بهبود پرآوری پایه MM_{106} سیب با کاربرد سایتوکینین‌های BAP و TDZ

مهدیه رضایی تبار [۱*]، محمدرضا دادپور [۲]

۱*- دانشجوی کارشناسی ارشد، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز

۲- دانشیار، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز.

*ایمیل نویسنده مسئول: m.rezaietabar@gmail.com

تاریخ دریافت : ۱۴۰۰/۰۷/۱۵ تاریخ پذیرش : ۱۴۰۰/۰۸/۱۱

چکیده

سیب یکی از مهم‌ترین درختان مناطق معتدل و سردسیر به شمار می‌آید که به سبب دارا بودن عطر و طعم مطبوع و ارزش اقتصادی بالای آن، مصرف‌کنندگان زیادی را به خود جلب کرده است. با در نظر گرفتن معایب ازدیاد سنتی سیب، کاربرد روشهای جدید مانند کشت درون شیشه‌ای توانسته تا حدودی این مشکلات را حل کرده و باعث ایجاد گیاهان اصلاحی، عاری از بیماریها و آفات، سرعت رشد بالا و گیاهان قوی شود. با این حال، این روش نیز نیازمند کاربرد برخی مواد کمکی به منظور بهبود رشد و رفع برخی از مشکلات ازدیادی است. به همین دلیل، این تحقیق به مطالعه تاثیر سیتوکنین‌های BAP و TDZ بر پرآوری و ایجاد محیط مناسب برای کشت بافت سیب MM_{106}، در قالب طرح کاملا تصادفی در سه تکرار پرداخته است. هر تکرار آزمایشی شامل پنج نوک شاخه کشت شده بود. ریز نمونه‌ها پس از جمع‌آوری از باغات سیب ایستگاه تحقیقاتی خلعت‌پوشان و ضدعفونی کردن با اتانول ۷۰ درصد، به محیط کشت MS حاوی دو غلظت ۰/۵ و ۰/۶ میلی‌گرم BAP و ۰/۲ و ۰/۴ میلی‌گرم TDZ انتقال یافتند. نتایج نشان داد که محیط کشت مناسب برای شاخص پلاستوکرون MM_{106} ، ۰/۴ میلی‌گرم TDZ و ۰/۶ میلی‌گرم BAP (تعداد برگ با میانگین برگ ۱/۸۷) می‌باشد.

