DOI: http://dx.doi.org/10.22092/ijrfpbgr.2016.106163

دو فصلنامه علمی-پژوهشی تحقیقات ژنتیک و اصلاح گیاهان مرتعی و جنگلی ایران
جلد ۲۴، شماره ۱، صفحه ۱۲-۱ (۱۳۹۵)

اثرات تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی و محیط کشت بر شاخساره‌زایی و کاهش میزان شیشه‌ای شدن محلب (*Prunus mahaleb* L.) در کشت درون‌شیشه‌ای

غلامرضا گودرزی [۱*]، وحیده پیام نور [۲]، مصطفی جعفری [۳] و علیرضا علی‌عرب [۴]

۱*- نویسنده مسئول مکاتبات، دانشجوی دکتری، جنگل شناسی و اکولوژی جنگل، دانشکده علوم جنگل، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان.
پست الکترونیک: goodarzi44@yahoo.com

۲- استادیار، دانشکده علوم جنگل، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان

۳- دانشیار پژوهش، بخش تحقیقات جنگل، مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع کشور، تهران

۴- استادیار، دانشکده علوم جنگل، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان

تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۰۶/۱۱ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۴/۰۸/۰۷

چکیده

ارزیابی مرحله شاخساره‌زایی و میزان شیشه‌ای شدن شاخساره‌های گونه *Prunus mahaleb* L. با استفاده از غلظت‌های مختلفی از تنظیم‌کننده‌های رشد و محیط‌های کشت مختلف در شرایط درون‌شیشه‌ای و ریزنمونه‌های تک گره حاوی جوانه جانبی در دو آزمایش جداگانه مورد بررسی قرار گرفت. سرشاخه‌های رشد یافته از جوانه‌های گره‌ای، در ۲۶ تیمار مختلف (آزمایش اول) در محیط کشت MS با سایتوکینین‌های BAP، TDZ، KIN، 2ip، Zeatin در ترکیب با NAA و ۱۶ تیمار مختلف (آزمایش دوم) در محیط‌های کشت MS، 1/2 MS، WPM و DKW و برخی با ترکیبات متفاوتی از $CaCl_2$ و NH_4NO_3 و با سایتوکینین‌های BAP، Zeatin و PG کشت شدند. آزمایش‌ها در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۵ تکرار و هر تکرار حاوی ۵ ریزنمونه، اجرا شد. میانگین‌ها پس از ۲ واکشت در آزمایش اول نشان داد که بزرگترین طول شاخساره (۳/۱۴ سانتی‌متر) در غلظت ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر NAA بدون کاربرد سایتوکینین، بیشترین میزان شاخساره‌زایی (۱۴/۶۷ شاخساره در هر ریزنمونه) در تیمار ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر Zeatin در ترکیب با ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر NAA و کمترین میزان شیشه‌ای شدن در ۱ میلی‌گرم در لیتر KIN، ۰/۰۵ و ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر Zeatin و در ترکیب با ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر NAA به‌دست آمد. در آزمایش دوم بزرگترین طول گیاهچه (۲/۸۸ سانتی‌متر) در محیط کشت DKW با ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر Zeatin و ۴۰ میلی‌گرم در لیتر PG و بیشترین میزان شاخساره‌زایی (۱۹ شاخساره در هر ریزنمونه) در محیط کشت MS با ۸۸۰ میلی‌گرم در لیتر $CaCl_2$ و ۸۲۵ میلی‌گرم در لیتر NH_4NO_3 مشاهده شد. تحقیق حاضر با دستیابی به پروتکل بالای شاخساره‌زایی (تا ۱۹ شاخساره بر ریزنمونه) و رفع مشکل شیشه‌ای شدن گیاهچه‌های گونه *P. mahaleb*، امکان انجام سایر طرح‌های تحقیقاتی برای تجاری‌سازی این پروتکل را فراهم می‌کند.

واژه‌های کلیدی: تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی، شاخساره‌زایی، شیشه‌ای شدن، فلوروگلوسینول، کشت تک گره ساقه.

مقدمه

جنس آلبالو وحشی *Prunus* sp. درخت یا درختچه بدون خار یا به‌ندرت کمی خاردار و خزان‌کننده با بیش از ۴۰۰ گونه در دنیا می‌باشد. در ایران حدود ۱۰ گونه و ۳ زیرگونه از این جنس وجود دارد و از این تعداد یک گونه اندمیک و ۲ گونه نادر و در معرض خطر می‌باشند (Khatamsaz, 1992). محلب با نام علمی *Prunus mahaleb* L. از جنس *Prunus* و خانواده Rosaceae می‌باشد. قسمت‌های مختلف آن دارای ارزش دارویی، باغبانی، زینتی، جنگلکاری و فضای سبز، خوراکی، صادراتی، تولید محصولات فرعی (زدو) و تولید مواد خام صنعتی برای صنایع دارویی- پزشکی و رنگرزی می‌باشد. این گونه به‌عنوان پایه پیوند برای گیلاس‌های ترش و شیرین به‌کار می‌رود و سایر خصوصیات آن بردباری به خشکی، سرما و گرما، استقرار در خاک‌های ضعیف از نظر تغذیه‌ای، کنترل فرسایش و حفاظت از خاک و آب، نسبتاً مقاوم به انواع آفات و پناهگاه برای حیات وحش می‌باشد (Jazirie & Ebrahimi Rastaghi, 2003). این گونه بومی مناطق مدیترانه، اروپای جنوبی و مرکزی، شمال غربی آفریقا و جنوب غربی آسیا از جمله کشورهایی نظیر پاکستان و ایران می‌باشد (Kollmann & Pflugshaupt, 2005). در ایران این گونه در آذربایجان، کردستان، لرستان، چهار محال و بختیاری، همدان، یزد، البرز و مرکزی پراکنش دارد (Sabeti, 2008) و در استان مرکزی در منطقه سماقلو و روستای دوخواهران شازند رویش دارد. تکثیر این گونه در طبیعت و نهالستان‌ها از طریق بذر می‌باشد لیکن به دلایل (۱) برداشت بی‌رویه و نادرست بذرها توسط جنگل‌نشینان، (۲) جوانه‌زنی پایین و داشتن خواب فیزیکی و فیزیولوژیکی بذر، (۳) اثر تزایدی تغییرات اقلیمی، فشار چرای دام و تغییر کاربری اراضی رویشگاه و (۴) کاهش روزافزون حضور کمی و کیفی پایه‌های مادری این گونه در رویشگاه‌های طبیعی، میزان زادآوری طبیعی آن در رویشگاه کمتر از ۱۰ درصد است. در این راستا روش تکثیر از طریق کشت درون‌شیشه‌ای امکان رشد سریع و تولید با کیفیت بالای گیاهان را می‌دهد و ابزار مناسبی برای رسیدن به اهدافی است که در شرایط کشت در محیط طبیعی دستیابی به آنها دشوار است و برای حفاظت ژرم‌پلاسم و بهبود ژنتیکی گونه‌ها مفید می‌باشد (Nas *et al*., 2012).

