تأثیر اکسین‌های IAA، IBA و NAA بر ریشه‌زایی درون شیشه‌ای پایه‌های M.9 و M.26 سیب

سیدمهدی میری (نویسنده مسئول)

استادیار، گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، واحد کرج، دانشگاه آزاد اسلامی، کرج، ایران،

smmiri@kiau.ac.ir

تاریخ دریافت: آبان ۱۳۹۶ تاریخ پذیرش: بهمن ۱۳۹۶

Effect of IAA, IBA and NAA auxins on *in vitro* rooting of M.9 and M.26 Apple rootstocks

Seied Mehdi Miri

Assistant Professor, Department of Horticulture, Agriculture and Natural resources college, Karaj Branch, Islamic Azad University, Karaj, Iran, smmiri@kiau.ac.ir

**Corresponding author: Seied Mehdi Miri*

Received: October 2017 *Accepted: Jaunary 2017*

Abstract

In order to determine the effect of three auxins of IAA, IBA and NAA seperately and in combinations on *in vitro* rooting of M.9 and M.26 apple rootstocks (*Malus pumila* Mill.), an experiment was carried out using completely randomized design with sixteen replications. Rooting is accomplished in two stages. At first stage, shoots of M.9 and M.26 were cultured in modified MS medium containing hormone and in the dark for 4 and 7 days respectively and then were transferred to the same medium (but without hormone) under light. Results showed that all shoots were rooted with treatments of 3 $mg.l^{-1}$ IAA, 0.5+0.5 & 1.5+1 $mg.l^{-1}$ IAA+IBA and 2.5+0.5 $mg.l^{-1}$ IAA+NAA for M.9 and 3 $mg.l^{-1}$ IAA for M.26 rootstock. Highest of root no/rooted shoots were achieved with 0.5+0.5 $mg.l^{-1}$ IAA+IBA and 0.1 $mg.l^{-1}$ NAA for M.9 and M.26, respectively. Rooted shoots transferred to peat and gradually acclimatized. Plantlet survival rates after one month were 92.8 and 88.1% for M.9 and M.26, respectively.

Keywords: Apple, Auxin, *In vitro* rooting.

چکیده

به منظور تعیین اثر سه اکسین IAA، IBA و NAA بصورت جداگانه و ترکیبی بر ریشه‌زایی درون شیشه‌ای پایه‌های M.9 و M.26 سیب (*Malus pumila* Mill.)، آزمایشی در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۱۶ تکرار به اجرا در آمد. ریشه‌زایی در دو مرحله انجام گرفته و در مرحله اول شاخساره‌های M.9 و M.26 به ترتیب به مدت ۴ و ۷ روز در محیط کشت MS تغییر یافته حاوی هورمون و در تاریکی نگهداری شدند و سپس به محیطی مشابه قبل، اما بدون هورمون و در روشنایی انتقال یافتند. نتایج نشان داد که در تیمارهای ۳ میلی‌گرم در لیتر IAA، ۰/۵ + ۰/۵ و ۱ + ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر IAA+IBA و ۰/۵ + ۲/۵ میلی‌گرم در لیتر IAA+NAA تمامی شاخساره‌های M.9 و ۳ میلی‌گرم در لیتر IAA، کلیه شاخساره‌های M.26 ریشه‌دار شدند. بالاترین تعداد ریشه در شاخساره‌های ریشه‌دار شده با ۰/۵ + ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر IAA+IBA برای پایه M.9 و ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر NAA برای پایه M.26 بدست آمد. شاخساره‌ها پس از ریشه‌دار شدن به بستر کشت پیت منتقل و بتدریج با شرایط محیط بیرون سازگار شدند. درصد زنده‌مانی گیاهچه‌ها پس از یک ماه، ۹۲/۸ و ۸۸/۱ درصد بترتیب برای M.9 و M.26 بود.