کلمات کلیدی

"تنظیم‌کننده‌های رشد"، "پرآوری"، "سیب MM_{106}"، "کشت بافت"،

۱. مقدمه

درخت سیب (Malus x domestica L.) از مهم‌ترین گیاهان دانه‌دار خانواده Rosaceae در مناطق سردسیر و معتدله جهان است (Cornille et al.,2012). تعدادی از انواع سیب به عنوان پایه مورد استفاده قرار می‌گیرند، که یکی از فراوان‌ترین آنها پایه‌ی MM_{106} به دلیل سازگاری خوب با ارقام مختلف سیب می‌باشد. این پایه از دورگ‌گیری پایه‌های مالینگ و نورسرن اسپای (Northern spy) حاصل شده است و به دلیل زودباردهی ارثی بعد از معرفی سریعا مشهور شد. درختان بر روی این پایه از استقرار خوبی برخوردارند. MM_{106} جزو پایه‌های نیمه پاکوتاه کننده بوده و همچنین پاجوش‌دهی در این پایه دیده نمی‌شود. درختان بر روی پایه MM_{106} خیلی پربازده، با اندازه کوچکتر نسبت به درختان بر روی پایه‌های بذری می‌باشند (۶۰ تا ۷۰ درصد اندازه درختان بذری). این پایه به پوسیدگی یقه در خاک‌های با زهکشی نامطلوب نیز حساس گزارش شده است. همچنین درختان بر روی این پایه در آغاز توقف رشد و ریزش برگ تاخیر دارند، که این ویژگی مقاومت پایه را به سرما کاهش می‌دهد و این تاخیر توقف رشد در آخر فصل موجب می‌شود که حساسیت ارقام پیوندی بر روی آنها به بیماری آتشک افزایش یابد. پایه MM_{106} در خزانه با داشتن شاخه‌های لند، راست کرکدار با گره‌های نامشخص، و برگ سبز پررنگ پهن با سطح رویین براق و همچنین گوشوارک‌های بزرگ (تقریبا برگ مانند) به آسانی متمایز می‌باشند (Tavallale and Rahemi, 2007). گسترش کشت و تجارت جهانی سیب باعث توجه ویژه به این محصول و افزایش روزافزون سطح زیر کشت، در سرتاسرجهان شده است (Brown, 2012). بررسی ویژگی‌های سیب در شرایط درون‌شیشه ای به علت کنترل دقیق شرایط محیطی، مورد توجه بسیاری از پژوهشگران قرار گرفته است. پرآوری درون شیشه‌ای گونه‌های چوبی و سخت ریشه‌زا مانند پایه‌های سیب و تکثیر سریع آن در کوتاه مدت می‌تواند محدودیت‌های موجود را برطرف کند. ریزازدیادی، یک روش سریع برای تولید انبوه گیاهان در دوره‌های زمانی کوتاه مدت و صرف نظر از نوع فصل می‌باشد (Nasib et al., 2008). اهمیت بدست آوردن گیاهان سالم و عاری از ویروس، نیاز بازار به داشتن گیاهان یکنواخت، صرفه جویی در وقت و هزینه از جمله موردهایی هستند که سبب گسترش استفاده از روش کشت درون شیشه‌ای در تکثیر گیاهان شده است (Mahdavian et al., 2010). کمیت و کیفیت پرآوری ریزشاخه‌های سیب تحت تأثیر فعالیت مریستم‌های جانبی است و این امر نیز به نوبه خود از غلظت و تناسب هورمون‌های سایتوکنین، اکسین و جیبرلین تأثیر می‌پذیرد (Gerdakaneh et al., 2019). کاربرد سیتوکنین‌ها عموماً یکی از راهکارهای ضروری برای پرآوری شاخه در کشت بافت گیاهان، پذیرفته شده است. برخی موارد استفاده از این تنظیم کننده‌های رشد، علاوه بر این که موجب افزایش هزینه در تولید تجاری می‌شود، همچنین باعث به وجود آمدن مشکلات فیزیولوژیکی از جمله شیشه‌ای شدن یا ویتریفیکاسیون (Vitrification)، جارویی شدن گیاهچه‌ها و تولید کالوس‌های ناخواسته می‌شود. بنابراین جایگزینی روشی برای القاء پرآوری شاخه با کاربرد غلظت پایینتر تنظیم‌کننده‌های رشد بسیار سودمند می‌باشد (Banilas and Korkas, 2007; Ibanez et al.,2005). با بررسی‌های صورت گرفته بر روی سیب MM_{106}، محیط کشت حاوی BA و TDZ بیشترین تاثیر را بر روی پرآوری داشته و بتاثیر معنی‌داری بر روی سازگاری پایه سیب دارند (مشاری نصیر کندی و همکاران، ۲۰۱۸). طی پژوهش‌های صورت گرفته بر روی M_7 مشخص کرد که BAP تاثیر بیشتری نسبت به TDZ بر صفات باززایی دارد (مشاری نصیر کندی و همکاران،۲۰۱۹).