مطالعات متعددی در رابطه با ریزازدیادی جنس *Prunus* انجام گرفته است. بیشترین شاخساره‌زایی (۲/۱ شاخساره) را در محیط کشت MS (Murashig & Skoog, 1962) حاوی یک میلی‌گرم در لیتر اسید جیبرلیک (GA_3) و یک میلی‌گرم در لیتر بنزیل‌آمین (BA) و بیشترین ریشه‌زایی (۴۳/۲ درصد) را در محیط کشت MS حاوی ۰/۸ میلی‌گرم در لیتر ایندول‌بوتیریک‌اسید (IBA) (Gangi Moghadam *et al*., 2008) و بیشترین شاخساره‌زایی (۸/۹ شاخساره) در محیط کشت DKW (Driver & Kuniyuki, 1984) در ترکیب با ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BA و ۱۰۰ درصد ریشه‌زایی در محیط کشت DKW بدون هورمون (Mahdaviyan *et al*., 2010) روی *P. mahaleb* نتیجه گرفته شده است. در تحقیق Zou (۲۰۱۰) بیشترین میزان شاخساره‌زایی (۳/۳۷ شاخساره) در محیط کشت Lloyd و McCown (۱۹۸۱) (WPM) با ۰/۰۵ تا ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر IBA، ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر BA در ترکیب با ۰/۳ میلی‌گرم در لیتر کینیتین (KIN) و بیشترین میزان ریشه‌زایی (۷۹/۷۶ درصد) در محیط کشت 1/2 MS با ۰/۲ تا ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر IBA در ترکیب با ۲۰ تا ۴۰ میلی‌گرم در لیتر فلوروگلوسینول (PG) در کشت جوانه *Prunus salicina* Lindl. نتیجه گرفته شد. امکان بهینه‌سازی کشت بافت در تکثیر (*Prunus avium* L.) ارقام (Arešova و Rivan) در محیط MS حاوی غلظت ۱، ۲ و ۴ میلی‌گرم در لیتر بنزیل‌آمینوپورین (BAP)، ۰/۵ و ۱ میلی‌گرم در لیتر تیدیازورون (TDZ) و دی‌متیل‌آمینوپورین (2iP) توسط Sedlák و Paprštein (۲۰۰۸) مورد آزمون قرار گرفت. به‌طوری‌که بیشترین میزان شاخساره‌زایی (۳ شاخساره) در رقم Rivan در محیط کشت MS حاوی ۲ میلی‌گرم در لیتر BAP و کمترین شاخساره‌زایی (۱/۶ شاخساره) در محیط کشت MS با ۲ میلی‌گرم 2iP در رقم Karešova را به‌دست آوردند. در محیط کشت WPM با غلظت ۱/۲ میلی‌گرم در لیتر BA، میزان شاخساره‌زایی ۴/۶ شاخساره در هر ریزنمونه یکی از ژنوتیپ‌های مورد مطالعه از *Prunus empyrean* توسط Sadeghi و همکاران (۲۰۱۵) و

در محیط کشت MS با سایتوکینین‌های BA، KIN و TDZ، میزان ۳/۴۲ شاخساره در هر ریزنمونه *Prunus armeniaca* L. در ۲ میلی‌گرم در لیتر BA و میزان طول ساقه ۵/۸ سانتی‌متر در ۱ میلی‌گرم در لیتر BA توسط Yildirim و همکاران (۲۰۱۱) به‌دست آمد.

در تمامی پژوهش‌های ذکر شده میزان شاخساره‌زایی کم بوده و همچنین محققین به مشکل شیشه‌ای شدن گیاهچه‌ها اشاره کرده‌اند. در پژوهش Zarei و همکاران (۲۰۱۳) روی ریزازدیادی *P. avium* رقم گزیلا ۶ گزارش شده است که شاخساره‌های رشد یافته در محیط کشت WPM حالت بدشکل و شیشه‌ای شده داشته و ساقه‌ها آبدار، برگ‌ها باریک و لوله‌ای و دارای رشد غیر طبیعی بودند. امروزه یکی از مشکلات پیش‌روی محققان در تولید انبوه گیاه به روش کشت درون‌شیشه‌ای، ایجاد پدیده شیشه‌ای شدن است که سبب از بین رفتن تدریجی ریزنمونه و عدم موفقیت در شاخساره‌زایی گیاه می‌شود. در این پدیده تغییرات آناتومیکی، فیزیولوژیکی و مورفولوژیکی پس از سپری شدن یک دوره زمانی معین بروز می‌کند. گیاهچه‌ها از لحاظ ویژگی‌های مورفولوژیکی دارای میانگره‌های کوتاه، حالت رشد رزت (کپه‌ای)، برگ‌های شکننده و کم رنگ و از لحاظ آناتومیکی دارای فضای بین سلولی زیاد و کارکرد غیر طبیعی روزنه‌ها می‌شوند. از لحاظ فیزیولوژیک نیز با کاهش تعداد دسته‌جات آوندی، ریزنمونه‌ها در مسیر سنتز ترکیب‌های فنلی و لیگنین نقص پیدا می‌کنند. در نتیجه کلروپلاست سلول‌ها دارای تیلاکوئیدهای غیر عادی می‌شوند. این امر نیز منجر به ایجاد ظرفیت اندک فتوسنتزی و کاهش محتوای کلروفیل برگ و در نهایت سبب مرگ گیاهچه می‌شوند (Ivanova & Van Staden, 2008).

نوع و مقدار سایتوکینین‌ها و غلظت نمک‌ها به‌ویژه نمک‌های نیترات آمونیوم (NH_4NO_3) و کلرید کلسیم ($CaCl_2$) مورد استفاده در محیط کشت از عوامل مؤثر شیشه‌ای‌شدن گیاهچه می‌باشند (Hazarika & Bora, 2010; Alizadeh, 2012). در آزمایشی، Wu و همکاران (۲۰۱۱) روی کشت جوانه *Paeonia lactifolia* Pall. با اضافه کردن ۲ گرم در لیتر زغال فعال، حذف NH_4NO_3 از محیط کشت و دو برابر کردن غلظت $CaCl_2$ و کاهش مقدار BA در محیط کشت 1/2 MS، گیاهچه‌های سالم و فاقد علائم شیشه‌ای بودن تولید کردند. اثرات موادی مانند PG که جزء ترکیبات فنلی و از مشتقات فلوریدزین می‌باشد، در افزایش پرآوری و کاهش شیشه‌ای‌شدن نمونه‌ها در شرایط درون‌شیشه‌ای توسط سایر پژوهشگران بررسی شد (Mohseniazar *et al*., 2012). با توجه به درصد پایین موفقیت در شاخساره‌زایی گونه *P. mahaleb* و شیشه‌ای‌شدن ریزنمونه‌ها، تحقیق حاضر با هدف رسیدن به پروتکل تکثیر و شاخساره‌زایی و کاهش میزان شیشه‌ای‌شدن، ریزنمونه‌های تک گره این گونه را در شرایط کشت درون‌شیشه‌ای در دو آزمایش با انواع و غلظت‌های مختلف سایتوکینین‌ها و محیط‌های کشت انجام شد.