کلمات کلیدی: اکسین، ریشه‌زایی درون شیشه‌ای، سیب

مقدمه و کلیات

در میوه کاری از پایه برای کنترل رشد، تحمل متغیرهای خاک، آب و هوا، مقاومت به آفات و بیماریها، زودباردهی، افزایش عملکرد و غیره استفاده می‌شود(Webnter, 2002). اولین یادداشت در مورد درختان پاکوتاه سیب به سه قرن قبل از میلاد و به دو نفر از دانشجویان ارسطو نسبت داده شده است. اما توجه به درختان سیب پاکوتاه به حداقل نیم قرن پیش باز می‌گردد. Feree و Carlson فهرست ۴۷ پایه سیب را منتشر ساختند که این فهرست شامل سری‌های مالینگ، مالینگ مرتون، لهستانی، بوداگوسکی، اتاوا، میشیگان، کنت ویل، کرنل- جنوا و پایه‌های متفرقه بود. دو پایه پاکوتاه M.9 و M.26 نیز از جمله این پایه‌ها و از سری پایه‌های مالینگ می‌باشند. پایه M.9 بطور تصادفی در سال ۱۸۷۹ در فرانسه انتخاب و تحت عنوان Jaune de metz نامیده شد و بیش از سایر پایه‌ها، بصورت پایه و میان پایه کوتاه‌کننده مورد استفاده قرارگرفته است و ارقام پیوندی روی آن عملکرد بالایی دارند(Feree and Jadczuk, 2000; Carlson, 1987). پایه M.26 نیز از تلاقی M.9 و M.16 بوجود آمده و بعد از معرفی در سال ۱۹۵۹ بخاطر زودباردهی، پاکوتاهی و پربار بودن درختان بر روی آن، خیلی سریع بصورت پایه عمومی درآمد (Feree and Carlson, 1987). این دو پایه از طریق خوابانیدن و نیز قلمه عموماً پایه M.26) تکثیر می‌شوند. قلمه‌های M.26 تقریباً به راحتی ریشه می‌دهند اما پایه M.9 سخت ریشه‌زا بوده و درصد ریشه‌زایی آن پایین می‌باشد(Sharma *et al*., 2007). برای تحریک ریشه‌زایی، فروبردن انتهای قلمه‌ها در محلول ۰/۴-۰/۱ درصد یا پودر ۰/۵ و ۱ درصد IBA توصیه شده است(Ersoy *et al.,* 2010؛ Karakurt *et al.,* 2009). ریزازدیادی نیز فرصتی را برای تکثیر سریع فراهم می‌سازد. یکی از مراحل کلیدی ریزازدیادی، ریشه‌زایی و انتقال به خاک است. برای ریشه‌زایی درون شیشه‌ای، عموماً اکسین‌های IAA، IBA و NAA مورد استفاده قرار می‌گیرند(McDonald, 2006). برخی محققین بهترین نتیجه را با IBA یا NAA بدست آورده و بعضی نیز IAA را به عنوان اکسین مناسب گزارش کرده‌اند. Abdul Kader *et al.,* 1991 در آزمایشی که روی ریشه‌زایی ارقام Granny Smith، Mutsu و Spur Golden Delicious سیب انجام دادند، بهترین نتیجه را با IBA و سپس NAA گزارش کرده و کمترین تأثیر را با IAA بدست آوردند. Soni *et al.,* 2011 گزارش کردند NAA موثرتر از IBA و IAA در ریشه‌زایی شاخساره‌های پایه MI.793 سیب می‌باشد. برخلاف آنها، De Klerk *et al.,* 1997، Bommineni *et al.,* 2001 و Radmann *et al.,* 2002، IAA را به عنوان اکسین مناسب برای تشکیل ریشه نابجای پایه‌های M.9 Jork، M.9 و رقم Gala Gala معرفی کردند. به همین منظور با توجه به توسعه روزافزون کشت باغات متراکم سیب و ضرورت تولید انبوه و عاری از بیماری پایه‌های پاکوتاه کننده، در این پژوهش اثر سه نوع اکسین IAA، IBA و NAA روی بهینه‌سازی ریشه‌زایی درون شیشه‌ای شاخساره‌های پایه‌های M.9 و M.26 و انتقال به خاک و سازگاری آنها مورد بررسی قرار گرفته است.

فرآیند پژوهش

در این پژوهش از شاخساره های دو سانتیمتری M.9 که در محیط کشت MS(Murashige and Skoog, 1962) حاوی ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر BA و ۱ میلی