تکثیر سیب گوشت سرخ در محیط کشت MS حاوی چهار میکرومولار BAP و ریشه دارکردن ریزنمونه‌ها در محیط کشت MS ۱/۲ و فاقد ویتامین، حاوی ۳ میکرومولار IBA، مسیر مناسبی جهت ریزازدیادی موفق سیب گوشت سرخ است (Kazemi et al.,2020). بررسی اثر تنظیم‌کننده‌های رشد بر باززایی، پرآوری و ریشه‌زایی گیاه گلابی نطنز با روش کشت درون‌شیشه‌ای نشان داد، غلظت‌های ۱ تا ۳ میلی‌گرم هورمون BAP همراه با ۰/۰۱ تا ۰/۱ میلیگرم در لیتر هورمون TDZ میزان باززایی مطلوبتری نسبت به محیطهای فاقد هورمون دارد (صفرنژاد و همکاران، ۲۰۱۶). انتخاب محیط کشت مناسب یکی از مهمترین گام‌ها در توسعه گیاهان در کشت درون شیشه‌ای می‌باشد. با توجه به پژوهش‌های انجام گرفته در زمینه تاثیر تنظیم کننده‌های رشد گیاهی، این تحقیق با هدف بهینه سازی پرآوری و تعیین مناسب‌ترین تنظیم‌کننده رشد گیاهی در غلظت‌های مختلف، برای پرآوری و ریشه‌زایی درون شیشه‌ای پایه نیمه پاکوتاه سیب MM_{106} مورد بررسی قرار گرفت.

۲. مواد و روش

• مواد گیاهی و محیط کشت

مواد گیاهی مورد استفاده در این تحقیق از سرشاخه‌های جوان و در حال رشد درختان سه ساله سیب MM_{106} شهرستان تبریز، مرکز تحقیقاتی خلعت پوشان دانشگاه تبریز تهیه شدند. شاخه‌های تهیه شده به طول ۱۵ الی ۲۰ سانتی متر به آزمایشگاه منتقل و به قطعات کوچک ۱ تا ۱/۵ سانتی متری تقسیم شدند، که در هر قطعه برش خورده حداقل یک جوانه وجود داشت. نمونه‌ها پس از ضدعفونی، زیر هود با لوپ دو چشمی کشت نوک شاخه شدند. محیط کشت پایه موراشیگ اسکوگ[1] (MS) در این تحقیق مورد استفاده قرار گرفت.

• ضدعفونی کردن ریزنمونه‌ها

ریزنمونه‌ها مهمترین منبع آلودگی در کشت بافت گیاهان می‌باشند. مرحله ضدعفونی برای رفع بیشتر آلودگی‌های باکتریایی و قارچی انجام می‌شود. شاخه‌های جوان پس از تقسیم شدن به قطعات کوچکتر، به مدت ۵ دقیقه با آب جاری شستشو داده شدند و سپس با هیپوکلریت سدیم ۲ درصد به مدت ۲۰ دقیقه و اتانول ۷۰ درصد به مدت ۵ دقیقه ضدعفونی شدند و سپس ۳ بار با آب مقطر استریل زیر هود لامینار، شستشو داده شدند.

• استقرار ریزنمونه‌ها و اندازه‌گیری صفات رویشی

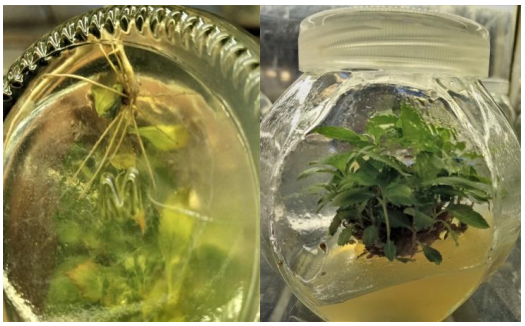
ریزنمونه‌ها پس از ضدعفونی شدن در زیر هود و با استفاده از لوپ دو چشمی، کشت نوک شاخه شدند و جوانه ها پس از فلس‌زدایی به محیط کشت حاوی MS و تنظیم‌کننده‌های رشد منتقل شدند (Kazemi et al.,2020) که در جدول (۱) ذکر شده است.