مواد و روش‌ها

جهت انجام پژوهش حاضر در سال ۱۳۹۰ بذرهای *Prunus mahaleb* L. از منطقه شول‌آباد استان لرستان با عرض جغرافیایی ´۱۲ °۳۳ شمالی و طول جغرافیایی ´۱۲ °۴۹ شرقی و متوسط ارتفاع منطقه ۱۶۳۰ متر، متوسط بارندگی ۶۸۳ میلی‌متر و اقلیم منطقه نیمه مرطوب سرد و کوهستانی برداشت و در گلخانه پژوهشکده تحقیقات گل و گیاهان زینتی محلات کاشته شدند. پس از گذشت دو سال از شاخه‌های نهال در بهار ریزنمونه تهیه و تک گره‌های حاوی جوانه‌های جانبی به اندازه ۱ سانتی‌متری برش داده شد. ابتدا تمامی نمونه‌ها با آب و مایع ظرفشویی به‌مدت ۳۰ دقیقه ضدعفونی سطحی و سپس با محلول اتانول ۷۰ درصد به‌مدت ۳۰ ثانیه و سپس دو بار با آب دی‌یونیزه شستشو شد. آنگاه ریزنمونه‌ها در محلول سفیدکننده تجاری هیپوکلریت سدیم ۱/۵ درصد به‌مدت زمان ۱۵ دقیقه و ۵ قطره توئین ۲۰ (به‌منظور افزایش نفوذ پذیری محلول) و سه بار شستشو با آب دی‌یونیزه‌شده در زیر لامینار ایرفلو غوطه‌ور شد. انتهای قهوه‌ای قاعده جوانه‌ها قطع و زوائد جانبی شاخه حذف و سپس کشت در محیط MS بدون هورمون انجام شد. کشت‌ها ابتدا به‌مدت یک هفته در تاریکی و سپس در روشنایی قرار گرفتند و در شرایط خاص اتاق رشد

با دوره نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی، رطوبت نسبی ۵۰ درصد و در زیر لامپ‌های فلورسنت سفید به شدت سه هزار لوکس و دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. یک ماه بعد از استقرار، نمونه‌هایی که رشد کافی در محیط استقرار داشتند (حدود ۱/۵ سانتی‌متر) به مرحله شاخساره‌زایی با محیط کشت MS و غلظت‌های مختلفی از هورمون‌های سایتوکینین (BAP، TDZ، KIN، 2iP و Zeatin) و نفتالین‌استیک‌اسید (NAA) منتقل و تحت عنوان آزمایش اول با ۲۶ تیمار بررسی شدند (جدول ۱). محیط‌های کشت MS، 1/2 MS، WPM و DKW با بهترین نوع و غلظت سیتوکینین انتخاب شده از آزمایش اول و با ۴۰ میلی‌گرم در لیتر PG در ترکیب با ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر NAA تحت عنوان آزمایش دوم با ۱۶ تیمار در نظر گرفته شدند (جدول ۲). جهت ریشه‌زایی، واکشت شاخساره‌های با طول ۲–۱/۵ سانتی‌متری، در محیط کشت MS بدون هورمون برای یک ماه انجام شد. صفات درصد شیشه‌ای شدن، ارتفاع گیاهچه و تعداد شاخساره‌ها هر چهار هفته یکبار و در مجموع برای ۳ ماه اندازه‌گیری شد. آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی و تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها با استفاده از نرم افزار SPSS (19) صورت گرفت. برای تعیین اختلاف آماری داده‌ها از تجزیه واریانس یکطرفه و مقایسه میانگین‌ها از آزمون دانکن استفاده شد. هر آزمایش با ۵ تکرار و هر تکرار حاوی ۵ ریزنمونه و در کل ۲۱۰ شیشه و ۱۰۵۰ ریزنمونه برای کل تیمارها، در هر دو آزمایش انجام گرفت.

شاخساره‌ها ۳–۲ هفته پس از تشکیل ریشه، شستشوی کامل و پاک کردن اطراف آنها از آگار و کشت در گلدان‌هایی با ابعاد ۶ × ۶ سانتی‌متری حاوی مخلوطی از ۶۰ درصد پیت‌ماس و ۴۰ درصد پرلیت سترون به اتاق رشد با رطوبت نسبی ۶۵ درصد جهت سازگاری انتقال داده شدند. سپس سازگاری تدریجی آنها با شرایط محیط (افزایش منافذ و کاهش رطوبت زیر سرپوش تا برداشت کامل) انجام شد.

جدول ۱– نوع و غلظت هورمون‌های به‌کار برده شده بر حسب میلی‌گرم در لیتر در آزمایش اول شاخساره‌زایی گونه *P. mahaleb*

تیمارها	نوع سایتوکینین	غلظت سایتوکینین (میلی‌گرم در لیتر)	غلظت NAA (میلی‌گرم در لیتر)	تیمارها	نوع سایتوکینین	غلظت سایتوکینین (میلی‌گرم در لیتر)	غلظت NAA (میلی‌گرم در لیتر)
۱	–	–	۰	۱۳	TDZ	۰/۰۵	۰/۱
۲		–	۰/۰۵	۱۴		۰/۱	۰/۱
۳		–	۰/۱	۱۵		۰/۲	۰/۱
۴		–	۰/۲	۱۶		۰/۳	۰/۱
۵	BAP	۰/۵	۰/۰۵	۱۷	KIN	۱	۰/۱
۶		۰/۵	۰/۱	۱۸		۱/۵	۰/۱
۷		۰/۸	۰/۰۵	۱۹		۲	۰/۱
۸		۰/۸	۰/۱	۲۰	2iP	۱	۰/۱
۹		۱	۰/۰۵	۲۱		۱/۵	۰/۱
۱۰		۱	۰/۱	۲۲		۲	۰/۱
۱۱		۱/۵	۰/۰۵	۲۳	Zeatin	۰/۰۵	۰/۱
۱۲		۱/۵	۰/۱	۲۴		۰/۱	۰/۱
				۲۵		۰/۲	۰/۱
				۲۶		۰/۳	۰/۱

–: عدم کاربرد سایتوکینین

جدول ۲- انواع تیمارهای محیط‌های کشت با غلظت‌ها و انواع مختلف سایتوکینین در ترکیب با ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر NAA در آزمایش دوم شاخساره‌زایی گونه *P. mahaleb*

کد تیمار	محیط کشت	نوع و غلظت سایتوکینین
۱	MS	۰/۸ میلی‌گرم در لیتر BAP
۲	MS	۰/۲ میلی‌گرم در لیتر Zeatin
۳	MS با ۸۸۰ میلی‌گرم در لیتر $CaCl_2$	۰/۸ میلی‌گرم در لیتر BAP
۴	MS با ۸۸۰ میلی‌گرم در لیتر $CaCl_2$	۰/۲ میلی‌گرم در لیتر Zeatin
۵	MS با ۸۸۰ میلی‌گرم در لیتر $CaCl_2$ و ۸۲۵ میلی‌گرم در لیتر NH_4NO_3	۰/۸ میلی‌گرم در لیتر BAP
۶	MS با ۸۸۰ میلی‌گرم در لیتر $CaCl_2$ و ۸۲۵ میلی‌گرم در لیتر NH_4NO_3	۰/۲ میلی‌گرم در لیتر Zeatin
۷	MS با ۸۸۰ میلی‌گرم در لیتر $CaCl_2$ و ۸۲۵ میلی‌گرم در لیتر NH_4NO_3	۰/۸ میلی‌گرم در لیتر BAP در ترکیب با ۴۰ میلی‌گرم در لیتر PG
۸	MS با ۸۸۰ میلی‌گرم در لیتر $CaCl_2$ و ۸۲۵ میلی‌گرم در لیتر NH_4NO_3	۰/۲ میلی‌گرم در لیتر Zeatin در ترکیب با ۴۰ میلی‌گرم در لیتر PG
۹	۱/۲ MS با ۴۴۰ میلی‌گرم در لیتر $CaCl_2$	۰/۸ میلی‌گرم در لیتر BAP
۱۰	۱/۲ MS با ۴۴۰ میلی‌گرم در لیتر $CaCl_2$	۰/۲ میلی‌گرم در لیتر Zeatin
۱۱	۱/۲ MS با ۴۴۰ میلی‌گرم در لیتر $CaCl_2$	۰/۸ میلی‌گرم در لیتر BAP در ترکیب با ۴۰ میلی‌گرم در لیتر PG
۱۲	۱/۲ MS با ۴۴۰ میلی‌گرم در لیتر $CaCl_2$	۰/۲ میلی‌گرم در لیتر Zeatin در ترکیب با ۴۰ میلی‌گرم در لیتر PG
۱۳	WPM	۰/۸ میلی‌گرم در لیتر BAP
۱۴	DKW	۰/۲ میلی‌گرم در لیتر Zeatin
۱۵	WPM	۰/۸ میلی‌گرم در لیتر BAP در ترکیب با ۴۰ میلی‌گرم در لیتر PG
۱۶	DKW	۰/۲ میلی‌گرم در لیتر Zeatin در ترکیب با ۴۰ میلی‌گرم در لیتر PG