گرم در لیتر Kin و شاخساره های M.26 که در محیط کشتی شامل عناصر معدنی MS و ویتامین‌های B5(Gamborg *et al*., 1968) حاوی ۰/۷۵ میلی‌گرم در لیتر BA و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر Kin بطور ماهیانه واکشت می‌شدند استفاده گردید. محیط کشت هر دو پایه حاوی ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر GA_3، ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر IBA، ۱۶۲ میلی‌گرم در لیتر فلوروگلوسینول (PG)، ۳۰ گرم در لیتر سوربیتول و ۸ گرم در لیتر آگار نیز بود(میری و همکاران، ۱۳۸۲a؛ میری و همکاران، ۱۳۸۲b). محیط پایه ریشه‌زایی M.9 و M.26 همانند محیط فوق بوده، با این تفاوت که غلظت نمک‌های معدنی به نصف، سوربیتول به ۲۰ گرم در لیتر و آگار به ۷ گرم در لیتر کاهش یافته و BA، Kin، GA_3 و IBA حذف شدند. در این تحقیق از روش ریشه زایی دو مرحله‌ای و مشابه روش Bolar *et al.,* 1998 استفاده شد. در مرحله اول شاخساره‌ها در محیط کشت پایه حاوی اکسین(۱۸ تیمار) کشت گردیده و به مدت ۴ و ۷ روز بترتیب برای M.9 و M.26 در تاریکی قرار داده شدند و سپس به محیطی همانند محیط مرحله اول با این تفاوت که محیط مرحله دوم فاقد اکسین و PG بود و روشنایی با شدت نور ۲۵۰۰ لوکس و طول روز ۱۶ ساعت روشنایی انتقال یافتند. برای تشکیل ریشه و در مرحله اول، از سه اکسین IAA(۱، ۳، ۵ میلی گرم در لیتر)، IBA(۱، ۲، ۳ میلی گرم در لیتر) و NAA(۰/۱، ۰/۵، ۱ میلی گرم در لیتر) بصورت جداگانه و ترکیبی با نصف غلظت استفاده شده و پس از یک ماه از شروع کشت، درصد ریشه زایی، تعداد و طول ریشه (بزرگ‌تر از ۵ میلی متر) در شاخساره‌های ریشه دار شده اندازه‌گیری شد. پس از اینکه شاخساره‌ها ریشه‌دار شدند، آن‌ها را از ظروف کشت بیرون آورده و ریشه‌شان با آب شستشو داده شد تا محیط کشت چسبیده به ریشه‌ها شسته شود و سپس به بستر پیت که در محلول ۰/۱ درصد کاپتان خیسانده شده بودند، منتقل گردیدند. گیاهچه‌ها به مدت حدود ۲ هفته در زیر پوشش پلاستیکی قرارداده شده و هر روز پوشش به مدت کوتاهی برداشته می‌شد و بتدریج زمان آن افزایش یافت تا گیاهچه‌ها به شرایط رطوبت کم عادت کنند و هفته‌ای یک بار نیز با محلول نصف غلظت نمک‌های MS و نیز محلول ۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر GA_3 بفواصل ۱۰ روز محلول‌پاشی شدند.

تجزیه آماری به صورت طرح کاملاً تصادفی با ۱۶ تکرار و مقایسه میانگین تیمارها با استفاده از آزمون LSD در سطح احتمال ۱ درصد با استفاده از نرم افزار SAS 9.01 انجام گرفت.

نتایج و بحث

تأثیر اکسین‌ها بر ریشه‌زایی شاخساره‌های M.9:

درصد ریشه‌زایی شاخساره‌های M.9 در تیمارهای ۳ میلی‌گرم در لیتر IAA، ۰/۵ + ۰/۵ و ۱ + ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر IAA+IBA و ۰/۵ + ۲/۵ میلی‌گرم در لیتر IAA+NAA به ۱۰۰ درصد رسید(جدول ۱). پایین‌ترین درصد ریشه‌زایی(۶۸/۷ درصد) نیز مربوط به ۰/۵ + ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر IBA+NAA بود. بالاترین تعداد ریشه در شاخساره‌های ریشه‌دار شده (۶/۱ ریشه) با ۰/۵ + ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر IAA+IBA بدست آمد. میانگین طول ریشه در شاخساره‌های ریشه‌دار شده بین ۳/۲-۱/۶ سانتی‌متر بود. در پایین شاخساره‌هایی که ریشه‌دار نشده بودند، کالوسی تشکیل نشد(شکل ۱، بالا).

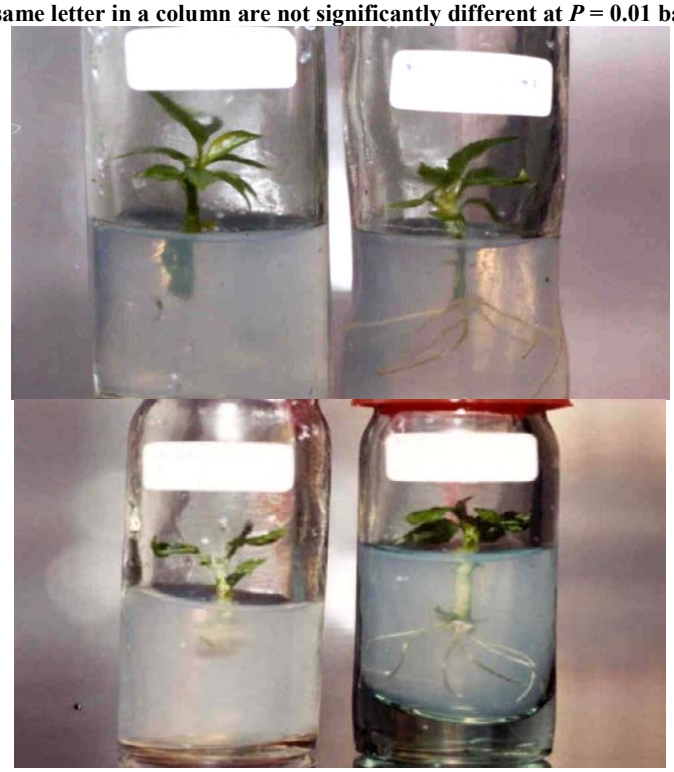
جدول ۱: تأثیر اکسین‌ها بر ریشه‌زایی شاخساره‌های M.9

