehi, Z. (2016). Study on *in vitro* propagation of some promising quince (*Cydonia oblonga*) cultivars. *Iranian Journal of Horticultural Science*, 47(1), 135-144. (in Farsi)
18. Long, L. E. & Kaiser, C. (2010). *Sweet cherry rootstocks*. A Pacific Northwest Extension Publication. OR: Oregon State University.
19. Mahdavian, M., Bouzari, N. & Abdollahi, H. (2010). Effects of culture media and growth regulators on proliferation and rooting of a vegetative mahaleb rootstock (SL-64). *Seed and Plant Improvement Journal*, 26(1), 15-26. (in Farsi)
20. Mahdavian, M., Bouzari, N. & Abdollahi, H. (2011). Effects of media and plant growth regulators on micropropagation of a dwarfing cherry rootstock (PHL-A). *Biharean Biologist*, 5(2), 86-90.
21. Mansseri-Lamrioui, A., Louerguioui, A., Bonaly, J., Yakoub-Bougdal, S., Allili, N. & Gana-Kebbouche, S. (2011). Proliferation and rooting of wild cherry: The influence of cytokinin and auxin types and their concentration. *African Journal of Biotechnology*, 10(43), 8613-8624.
22. Mihovilović Bošnjak, A., Kereša, S., Habuš Jerčić, I. & Barić, M. (2012). The effect of cytokinin type and explant orientation on axillary shoot proliferation and *in vitro* rooting of Gisela 5 cherry rootstock. *Journal of Food Agriculture & Environment*, 10(3&4), 616-620.
23. Miri, S. M. (2018). Effect of IAA, IBA and NAA auxins on *in vitro* rooting of M.9 and M.26 apple. *Cellular and Molecular Plant Biology Journal*, 12(4), 15-23. (in Farsi)
24. Miri, S. M., Vaez Livari, B., Khalighi, A. & Ghaem Maghami, S. A. (2003a). Effect of carbohydrate, gibberellic acid, indolebutyric acid, phloroglucinol, explant orientation and culture vessel volume on optimizing *in vitro* propagation of M.9 apple rootstock. *Pajouhesh-va-Sazandegi*, 16(2), 31-37. (in Farsi)
25. Miri, S. M., Vaez Livari, B., Khalighi, A. & Ghaem Maghami, S. A. (2003b). Phenolic oxidation reduction and *in vitro* proliferation of shoots of apple clones 'M.9' and 'M.26'. *Iranian Journal of Horticultural Science and Technology*, 4(1&2), 145-154. (in Farsi)

26. Mousavi, S. S., Miri, S. M. & Moradi, P. (2017). Optimization of micropropagation of jujube (*Ziziphus jujuba* cv. Tian-yuzao). *Journal of Agronomy and Plant Breeding*, 13(4), 1-11. (in Farsi)
27. Pierik R. L. M. (1997). *In vitro culture of higher plants*. Springer Science and Business Media, Springer, Dordrecht, the Netherlands.
28. Pruski, K., Astatkie, T. & Nowak, J. (2005). Tissue culture propagation of Mongolian cherry (*Prunus fruticosa*) and Nanking cherry (*P. tomentosa*). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 82, 207-211.
29. Pruski, K., Lewis, T., Astatkie, T. & Nowak, J. (2000). Micropropagation of Chokecherry and Pincherry cultivars. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 63, 93-100.
30. Reddy, A. S. N. (2001). Calcium: Silver bullet in signaling. *Plant Science*, 160(3), 381-404.
31. Sarropoulou, V., Dimassi-Theriou, K. & Therios, L. (2013). *In vitro* rooting and biochemical parameters in the cherry rootstocks CAB-6P and Gisela 6 using L-methionine. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, 37, 688-698.
32. Sarropoulou, V., Dimassi-Theriou, K. & Therios, L. (2014a). Dikegulac-sodium effect on micropropagation and biochemical parameters in the cherry rootstocks CAB-6P and Gisela 6. *Turkish Journal of Agricultural and Natural Sciences*, 2, 1713-1726.
33. Sarropoulou, V., Dimassi-Theriou, K. & Therios, L. (2014b). *In vitro* plant regeneration from leaf explants of the cherry rootstocks CAB-6P, Gisela 6, and M×M 14 using sodium nitroprusside. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 50(2), 226-234.
34. Sarropoulou, V., Dimassi-Theriou, K. & Therios, L. (2015). Medium strength in inorganics and PVP concentration effects on cherry rootstocks *in vitro* rooting. *Horticultural Science*, 42(4), 15-192.
35. Sarropoulou, V., Dimassi-Theriou, K. & Therios, L. (2017). Effects of the exogenous polyamines on micropropagation of cherry rootstocks. *Indian Journal of Plant Physiology*, 22(2), 227-239.
36. Shi, D. (2014). *Effects of culture media and plant growth regulators on micropropagation of willow (Salix matsudana 'Golden Spiral') and hazelnut (Corylus colurna 'Te Terra Red).* M.Sc. thesis of Horticulture, University of Nebraska.
37. Sisko, M. (2011). *In vitro* propagation of Gisela 5 (*Prunus cerasus* × *P. canescens*). *Agricultura*, 8, 31-34.
38. Tatari Varnousfaderani, M., Mousavi, S. A. & Bouzari, N. (2012). Micropropagation of some clonal rootstocks of stone fruits. *Seed and Plant Improvement Journal*, 28-1(1), 53-66. (in Farsi)
39. Zarei, M., Garoosi, Gh., Nezami, E., Hosseini, R. & Ahmadi, J. (2013). The effect of medium, carbon source, light spectrum and style treatment of auxin on shoot and root regeneration of Gisela 6 root stock. *Journal of Cell and Tissue*, 4(2), 169-185. (in Farsi)
40. Zhang, Z., Dai, W. H., Cheng, Z. M. & Walla, J. A. (2000). A shoot-tip culture micropropagation system for chokecherry. *Journal of Environmental Horticulture*, 18 (2), 234-237.