نتایج

تأثیر غلظت و نوع تنظیم‌کننده‌های رشد بر شاخساره‌زایی گونه *P. mahaleb* (آزمایش اول)

تمامی مشخصه‌های اندازه‌گیری شده تحت تأثیر تیمارهای نوع و غلظت هورمونی قرار گرفته و اختلاف معنی‌دار آماری را در تجزیه واریانس نشان دادند (جدول ۳). بزرگترین طول شاخساره در تیمار ۳ (۰/۱ میلی‌گرم در لیتر NAA) و تیمار ۱۳ (۰/۰۵ میلی‌گرم در لیتر TDZ در ترکیب با ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر NAA) به‌ترتیب با ۳/۱۴ و ۳/۱۳ سانتی‌متر مشاهده شد. بیشترین میزان شاخساره‌زایی در تیمار ۲۵ (۰/۲ میلی‌گرم در لیتر Zeatin در ترکیب با ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر NAA) و تیمار ۸ (۰/۸ میلی‌گرم در لیتر BAP در ترکیب با ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر NAA) به‌ترتیب با ۱۴/۶۷ و۱۲/۶۷ شاخساره نتیجه گرفته شد. شاخساره‌زایی در تیمارهای بدون سایتوکینین صورت نگرفت. در تیمارهای ۱، ۲، ۳ و ۴ (بدون سایتوکینین) و تیمار ۱۶ (۰/۳ میلی‌گرم در لیتر TDZ در ترکیب با ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر NAA)، شیشه‌ای شدن گیاهچه‌ها به میزان ۱۰۰ درصد بود (جدول ۳).

جدول ۳- نتایج تجزیه واریانس یک‌طرفه و مقایسه میانگین مشخصه‌های اندازه‌گیری شده در گونه *P. mahaleb* تحت تیمارهای نوع و غلظت هورمون در محیط کشت MS در آزمایش اول

تیمارها	نوع سایتوکینین	غلظت سایتوکینین (میلی‌گرم در لیتر)	غلظت NAA (میلی‌گرم در لیتر)	ارتفاع گیاهچه (سانتی‌متر)	شاخساره‌زایی (تعداد)	شیشه‌ای شدن گیاهچه (درصد)
میانگین مربعات				۰/۱۴۳	۳۸/۳۷۱	۲۹۷۲/۱۱۵
F				۴/۴۶۹**	۱۸/۷۰۶**	۱۶/۱۲۷**
۱	–	–	۰	۲/۶۱(۰/۰۵)cd	۰/۰۰(۰/۰۰)h	۱۰۰(۰/۰۰)a
۲		–	۰/۰۵	۲/۴(۰/۰۱)cd	۰/۰۰(۰/۰۰)h	۱۰۰(۰/۰۰)a
۳		–	۰/۱	۳/۱۴(۰/۳۴)a	۰/۰۰(۰/۰۰)h	۱۰۰(۰/۰۰)a
۴		–	۰/۲	۲/۳۵(۰/۰۷)d	۰/۰۰(۰/۰۰)h	۱۰۰(۰/۰۰)a
۵	BAP	۰/۵	۰/۰۵	۳(۰/۱۷)ab	۴(۰/۰۷)d-g	۷۵(۰/۰۰)a-c
۶		۰/۵	۰/۱	۲/۵۴(۰/۰۹)cd	۶/۳۳(۰/۳۳)b-c	۵۰(۰/۰۰)c-f
۷		۰/۸	۰/۰۵	۲/۶۳(۰/۰۳)cd	۸/۳۳(۰/۸۸)bc	۵۸/۳۳(۸/۳۳)b-e
۸		۰/۸	۰/۱	۲/۳۵(۰/۰۳)d	۱۲/۶۷(۱/۴۵)a	۵۰(۰/۰۰)c-f
۹		۱	۰/۰۵	۲/۶۷(۰/۰۱)cd	۶/۳۳(۰/۴۵)b-c	۶۶/۶۷(۸/۳۳)b-d
۱۰		۱	۰/۱	۲/۳۵(۰/۰۷)d	۸/۶۷(۰/۵۶)b	۵۸/۳۳(۸/۳۳)b-e
۱۱	TDZ	۱/۵	۰/۰۵	۲/۵(۰/۱۱)cd	۵(۰/۳۳)d-g	۹۱/۶۷(۸/۳۳)a
۱۲		۱/۵	۰/۱	۲/۵(۰/۱۳)cd	۶(۰/۵۷)b-e	۹۱/۶۷(۸/۳۳)a
۱۳		۰/۰۵	۰/۱	۳/۱۳(۰/۱۷)a	۶(۰/۵۷)b-e	۳۳/۳۳(۸/۳۳)e-h
۱۴		۰/۱	۰/۱	۲/۳۵(۰/۱۸)d	۸/۳۳(۰/۸۸)bc	۵۸/۳۳(۸/۳۳)b-e
۱۵		۰/۲	۰/۱	۲/۷(۰/۰۴)b-d	۶/۶۷(۰/۴۱)b-d	۸۳/۳۳(۱۶/۶۷)ab
۱۶		۰/۳	۰/۱	۲/۶۳(۰/۰۶)cd	۳/۳۳(۰/۰۸)e-g	۱۰۰(۰/۰۰)a
۱۷	KIN	۱	۰/۱	۲/۷۳(۰/۰۵)bc	۴(۰/۱۵)d-g	۱۶/۶۷(۲/۶)gh
۱۸		۱/۵	۰/۱	۲/۶(۰/۰۲)cd	۵(۰/۳۸)d-g	۳۳/۳۳(۴/۲)e-h
۱۹		۲	۰/۱	۲/۴۱(۰/۰۶)cd	۴(۰/۳۱)d-g	۵۸/۳۳(۸/۳۳)b-e
۲۰		۱	۰/۱	۲/۶۲(۰/۰۷)cd	۴/۳۳(۰/۴۲)d-g	۸/۳۳(۱/۳)h
۲۱	2iP	۱/۵	۰/۱	۲/۵(۰/۰۲)cd	۳(۰/۲۴)fg	۳۳/۳۳(۴/۲)e-h
۲۲		۲	۰/۱	۲/۴۵(۰/۰۳)cd	۲/۶۷(۰/۱۶)g	۴۱/۶۷(۸/۳۳)d-g
۲۳	Zeatin	۰/۰۵	۰/۱	۲/۶۴(۰/۰۴)cd	۵/۶۷(۰/۴۹)c-f	۸/۳۳(۱/۳)h
۲۴		۰/۱	۰/۱	۲/۵۵(۰/۰۴)cd	۶/۳۳(۰/۵۲)b-d	۸/۳۳(۱/۳)h
۲۵		۰/۲	۰/۱	۲/۴۲(۰/۰۲)cd	۱۴/۶۷(۰/۸۸)a	۲۵(۴/۴۳)f-h
۲۶		۰/۳	۰/۱	۲/۵۳(۰/۰۴)cd	۸(۰/۵۷)bc	۴۱/۶۷(۸/۳۳)d-g

** معنی‌دار در سطح احتمال ۰/۰۱، مقادیر مربوط به میانگین مربعات و F فاقد مقیاس هستند و مقیاسهای ارائه شده مربوط به میانگین‌هاست.