Table 1: Effect of auxins on rooting of M.9 shoot tips

غلظت اکسین ($mg.l^{-1}$)			درصد ریشه زایی	تعداد ریشه/شاخساره	طول ریشه (cm)
IAA	IBA	NAA			
1	0	0	93.7	3.3 cde	1.9 b
3	0	0	100	3.0 de	2.1 b
5	0	0	87.5	3.1 cde	1.7 b
0	1	0	87.5	4.0 bcd	2.1 b
0	2	0	87.5	5.1 abc	2.0 b
0	3	0	81.2	4.5 abcd	1.7 b
0	0	0.1	75.0	1.8 e	3.2 a
0	0	0.5	93.7	3.5 cde	2.7 ab
0	0	1	81.2	4.3 acbd	2.2 ab
0.5	0.5	0	100	6.1 a	1.9 b
1.5	1	0	100	3.2 cde	1.9 b
2.5	1.5	0	93.7	3.5 cde	2.1 b
0.5	0	0.05	93.7	3.7 cd	1.9 b
1.5	0	0.25	87.5	3.4 cde	3.0 a
2.5	0	0.5	100	3.7 bcd	2.2 ab
0	0.5	0.05	81.2	4.9 abcd	1.6 b
0	1	0.25	87.5	6.0 ab	2.8 a
0	1.5	0.5	68.7	4.8 abcd	2.4 ab

میانگین‌های دارای حرف مشترک در هر ستون تفاوت معنی‌داری در سطح احتمال ۱٪ بر اساس آزمون LSD ندارند.

Means with the same letter in a column are not significantly different at *P* = 0.01 based on LSD test.



شکل ۱: شاخساره‌های ریشه‌دار شده و نشده M.9 (بالا) و M.26 (پایین) پس از یک ماه

Figure 1: Rooted and non-rooted of M.9 (top) and M.26 (button) shoot tips after one month

تأثیر اکسین‌ها بر ریشه‌زایی شاخساره‌های M.26:

همانطور که در جدول ۲ مشاهده می‌شود، درصد ریشه‌زایی M.26 کمتر از M.9 بوده و اثر نوع اکسین‌ها بر درصد ریشه‌زایی کاملاً مشهود بود. شاخسارهائیکه در محیط‌های IAA و IBA قرارداشتند، به ترتیب بالاترین و پایین‌ترین درصد ریشه‌زایی را به خود اختصاص داده و تأثیر NAA نیز حد واسط این دو بود. در بین ۱۸ تیمار، فقط شاخسارهایی که در محیط حاوی ۳ میلی گرم در لیتر IAA بودند، ۱۰۰ درصد ریشه‌زایی داشتند(جدول ۲). ترکیب دو به دو اکسین‌ها نیز موجب افزایش درصد ریشه‌زایی در مقایسه با IBA و NAA شد. از نظر

تعداد ریشه، در شاخساره‌های ریشه‌دار شده اختلاف زیادی بین تیمارها مشاهده نگردید و فقط تیمار ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر NAA(با ۵/۰ ریشه) با تیمارهای ۳ میلی‌گرم در لیتر IBA، ۲/۵+۰/۵ میلی‌گرم در لیتر IAA+NAA و تمامی ترکیبات IBA+NAA اختلاف معنی‌دار داشت. میانگین طول ریشه در شاخساره‌های ریشه‌دار شده بین ۱/۹-۰/۲ سانتی متر بود. در محیط‌های حاوی IAA، IBA و NAA بصورت جداگانه، با افزایش غلظت اکسین، تعداد ریشه در شاخساره‌های ریشه‌دار شده کاهش یافت. برخلاف M.9، در پایین شاخساره‌های M.26 که ریشه‌دار نشده بودند، کالوس زیادی تشکیل گردید(شکل ۱، پایین).