• تعداد شاخساره

تعداد شاخساره به ازای هر واحد آزمایشی که نشان‌دهنده پرآوری می‌باشد از طریق شمارش شاخه‌های جانبی نوپدید بدست آمد (شکل ۱).

جدول ۱- محتوای هورمونی مورد استفاده در آزمایش

تیمار	محتوای هورمونی
T_1	MS
T_2	MS + 0.3 mg/l BAP
T_3	MS + 0.6 mg /l BAP
T_4	MS + 0.2 mg/l TDZ
T_5	MS + 0.4 mg/l TDZ
T_6	MS + 0.3 mg/l BAP + 0.2 mg/l TDZ
T_7	MS + 0.3 mg/l BAP + 0.4 mg/l TDZ
T_8	MS + 0.6 mg/l BAP + 0.4 mg/l TDZ
T_9	MS + 0.6 mg/l BAP + 0.2 mg/l TDZ



شکل ۱ –ریزازدیادی پایه سیب MM_{106} در شرایط کشت درون شیشه‌ای.

• تعیین غلظت پروتئین‌های کل

به منظور تعیین غلظت پروتئین‌های محلول کل از روش برادفور استفاده شد (Jhanji *et al.*, 2012). در این روش ابتدا ۰/۵ گرم از هر نمونه برگی توسط ازت مایع در هاون چینی خرد و له شده و سپس به هر نمونه ۵۰ میلی‌گرم پلی وینیل پیرولیدون (PVP) اضافه شد. پس از آن ۱/۵ میلی‌لیتر بافر فسفات پتاسیم (pH=7) حاوی سدیم متابای سولفید (۰/۰۱۹ گرم در ۱۰۰ میلی‌لیتر بافر) اضافه شد و محتویات هاون به میکروتیوپ‌های ۲ میلی‌لیتری انتقال داده شد و در سانتریفیوژ یخچال‌دار با دور ۱۵۰۰۰ دور در دقیقه و دمای ۴ درجه سانتی‌گراد، به مدت ۲۰ دقیقه قرار گرفت. سپس نمونه‌ها به آرامی از یخچال خارج و ۵۰۰ میکرولیتر از فاز رویی عصاره با ۱۷۵ میکرولیتر گلیسرول ۵۰ درصد مخلوط و محلول بدست آمده به میکروتیوب‌های ۲۰۰۰ میکرولیتری منتقل و در فریزر ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. برای قرائت جذب پروتئین ۲۰ میکرولیتر عصاره با ۵۰۰ میکرولیتر محلول برادفورد مخلوط شد و ۲ دقیقه پس از اضافه نمودن عصاره به

[1] Murashige and Skoog medium

محلول برادفورد با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر و بر مبنای روش طیف سنجی و در طول موج ۵۹۵ نانومتر قرائت شدند.

- **تجزیه‌های آماری**

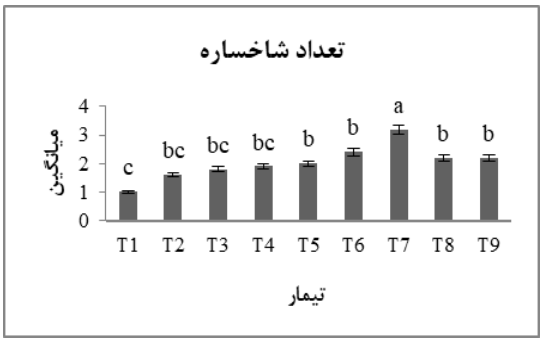
آزمایش فاکتوریل بر پایه طرح کاملا تصادفی انجام گرفت. محاسبات توسط نرم‌افزار آماری SPSS در سطح احتمال ۵ درصد و رسم نمودارها توسط نرم‌افزار Excel صورت پذیرفت.