اعداد داخل پرانتز اشتباه معیار هستند. حروف مختلف در ستون مبین معنی‌دار بودن میانگین‌ها در سطح احتمال ۰/۰۵ درصد است.

جدول ۴- نتایج تجزیه واریانس یک‌طرفه و مقایسه میانگین مشخصه‌های اندازه‌گیری شده در گونه *P. mahaleb* تحت تیمار ترکیبی از محیط کشت، نوع و غلظت سایتوکینین در ترکیب با ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر NAA در آزمایش دوم

تیمارها	محیط کشت	نوع سایتوکینین	غلظت سایتوکینین (میلی‌گرم در لیتر)	ارتفاع گیاهچه (سانتی‌متر)	شاخساره‌زایی (تعداد)	شیشه‌ای شدن گیاهچه (درصد)
میانگین مربعات				۰/۰۷۶	۴۸/۲۹۹	۱۷۳۵/۲۴۳
F				۱۴/۵۲۲**	۱۶/۵۶**	۱۳/۳۲۷**
۱	MS	BAP	۰/۸	۲/۳۵(۰/۰۳)c	۱۲/۶۷(۱/۴۵)d-f	۵۰(۰/۰۰)b
۲	MS	Zeatin	۰/۲	۲/۴۲(۰/۰۲)c	۱۴/۶۷(۰/۸۸)b-d	۲۵(۴/۴۳)c-e
۳	MS با ۸۸۰ میلی‌گرم در لیتر $CaCl_2$	BAP	۰/۸	۲/۴۱(۰/۰۲)c	۱۴(۰/۵۸)c-e	d-۱۶/۶۷(۲/۳۳)f
۴	MS با ۸۸۰ میلی‌گرم در لیتر $CaCl_2$	Zeatin	۰/۲	۲/۴۵(۰/۰۱)c	۱۶(۰/۵۸)a-c	۸/۳۳(۰/۵۶)ef
۵	MS با ۸۸۰ میلی‌گرم در لیتر $CaCl_2$ و ۸۲۵ میلی‌گرم در لیتر NH_4NO_3	BAP	۰/۸	۲/۴۴(۰/۰۱)c	۱۴/۶۷(۰/۳۳)b-d	۸/۳۳(۰/۵۶)ef
۶	MS با ۸۸۰ میلی‌گرم در لیتر $CaCl_2$ و ۸۲۵ میلی‌گرم در لیتر NH_4NO_3	Zeatin	۰/۲	۲/۴۷(۰/۰۱)c	۱۷(۰/۵۸)a-c	۰/۰۰(۰/۰۰)f
۷	MS با ۸۸۰ میلی‌گرم در لیتر $CaCl_2$ و ۸۲۵ میلی‌گرم در لیتر NH_4NO_3	BAP و PG	۰/۸ و ۴۰	۲/۴۶(۰/۰۱)c	۱۷/۶۷(۰/۳۳)ab	۰/۰۰(۰/۰۰)f
۸	MS با ۸۸۰ میلی‌گرم در لیتر $CaCl_2$ و ۸۲۵ میلی‌گرم در لیتر NH_4NO_3	Zeatin و PG	۰/۲ و ۴۰	۲/۴۹(۰/۰۱)c	۱۹(۰/۵۸)a	۰/۰۰(۰/۰۰)f
۹	MS ۱/۲ با ۴۴۰ میلی‌گرم در لیتر $CaCl_2$	BAP	۰/۸	۲/۴(۰/۰۱)c	۹(۰/۶۵)g-i	۰/۰۰(۰/۰۰)f
۱۰	MS ۱/۲ با ۴۴۰ میلی‌گرم در لیتر $CaCl_2$	Zeatin	۰/۲	۲/۴(۰/۰۱)c	۱۱/۳۳(۰/۸۸)e-h	۰/۰۰(۰/۰۰)f
۱۱	MS ۱/۲ با ۴۴۰ میلی‌گرم در لیتر $CaCl_2$	BAP و PG	۰/۸ و ۴۰	۲/۴۴(۰/۰۱)c	۸/۶۷(۱/۲)hi	۰/۰۰(۰/۰۰)f
۱۲	MS ۱/۲ با ۴۴۰ میلی‌گرم در لیتر $CaCl_2$	Zeatin و PG	۰/۲ و ۴۰	۲/۴۷(۰/۰۱)c	۱۰/۶۷(۰/۸۸)f-h	۰/۰۰(۰/۰۰)f
۱۳	WPM	BAP	۰/۸	۲/۶۸(۰/۱۴)b	۵(۰/۵۸)j	۸۳/۳۳(۸/۳۳)a
۱۴	DKW	Zeatin	۰/۲	۲/۷۴(۰/۰۴)b	۱۰(۰/۵۸)f-h	۴۱/۶۷(۸/۳۳)bc
۱۵	WPM	BAP و PG	۰/۸ و ۴۰	۲/۷۹(۰/۰۶)ab	۶/۶۷(۰/۳۳)ij	۳۳/۳۳(۶/۳۳)b-d
۱۶	DKW	Zeatin و PG	۰/۲ و ۴۰	۲/۸۸(۰/۰۲)a	۱۲(۰/۵۸)d-g	۸/۳۳(۱/۳۳)ef

** معنی‌دار در سطح احتمال ۰/۰۱، مقادیر مربوط به میانگین مربعات و F فاقد مقیاس هستند و مقیاسهای ارائه شده مربوط به میانگین‌هاست.

اعداد داخل پرانتز اشتباه معیار هستند. حروف مختلف در ستون مبین معنی‌دار بودن میانگین‌ها در سطح احتمال ۰/۰۵ درصد است.

تأثیر تیمار ترکیبی از محیط کشت، نوع و غلظت سایتوکینین بر افزایش شاخساره‌زایی و میزان پدیده شیشه‌ای شدن در گونه *P. mahaleb* (آزمایش ۲)

تمامی مشخصه‌های اندازه‌گیری شده تحت تأثیر تیمارهای محیط کشت، نوع و غلظت سایتوکینین قرار گرفتند و اختلاف معنی‌دار آماری را در تجزیه واریانس نشان دادند (جدول ۴). بزرگترین طول شاخساره با ۲/۸۸ سانتی‌متر در تیمار ۱۶ (محیط کشت DKW با ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر Zeatin در ترکیب با ۴۰ میلی‌گرم در لیتر PG) مشاهده شد. بیشترین میزان شاخساره‌زایی با ۱۹ شاخساره در تیمار ۸ (محیط کشت MS با ۸۸۰ میلی‌گرم در لیتر $CaCl_2$ و ۸۲۵ میلی‌گرم در لیتر NH_4NO_3 و ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر Zeatin در ترکیب با ۴۰ میلی‌گرم در لیتر PG) به‌دست آمد. کمترین میزان شیشه‌ای شدن شاخساره‌ها در تیمارهای ۶ تا ۱۲ مشاهده شد (جدول ۴ و شکل ۱).