جدول ۲: تأثیر اکسین‌ها بر ریشه‌زایی شاخساره‌های M.26

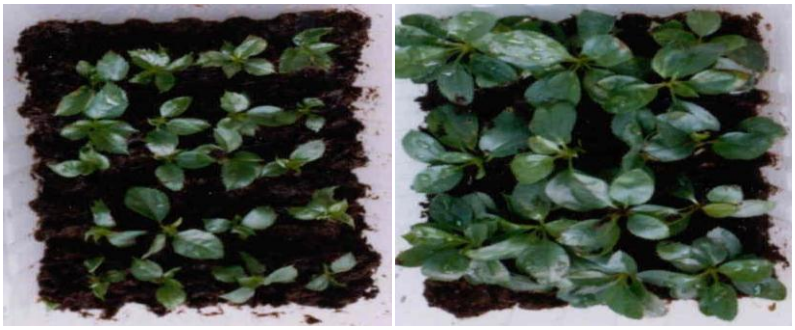
Table 2: Effect of auxins on rooting of M.26 shoot tips

غلظت اکسین ($mg.l^{-1}$)			درصد ریشه زایی	تعداد ریشه/شاخساره	طول ریشه (cm)
IAA	IBA	NAA			
1	0	0	68.7	4.2 ab	0.6 b
3	0	0	100	3.5 ab	1.4 a
5	0	0	87.5	2.2 ab	1.5 a
0	1	0	25.0	3.5 ab	0.2 b
0	2	0	37.5	3.0 ab	1.2 ab
0	3	0	31.2	2.0 b	1.1 ab
0	0	0.1	75.0	5.0 a	1.1 ab
0	0	0.5	56.2	2.8 ab	1.0 ab
0	0	1	43.7	2.3 ab	0.4 b
0.5	0.5	0	75.0	3.5 ab	1.2 ab
1.5	1	0	56.2	3.5 ab	0.7 b
2.5	1.5	0	68.7	4.3 ab	0.8 b
0.5	0	0.05	75.0	3.3 ab	1.0 ab
1.5	0	0.25	75.0	4.0 ab	1.9 a
2.5	0	0.5	56.2	1.5 b	0.7 b
0	0.5	0.05	62.5	1.6 b	1.2 ab
0	1	0.25	68.7	1.8 b	1.9 a
0	1.5	0.5	62.5	2.0 b	1.3 ab

میانگین‌های دارای حرف مشترک در هر ستون تفاوت معنی‌داری در سطح احتمال ۱٪ بر اساس آزمون LSD ندارند.

Means with the same letter in a column are not significantly different at $P = 0.01$ based on LSD test.

انتقال به خاک و سازگاری گیاهچه‌ها: شاخساره‌های ریشه‌دار شده که به پیت منتقل شده بودند، بخوبی مستقر گشته و با شرایط محیط بیرون سازگار شدند (عکس ۲)، بطوریکه درصد زنده ماندن این گیاهچه‌ها پس از یک ماه، ۹۲/۸ و ۸۸/۱ درصد بترتیب برای M.9 و M.26 بود.



شکل ۲: انتقال گیاهچه‌های ریشه‌دار شده به پیت (راست) و رشد آنها پس از یک ماه (چپ)

Figure 2: Transfer of rooted plantlets to peat (right) and their growth after one month (left)

گام اصلی در تکثیر گیاهان، تولید گیاهچه‌هایی با ریشه مناسب است. شاخساره‌های پرورش یافته در شرایط درون شیشه‌ای به علت 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. به همین