پس از یک ماه ریشه‌زایی در محیط کشت MS فاقد تنظیم‌کننده‌های رشد به میزان صد در صد انجام شد (شکل ۲). میزان موفقیت سازگاری گیاهچه‌ها بعد از گذشت ۸ ماه، بیش از ۶۰ درصد ثبت شد.

شکل ۱- شاخساره‌زایی گونه *P. mahaleb* در محیط MS با ۸۸۰ میلی‌گرم در لیتر $CaCl_2$ و ۸۲۵ میلی‌گرم در لیتر NH_4NO_3 و ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر Zeatin در ترکیب با ۴۰ میلی‌گرم در لیتر PG

شکل ۲- ریشه‌زایی گونه *P. mahaleb* در محیط کشت MS فاقد تنظیم‌کننده‌های رشد

بحث

تأثیر غلظت و نوع تنظیم‌کننده‌های رشد بر شاخساره‌زایی گونه *P. mahaleb* (آزمایش اول)

مرحله شاخساره‌زایی در پژوهش حاضر تحت تأثیر غلظت و نوع تنظیم‌کننده‌های رشد بود. در پژوهش حاضر پس از ۲ بازکشت، تیمارهای ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر Zeatin و ۰/۸ میلی‌گرم در لیتر BAP به ترتیب سبب شاخساره‌زایی به تعداد ۱۴/۶۷ و ۱۲/۶۷ شاخساره در گونه *P. mahaleb* گردید. تشکیل شاخساره نشان‌دهنده تشکیل پریموردیوم‌های جدید شاخه تحت تأثیر نوع و غلظت هورمون‌های محیط کشت است. هورمون Zeatin جزو سایتوکینین‌های طبیعی است که سبب افزایش شاخساره‌زایی می‌شود. این میزان شاخساره‌زایی بالای Zeatin در تحقیق حاضر با نتایج Kadota و Nimi (۲۰۰۳) روی *Prunus armenica* L.، Ansar و همکاران (۲۰۰۹) روی زیتون رقم Moraiolo و Nezami و همکاران (۲۰۱۰) روی پایه رویشی GF677 (*Prunus amygdalus* × *Prunus persica*) مطابقت دارد. همچنین بیشترین میزان شاخساره‌زایی در محیط کشت MS و در حضور BAP می‌تواند به نقش و اثر BAP در شکستن غالبیت انتهایی، تحریک رشد

شاخساره‌های جدید و ایجاد سطح متعادل هورمونی مربوط باشد. سایتوکینین BAP به‌دلیل ایجاد ترکیبات فلاوونوئیدی در محیط کشت، فعالیت آنزیم‌های پرکسیداز را که موجب تجزیه ترکیبات فلاوونوئیدی می‌شود، تشدید می‌کند (Curir *et al.*, 1990). از طرفی دیگر با افزایش تولید سایتوکینین داخلی، میزان شاخساره‌زایی افزایش می‌یابد (Bennett *et al.*, 1994). همچنین در پژوهش حاضر در محیط‌های فاقد سایتوکینین شاخساره‌زایی صورت نگرفت که با نتایج Ahmadloo و همکاران (۲۰۱۴) مطابقت دارد. بزرگترین طول شاخساره در همین محیط حاصل شد. تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی سبب تنش در محیط شده و از طرفی به‌دلیل تولید شاخساره و رقابت بین شاخساره‌ها، کاهش طول شاخساره در محیط‌های حاوی سایتوکینین مشاهده گردید.

در پژوهش حاضر از هورمون‌های TDZ، KIN و 2iP نیز با غلظت‌های متفاوت استفاده گردید ولی شاخساره‌زایی در آنها همانند Zeatin و BAP مطلوب نبود. در همین راستا، Pati و همکاران (۲۰۰۶) در ارقام مختلف *Rosa* spp. گزارش کردند که BAP در سطح ۱/۲ میلی‌گرم در لیتر تنظیم‌کننده رشد مؤثرتری در تحریک شاخساره‌زایی می‌باشد و اثر بیشتری نسبت به هورمون‌های 2iP، TDZ، KIN و متاتوپولین (Meta-topolin) دارد. همچنین Ruzic و همکاران (۲۰۰۸) در بررسی اثر چهار نوع سایتوکینین BAP، KIN، 2iP و TDZ در ریزازدیادی گیلاس وحشی (*P. avium*)، رقم Lapins و Yildirim و همکاران (۲۰۱۱) روی *P. armeniaca*، تنظیم‌کننده رشد BAP بهترین نوع سایتوکینین برای فاز تکثیر و شاخساره‌زایی بود. تأثیر سایتوکینین‌های KIN و 2iP در تولید شاخساره‌های قوی و برگ‌های توسعه یافته، با شاخساره‌زایی کم ولی طول شاخساره متوسط همراه بود. در محیط کشت بدون هورمون و بدون سایتوکینین افزایش در طول شاخساره مشاهده شد. پاسخ گونه‌های گیاهی بسته به نوع محیط کشت و تنظیم‌کننده‌های رشد به‌کار رفته در آن متفاوت است بنابراین با بررسی انواع و غلظت‌های مختلف تنظیم‌کننده‌های رشد در آزمایش اول، بهترین نوع و غلظت تنظیم‌کننده رشد سبب بیشترین میزان شاخساره‌زایی شد.

تأثیر تیمار ترکیبی از محیط کشت، نوع و غلظت سایتوکینین بر افزایش شاخساره‌زایی و میزان پدیده شیشه‌ای شدن در گونه *P. mahaleb* (آزمایش ۲)

در تحقیق حاضر، پس از چهار هفته، پدیده شیشه‌ای شدن در محیط کشت MS در مرحله استقرار ظاهر شد و همین امر سبب شد گیاهانی که وارد مرحله شاخساره‌زایی شدند دارای برگ‌های لوله‌ای و پرآب، کم رنگ و شفاف و دارای ساقه کوتاه باشند. از آن جایی که پدیده شیشه‌ای شدن یک عارضه نامطلوب در کشت بافت محسوب می‌شود، بنابراین کاربرد تیماری که بتواند سبب افزایش شاخساره‌زایی و کاهش میزان پدیده شیشه‌ای شدن در حد قابل قبول شود، حایز اهمیت می‌باشد. در آزمایشی، Murai و همکاران (۱۹۹۷) علت مناسب نبودن محیط کشت MS برای تکثیر *P. armenica* را زیاد بودن سطوح نیتروژن (نیترات و آمونیوم) آن دانستند.