خاطر سیستم ریشه قوی اجازه می‌دهد تا گیاهان سازگاری آسان‌تر و سریع‌تری به شرایط برون شیشه-ای داشته باشند(Krupa-Małkiewicz and Mgłosiek, 2016). در این تحقیق از روش ریشه‌زایی دو مرحله‌ای استفاده شد. در مرحله اول(محیط حاوی اکسین و تاریکی) القاء ریشه انجام شده و مریستموئید های ریشه تشکیل گردیدند و در مرحله دوم(محیط بدون اکسین و روشنایی) رشد و ظهور ریشه‌ها انجام می‌گیرد. De Klerk *et al.,* 1995 در تحقیقی روی ریشه‌زایی شاخساره های پایه M.9 Jork سیب، فرایند تشکیل ریشه نابجا را به سه مرحله غیراختصاصی شدن(Dedifferentiation)، القا (Induction) و اختصاصی شدن(Differentiation) تقسیم‌بندی نمودند و اظهار کردند که تنظیم کننده‌های رشد مناسب برای ریشه‌زایی فقط در مرحله القا مورد نیازند. آن‌ها نتیجه گرفتند که مرحله غیر اختصاصی شدن از ۲۴-۰ ساعت، مرحله القا از ۷۲-۲۴ یا ۹۶ ساعت و بعد از آن مرحله اختصاصی شدن می‌باشد. De Klerk and Falavinga, 1995 در تحقیقی دیگر دریافتند که IBA تأثیر محرکی زیادی در مرحله القاء ریشه دارد، اما در طول مرحله اختصاصی شدن، تأثیر بازدارندگی ضعیفی روی تشکیل ریشه داشته است. Naija, *et al.,* 2008 نیز در بررسی تغییرات آناتومیکی و بیوشیمیایی در حین تشکیل ریشه پایه MM.106 گزارش کردند که اولین تقسیمات سلولی در ۳ روز پس از تیمار با IBA اتفاق می‌افتد و پریموردیای ریشه‌ها در روز هفتم ظاهر می‌شوند. در برخی آزمایشاتی که روی ریشه زایی انجام شده، گزارش شده است که نگهداری کشت‌ها به مدت چند روز تا ۲-۱ هفته در تاریکی و در ابتدای مرحله ریشه‌زایی می‌تواند موجب بهبود ریشه‌زایی گردد(Bolar *et al*., 1998؛ Fotopoulos and Sotiropoulos, 2005؛ Modgil *et al.,* 1999). همچنین تیمار شاخساره‌ها به مدت کوتاه چند ساعت تا چند روز با غلظت‌های بالای اکسین موجب بهبود ریشه‌زایی در مقایسه با تیمار طولانی مدت ۶-۴ هفته‌ای با غلظت‌های پایین می‌شود(Amin Dalal *et al*., 2006؛ Vaghari-Azar *et al*., 2012). به همین منظور، برخی محققین برای ریشه‌زایی شاخساره های سیب، آن‌ها را به مدت چند روز در تاریکی قرارداده و سپس به روشنایی منتقل کردند(Modgil *et al.,* 1999) یا به مدت چند ساعت تا چند روز در محیطی با غلظت بالای اکسین کشت کرده و سپس به محیط عاری از اکسین انتقال دادند(Sharma *et al*., 2007) و یا از دو روش فوق به صورت توام استفاده کردند (Bolar *et al*., 1998). Quambusch *et al*. 2017 نیز در آزمایشی روی گیلاس مشاهده کردند که با کشت شاخساره‌ها به مدت ۴۸ ساعت و یا ۴ روز در محیط حاوی IBA، ریشه زایی بهتری حاصل می‌شود. علت بکارگیری روش دو مرحله‌ای در این آزمایشات نیز بر اساس نتایج فوق بود. برای ریشه‌زایی درون شیشه‌ای پایه‌های سیب، اکثر محققین از اکسین IBA استفاده کرده‌اند(Harbage and Stimart, 1996؛ Kaushal *et al*., 2005؛ Sharma *et al*., 2007). با اینحال در برخی گزارشات، IAA(Radmann *et al.,* 2002) یا NAA(Soni *et al.,* 2011) به عنوان اکسین مناسب ریشه‌زایی معرفی شده است. در این پژوهش، در مقایسه تأثیر جداگانه سه اکسین استفاده شده، IAA بیشترین تأثیر را داشته است(خصوصاً در مورد پایه M.26) که با نتایج De Klerk *et al.,* 1997، Bommineni *et al.,* 2001 و Radmann *et al.,* 2002 مطابقت دارد. با توجه به تأثیر محرکی اکسین‌ها

روی ریشه‌زایی یا اثر بازدارندگی‌شان در غلظت‌های بیش از میزان مطلوب و همچنین وضعیت هورمونی درون زای ریزنمونه‌ها، به نظر می‌رسد تفاوت مشاهده شده میان اثر سه اکسین در گزارشات ذکر شده مربوط به تفاوت در نحوه اجرا و شرایط آزمایش، غلظت اکسین و نوع رقم و پایه باشد(De Klerk *et al.,* 1997). علاوه بر این، هر چند که IAA اکسین طبیعی بوده و توسط آنزیم IAA اکسیداز در گیاه تجزیه می‌شود(Arteca, 1996)، بنظر می‌رسد وجود PG که از اکسیداسیون IAA جلوگیری می‌کند و نقش محافظتی از آن دارد(Teixeira da Silva *et al.,* 2013) موجب شده نتایج متفاوتی نسبت به سایر گزارش‌ها بدست بیاید و ریشه‌زایی بهتری در مقایسه با سایر اکسین‌ها مشاهده شود. نتایج ریشه‌زایی شاخساره‌ها نشان داد که ریشه‌زایی این دو پایه مطلوب بوده و درصد ریشه‌زایی بدست آمده در این آزمایش(۱۰۰٪) بیش از حداکثر موارد گزارش شده روی پایه‌های M.9(۹۵/۳-۴۴ درصد) و M.26(۸۵ درصد) بوده است(James and Thurbon, 1981؛ Webster, and Jones, 1989). همچنین بالاترین تعداد ریشه در شاخساره‌های ریشه‌دار شده M.9(۶/۱ ریشه) بیش از نتایج James and Thurbon, 1981 و Yaseen *et al.,* 2009 بترتیب با ۴/۹ و ۴/۵ ریشه/شاخساره بوده اما در مورد پایه M.26(۵/۰ ریشه/شاخساره)، از گزارش Yaseen *et al.,* 200 با ۶/۰ ریشه/شاخساره کمتر بوده است. موفقیت ریزازدیادی، به توانایی انتقال گیاهچه‌ها به بستر کشت و سازگار کردن آنها با شرایط محیط بیرون بستگی دارد. مرحله سازگاری گیاهچه‌ها موفقیت آمیز بود و حدود ۹۰٪ گیاهچه‌های منتقل شده به شرایط برون شیشه‌ای، به خوبی سیستم ریشه‌ای خود را گسترش داده و سازگار شدند(شکل ۲). شاخساره های ریشه دار شده پس از انتقال به پیت، اغلب وارد یک دوره رکود شده و هیچ رشدی نداشتند. محلول‌پاشی این گیاهچه ها با محلول ۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر GA_3 بفواصل ۱۰ روز موجب شکسته شدن خواب آنها و رشد دوباره‌شان شد. تغذیه گیاهچه‌ها با محلول ۱/۲ نمک‌های MS، هفته‌ای یک بار نیز در افزایش رشدشان مؤثر بود.

نتیجه‌گیری کلی

نتایج این پژوهش نشان داد ریشه‌زایی درون شیشه‌ای شاخساره‌های سیب تحت تأثیر عوامل زیادی از جمله ژنوتیپ و نوع و غلظت اکسین‌ها قرار می‌گیرد و تیمار ۰/۵+۰/۵ میلی‌گرم در لیتر IAA+IBA و ۳ میلی‌گرم در لیتر IAA بترتیب برای ریشه‌زایی شاخساره‌های M.9 و M.26 مناسبند. همچنین پیشنهاد می‌شود برای بهبود ریشه‌زایی، از سایر محیط کشت‌های مخصوص گیاهان چوبی مورد آزمایش قرارگیرد.

منابع

میری، س. م.، واعظ‌لیواری، ب. خلیقی ا. و قائم‌مقامی، س. ع. ۱۳۸۲a. تأثیر کربوهیدرات، اسید جیبرلیک، ایندول بوتیریک اسید، فلوروگلوسینول، نحوه قرارگیری ریزنمونه در محیط و حجم ظروف کشت در بهینه‌سازی تکثیر درون شیشه‌ای پایه M.9 سیب. پژوهش و سازندگی. ۵۹: ۳۷-۳۱.

میری، س. م.، واعظ‌لیواری، ب. خلیقی ا. و قائم‌مقامی، س.ع. ۱۳۸۲b. کاهش اکسیداسیون فنلی و پرآوری درون شیشه‌ای شاخساره همگروه های سیب 'M.9' و 'M.26'. مجله علوم و فنون باغبانی ایران. ۴(۴-۳): ۱۵۴-۱۴۵.

Abdul Kader, A.M., Mathe, A. and Laszloffy, K. 1991. *In vitro* propagation of apple: comparative response of three cultivars to

Jadczuk, E. 2000. Growth and bearing of 'Jonagold' apple trees on eight rootstocks. Acta Horticulturae, 517: 175-181.

James, D.J. and Thurbon, I.J. 1981. Shoot and root initiation *in vitro* in the apple rootstock M 9 and the promotive effects of phloroglucinol. Journal of Horticultural Science, 56(1): 15-20.

Karakurt, H., Aslantas, R., Ozkan, G. and Guleryuz, M. 2009. Effects of indol–3-butyric acid (IBA), plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) and carbohydrates on rooting of hardwood cutting of MM106 apple rootstock. African Journal of Agricultural Research, 4(2): 60-64.

Krupa-Małkiewicz, M. and Mgłosiek, O., 2016. The influence of IBA, IAA and NAA on rooting of *Celosia argentea* var. Cristata (L.) Kuntze *in vitro* culture. Folia Pomeranae Universitatis Technologiae Stetinensis. 325(37)1: 39-46.

McDonald, B. 2006. Practical woody plant propagation for nursery growers, Vol. 1. Timber, Hong Kong.