محیط MS دارای غلظت یونی بالا از آمونیوم (۲۰/۶ میلی‌مولار) و نیترات (۳۹/۴ میلی‌مولار) است در صورتی‌که WPM و DKW دارای غلظت یونی آمونیوم کمتری می‌باشند (۵ میلی‌مولار در WPM و ۱۷/۷ میلی‌مولار در DKW). علاوه بر این منبع نیترات در بین محیط‌های کشت مختلف است همچون که نیترات پتاسیم (KNO_3) در MS و WPM و نیترات کلسیم ($CaNO_3$) در DKW می‌باشد (Fisichella *et al.*, 2000). در پژوهش حاضر، بیشترین میزان شاخساره‌زایی بدون علائمی از شیشه‌ای شدن در محیط کشت MS با ۸۸۰ میلی‌گرم در لیتر $CaC1_2$ و ۸۲۵ میلی‌گرم در لیتر NH_4NO_3 و با ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر تنظیم‌کننده رشد Zeatin و ۴۰ میلی‌گرم در لیتر PG، نتیجه گرفته شد. در پژوهشی، Ahmadloo و همکاران (۲۰۱۴) روی *Crataegus pseudoheterophylla* Pojark. محیط کشت MS را مناسب‌تر برای شاخساره‌زایی نسبت به WPM گزارش کردند. در حالی که در نتایج

Mahdaviyan و همکاران (۲۰۱۰) روی *P. mahaleb* محیط کشت DKW بهترین محیط استقرار بود به‌طوری‌که با مقایسه غلظت‌های یونی گزارش کردند که یون‌های کلسیم، منگنز، منیزیم، روی، بر، مس، نیکل، آهن، سولفات و فسفات در محیط DKW نسبت به MS بیشتر بود که این موضوع می‌تواند به نقش حیاتی این یون‌ها در متابولیسم و رشد گیاه مربوط باشد اگرچه در پژوهش محققین مشکل شیشه‌ای شدن گیاهچه‌ها وجود داشت.

در آزمایشی، Wu و همکاران (۲۰۱۱) نیز با افزایش دو برابری $CaCl_2$ و کاهش میزان NH_4NO_3 و تنظیم‌کننده رشد BAP توانستند مشکل شیشه‌ای شدن گیاهچه‌های *Paeonia lactiflora* Zhong Sheng Fen را رفع نمایند که همسو با نتایج تحقیق حاضر است. کلرید کلسیم به‌دلیل بالا بردن سطح برگ و تشکیل بهتر رنگیزه‌های کلروفیل در سلول‌های گیاهی بر افزایش جذب تشعشع فعال فتوسنتزی و سرعت رشد محصول تأثیر می‌گذارد. از آنجایی که $CaCl_2$ در محیط کشت به‌عنوان پیک ثانویه عمل می‌کند و با تأثیرگذاری بر پایداری غشاء و فعالیت آنزیم‌ها موجب حفاظت سلول‌ها در شرایط تنش می‌شود، رفع مشکل شیشه‌ای شدن گیاهچه‌ها قابل توجیه است. کاهش غلظت نمک NH_4NO_3، به‌علت کاهش فشار اسمزی محیط کشت، امکان جذب آب و مواد غذایی بیشتری برای ریزنمونه را فراهم و بدین ترتیب با حفظ حالت شادابی ریزنمونه و برگ به سبزینگی و کاهش شیشه‌ای شدن آنها کمک می‌کند (Banno *et al*., 1989).

اشاره شده است که افزودن PG سبب کاهش میزان آب بافت و برطرف شدن حالت شیشه‌ای گیاهچه‌ها می‌شود (Mohseniazar *et al*., 2012). در پژوهش حاضر محیط حاوی ۴۰ میلی‌گرم PG باعث کاهش شیشه‌ای شدن شاخساره‌ها در ریزنمونه‌های مورد آزمایش شد. فلوروگلوسینول یک ماده مؤثر برای کاهش تنش اکسیداتیو و اثرات ناشی از آن و تخریب سلول‌ها است که از این طریق فعالیت آنزیم کاتالاز و بیان پروتئینی آن را افزایش می‌دهد و موجب کاهش شیشه‌ای شدن گیاهچه‌ها در محیط کشت می‌شود. از طرفی دیگر PG در تکثیر شاخساره‌ها و افزایش ریشه‌زایی آنها نیز مؤثر است (Ahmadloo *et al*., 2014) که می‌تواند دلیلی بر ریشه‌زایی تمامی شاخساره‌های تکثیر شده در محیط کشت MS بدون هورمون در پژوهش حاضر پس از یک ماه باشد.

تحقیق حاضر با دستیابی به پروتکل بالای شاخساره‌زایی (تا ۱۹ شاخساره بر ریزنمونه) و رفع مشکل شیشه‌ای شدن گیاهچه‌های گونه *P. mahaleb* در تیمار محیط کشت MS با ۸۸۰ میلی‌گرم در لیتر $CaCl_2$ و ۸۲۵ میلی‌گرم در لیتر NH_4NO_3 و با ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر تنظیم‌کننده رشد Zeatin و ۴۰ میلی‌گرم در لیتر PG، امکان انجام سایر طرح‌های تحقیقاتی برای تجاری‌سازی این پروتکل را فراهم می‌کند. اگرچه در تحقیق حاضر، در محیط کشت WPM و DKW با حضور سایتوکینین و PG همچنان مشکل شیشه‌ای شدن گیاهچه‌ها مشاهده شد که باید روی ترکیبات نیترات این دو محیط در آینده، پژوهشی در دستور کار سایر محققین قرار گیرد.

منابع مورد استفاده

- Ahmadloo, F., Tabari Koochaksaraei, M., Azadi, P., Hamidi, A. and Beiramizadeh, E., 2014. Micropropagation of *Crataegus pseudoheterophylla* Pojark. via *in vitro* culture. Journal of Wood and Forest Science and Technology, 21: 1-23. (In persian)
- Alizadeh, M., 2012. A User Manual Plant Tissue Culture and Micropropagation. Norouzi Publication, Gorgan, 322 pp. (In persian)
- Ansar, A., Touqeer, A., Nadeem, A.A. and Eshfaq, A.H., 2009. Effect of different media and growth regulatorson *in vitro* shoot proliferation of olive cultuvar 'Moraiolo'. Pakistanian Journal of Bottany, 41: 783-795.
- Banno, K., Yoshida, K., Hayashi, S. and Tanabe, K., 1989. *In vitro* propagation of japanese pear cultivars. Journal of the Japanese Society for Horticultural Science, 58: 37-42.
- Bennett, I.J., McComb, J.A., Tonkin, C.M. and Mcdavid, D.A.J., 1994. Alternating cytokinins in multiplication media stimulates *in vitro* shoot growth and rooting of *Globulus Labill*. Annals of Botany, 74: 8-53.
- Curir, P., Sumerect, V. and Termini, A., 1990. Flavonoid accumulation is correlated with adventitious root formation in *Eucalyptus gunnii* Hook micropropagated through axillary bud stimulation. Plant Physiology, 92: 1148-1153.