Modgil, M., Sharma, D.R. and Bhardwaj, S.V. 1999. Micropropagation of apple cv. Tydeman's Early Worcester. Scientia Horticulture, 81: 179-188.

Murashige T. and Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. Physiologia Plantarum, 15(3): 473–497.

Naija, S., Elloumi, N., Jbir, N., Ammar, S. and Kevers, C. 2008. Anatomical and biochemical changes during adventitious rooting of apple rootstocks MM 106 cultured *in vitro*. Comptes Rendus Biologies, 331(7): 518-525.

Quambusch, M., Gruß, S., Pscherer, T., Winkelmann, T. and Bartsch, M. 2017. Improved in vitro rooting of *Prunus avium* microshoots using a dark treatment and an auxin pulse. Scientia Horticulturae,220: 52-56.

Radmann, E.B., Fachinello, J.C. and Peters, J.A. 2002. Effect of auxin and cultivation conditions in in vitro rooting of rootstock of apple 'M-9'. Revista Brasileira de Fruticultura, 24(3): 624-628.

Sharma, T., Modgil, M. and Thakur, M. 2007. Factors affecting induction and development of *in vitro* rooting in apple rootstocks. Indian Journal of Experimantal Biology, 45: 824-829.

cytokinin and auxin. Acta Horticulturae, 300: 155-161.

Amin Dalal, M., Das, B., Sharma, A.K., Amin Amir, M. and Singh Sounduri, A. 2006. *In vitro* cloning of apple (*Malus domestica* Borkh) employing forced shoot tip cultures of M.9 rootstock. Indian Journal of Biotechnology, 5: 543-550.

Bolar, J.P., Norelli, J.L. and Aldwinckle, H.S. 1998. An efficient method for rooting and acclimation of micropropagated apple cultivars. HortScience, 33(7): 1251-1252.

Bommineni, V.R., Mathews, H., Samuel, S.B., Kramer, M. and Wagner, D.R. 2001. A new method for rapid *in vitro* propagation of apple and pear. HortScience, 36(6): 1102-1106.

De Klerk, G.J., Brugge, J.T. and Marinova, S. 1997. Effectiveness of indoleacetic acid, indolebutyric acid and naphthaleneacetic acid during adventitious root formation *in vitro* in Malus 'Jork 9'. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 49: 39-44.

De Klerk, G.J. and Falavinga, A. 1995. Hormone requirements during the successive phases of rooting of Malus microcuttings. Proceeding of 8th International Congress of Plant Tissue Cell Culture, Florence, Italy: 111-116.

De Klerk, G.J., Keppel, M., Brugge, J.T. and Meekes, H. 1995. Timing of the phases in adventitious root formation on apple microcuttings. Journal of Experimantal Botany, 46(289): 965-972.

Ersoy, N., Kalyoncu, I.H., Aydin, M. and Yilmaz, M. 2010. Effects of some humidity and IBA hormone dose applications on rooting of M9 apple clonal rootstock softwood top cuttings. African Journal of Biotechnology, 9(17): 2510-2514.

Feree, D.C. and Carlson, R.F. 1987. Apple rootstocks. In: Rootstocks for Fruit Crops. Rom, R. C.; Carlson, R.F. (eds.). New York, Wiley.

Fotopoulos, S. and Sotiropoulos, T.E. 2005. *In vitro* rooting of PR 204/84 rootstock (*Prunus persica* × *P. amygdalus*) as influenced by mineral concentration of the culture medium and exposure to darkness for a period. Agronomy Research, 3(1): 3-8.

Gamborg, O.L., Miller, R.A. and Ijima, K. 1968. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. Experimental Cell Research, 50: 151-158.

Sharma, Y., Singh, S.K. and Thakur, N. 2013. Clonal propagation in apple. International Journal of Agricultural Sciences, 9(1): 423-428.

Soni, M., Thakur, M. and Modgil, M. 2011. *In vitro* multiplication of Merton I. 793- An apple rootstock suitable for replantation. Indian Journal of Biotechnology, 10: 362-368.

Vaghari-Azar, E., Vatanpour-Azghandi, A., Majidi-Heravan, E., Jalil Dejampour, J. and Habashi, A.A. 2012. Micropropagation of two apricot × plum inter specific hybrid rootstocks (HS405 and HS706). Iranian Journal of Genetics and Plant Breeding, 1(2): 9-15.

Webster, T. 2002. Dwarfing rootstocks: past, present and future. The Compact Fruit Tree, 35(3): 67-72.

Webster, C.A. and Jones, O.P. 1989. Effects of sustained subculture on apparent rejuvenation of the apple rootstock M.9 *in vitro* and *in vivo*. Annals of Forest Science, 46: 187-189.