cv. 'BakuohJunkyou'. Journal of the Japanese Society for Horticultural Science, 66: 475-480.
- Murashig, T. and Skoog, F., 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. Physiology Plant, 15: 473-497.
- Nas, M.N., Gokbunar, L., Sevgin, N., Aydemir, M., Dagli, M. and Susluoglu, Z., 2012. Micropropagation of mature *Crataegus aronia* L., a medicinal and ornamental plant with rootstock potential for pome fruit. Journal of Plant Growth Regulation, 67: 57-63.
- Nezami, A.E., Garoosi, G.A., Haddad, R. and Babaei, M., 2010. Study the effects of pectin, medium type and plant growth regulators (PGRs) on micropropagation of GF677 under *in vitro* conditions. Quarterly Journal of Agricultural Biotechnology, 2: 113-126. (In persian)
- Pati, P.K., Rath, S.P., Sharma, M., Sood, A. and Ahuja, P.S., 2006. *In vitro* propagation of rose-a review. Biotechnology Advances, 24: 94-114.
- Ruzic, D.j.V. and Vujovic, T.I., 2008. The effects of cytokinin types and their concentration on *in vitro* multiplication of sweet cherry cv. Lapins (*Prunus avium* L.). HortScience, 3: 12–21.
- Sabeti, H., 2008. Forests, Trees, and Shrubs of Iran. Yazd University Publication, 886 pp. (In persian)
- Sadeghi, F., Yadollahi, A., Jafarkhani Kermani, M. and Eftekhari, M., 2015. Optimizing culture media for *in vitro* proliferation and rooting of Tetra (*Prunus empyrean* 3) rootstock. Journal of Genetic Engineering and Biotechnology, 13: 19–23.
- Sedlák, J. and Paprštein, F., 2008. *In vitro* shoot proliferation of sweet cherry cultivars Karešova and rivan, Horticultural Science (Prague), 35 (3): 95–98.
- Wu, H., Yu, X., Teixeira da Silva, J.A. and Lu, G., 2011. Direct shoot induction of *Paeonia lactiflora* ‘Zhong Sheng Fen’ and rejuvenation of hyperhydric shoots. New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science, 39: 271-278.
- Yildirim, H., Onay, A., Tilkat, E. and Akturk, Z., 2011. Micropropagation of the apricot (*Prunus armeniaca* L.) cv. Hacıhaliloğlu by means of single node culture. Turkish Journal of Agriculture and Forestry, 35: 55-64.
- Zarei, M., Garoosi, G.h., Nezami, E., Hosseini, R. and Ahmadi, J., 2013. The effect of medium, carbon source, light spectrum and style treatment of auxin on shoot and root regeneration of gisela 6 rootstock. Journal of Cell & Tissue, 4: 169-185. (In persian)
- Zou, Y.N., 2010. Micropropagation of Chinese Plum (*Prunus salicina* Lindl.) using mature stem segments. Notulae Botanicae Horti Agrobotanici *Cluj*-Napoca, 38: 214-218.
- Driver J.A. and Kuniyuki A.H., 1984. *In vitro* propagation of Paradox walnut *Juglans hindsii* × *Juglans regia* rootstock. Horticultural Science, 19: 507- 509.
- Fisichella, M., Silvi, E. and Morini, S., 2000. Regeneration of somatic embryos and roots from quince leaves cultured on media with different macroelement composition. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 63: 101-107.
- Gangi Moghadam, E., Bolandi, A.R. and Anahid, S., 2008. Micropropagation of four selected dwarf mahaleb (*Prunus mahaleb* L.) genotypes. Pajouhesh & Sazandegi, 79: 54-61. (In persian)
- Hazarika, B.N., and Bora, A., 2010. Hyperhydricity-A bottleneck to micropropagation of plants. Acta Horticulturae, 865: 95-101.
- Ivanova, M. and Van Staden, J., 2008. Effect of ammonium ions and cytokinins on hyperhydricity and multiplication rate of *in vitro* regenerated shoots of *Aloe polyphylla*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 92: 227-231.
- Jazirie, M.H. and Ebrahimi Rastaghi, M., 2003. Zagros Silviculture. Tehran University Publications, Tehran, 560 pp.
- Kadota, M., and Nimi, Y., 2003. Effect of cytokinin types and their concentrationon shoot proliferation and hyperhydicity in *in vitro* pear cultivar shoots. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 72: 261-265.
- Khatamsaz, M., 1992. Flora of Iran: Rosaceae. Research Institute of Forests and Rangelands. Tehran, pp: 241-267. (In persian)
- Kollmann, J. and Pflugshaupt, K., 2005. Population structure of a freshly-fruited species at its range edge - the case of *Prunus mahaleb* L. in northern Switzerland. Botanica Helvetica, 115:49-61.
- Lloyd, G. and McCown, B., 1981. Commercially feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by the use of shoot tip culture. Proceeding of Plant Propagation society, 30: 421-427.
- Mahdaviyan, M., Bouzari, N. and 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, 1-26: 15-26. (In persian)
- Mohseniazar, M., Nazeri, S., Malboobi, M.A., Ghadimzadeh, M., Barzgari, A. and Farokhzad, A., 2012. Optimizing factors affecting *Agrobacterium tumefaciens* mediated transformation of dwarf rootstock of apple (*Malus domestica* Borkh Cv Gami Almasi). Agricultural Biotechnology, 10: 7-15.
- Murai,Y., Harada, H. and Yamashita, H., 1997. *In vitro* propagation of apricot (*Prunus armenica* L.)

Effects of plant growth regulators and culture media on shoot proliferation and reduction of vitrification of *Prunus mahaleb* L. via *in vitro* culture

G.R. Goodarzi[1*], V. Payam Nour[2], M. Jafari[3] and A. Aliarab[4]

1*- Corresponding author, Ph.D. Student, Silviculture & Forest Ecology, Faculty of Forest Sciences, University of Agricultural Sciences and Natural Resources of Gorgan, Gorgan, I.R.Iran, Email: goodarzi44@yahoo.com
2- Assist, Prof., Faculty of Forest Sciences, University of Agricultural Sciences and Natural Resources of Gorgan, I.R.Iran.
3- Assoc. Prof., Forest Research Division, Research Institute of Forests and Rangelands, Tehran, I.R. Iran.
4- Assist, Prof., Faculty of Forest Sciences, University of Agricultural Sciences and Natural Resources of Gorgan, I.R.Iran.

Received: 02.09.2015 Accepted: 29.10.2015

Abstract

Effects of different concentrations of plant growth regulators and culture media on shoot proliferation and vitrification of *Prunus mahaleb* L. via *in vitro* culture was studied using single node explants in two separate experiments. Shoots from single node explants were grown on 26 treatments (first experiment) of MS medium supplemented with different concentrations of cytokinins (BAP, TDZ, KIN, 2iP, and Zeatin) in combination with NAA and on 16 treatments (second experiment) of MS, 1/2 MS, WPM and DKW media supplemented with different combinations of $CaCl_2$ and NH_4NO_3 and cytokinins of BAP, Zeatin, and PG. Experiments were based on completely randomized design with five replicates and each replication included 5 explants. Means comparison after 2 subcultures in the first experiment showed that the highest shoot length (3.14 cm) were obtained on 0.1 mg l^{-1} NAA in cytokinin -free medium, the highest number of shoot (14.67 shoot numbers per explants) on 0.2 mg l^{-1} Zeatin plus 0.1 mg l^{-1} NAA, and the lowest vitrification on 0.1 mg l^{-1} KIN, 0.05 and 0.1 mg l^{-1} Zeatin plus 0.1 mg l^{-1} NAA, respectively. In the second experiment, the highest shoot length (2.88 cm) were observed on DKW medium with 0.2 mg l^{-1} Zeatin plus 40 mg l^{-1} PG and the highest number of shoot (19 shoot number per explants) on MS medium with 880 mg l^{-1} $CaCl_2$ and 825 mg l^{-1} NH_4NO_3. The present research by accessing to the highest proliferation (19 shoot numbers per explants) and decreasing vitrification of *Prunus mahaleb* L. provided a possibility of doing other research projects for protocol commercialization.

Keywords: Plant growth regulators, proliferation, phloroglucinol, single node culture, vitrification.