۳. نتایج

صفات رویشی

تعداد شاخساره و شاخص پرآوری

نتایج تحقیق حاکی از آن است، اثر تیمار TDZ و BAP بر روی سیب MM_{106} به ترتیب در سطح احتمال ۱ و ۵ درصد معنی‌دار بود. بیشترین میزان شاخص پرآوری، تیمار ۰/۴ میلیگرم در لیتر TDZ و ۰/۳ میلیگرم در لیتر BAP و کمترین میزان شاخص پرآوری متعلق به شاهد بود (شکل ۲).



شکل ۲ - اثر غلظت‌های مختلف تیمار TDZ و BAP بر شاخص پرآوری پایه سیب MM_{106} در شرایط درون شیشه‌ای.

تعداد ریشه

تعداد ریشه به ازای هر واحد آزمایشی که نشان‌دهنده درصد ریشه زایی می‌باشد از طریق شمارش ریشه‌های نوپدید بدست آمدند. نتایج نشان داد که تاثیر تیمار TDZ و BAP روی سیب MM_{106} در سطح احتمال ۵ درصد معنی‌دار بود. بیشترین میزان تعداد ریشه متعلق به تیمار ۰/۴ میلیگرم در لیتر TDZ و ۰/۶ میلیگرم در لیتر BAP بود (جدول ۲).

قطر شاخه

قطر شاخه‌ها با استفاده از کولیس متر دیجیتالی اندازه گیری شد و اندازه‌ها براساس میلیمتر بیان شدند. بیشترین میزان قطر شاخه را تیمار ۰/۴ میلیگرم در لیتر TDZ بدست آمد (جدول ۲).

طول شاخه

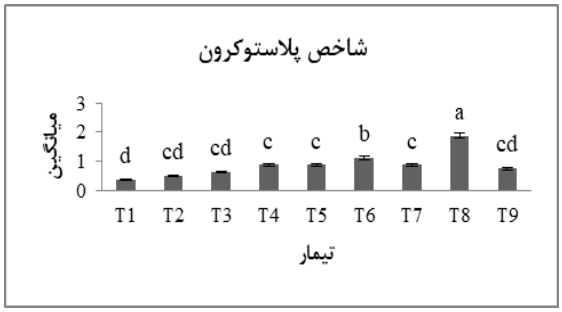
طول شاخه‌ها با استفاده از خط‌کش اندازه‌گیری شدند و اندازه‌ها براساس سانتیمتر بیان و سپس با استفاده از نرم‌افزارهای آنالیز داده ثبت شدند. بیشترین میزان طول شاخه متعلق به تیمار ۰/۲ میلیگرم در لیتر TDZ و ۰/۶ میلیگرم در لیتر BAP بود (جدول ۲).

وزن تر و خشک

وزن تر نمونه‌ها پس از خارج کردن از شرایط محیط کشت بر روی ترازو سه صفر، اندازه‌گیری شد، سپس برای تعیین وزن خشک، به خشک‌کن حاوی نور مادون قرمز (جهت حفظ کامل مواد و رنگ نمونه) منتقل و با استفاده از ترازو اندازه گیری شدند. تیمار ۰/۴ میلی‌گرم در لیتر TDZ و ۰/۶ میلی‌گرم در لیتر BAP بیشترین میزان وزن تر و خشک را نشان داد.

تعداد برگ و شاخص پلاستوکرون

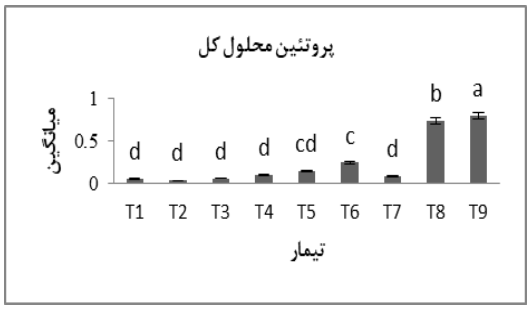
در این آزمایش، برگ‌های پدید آمده به ازای هر شاخساره در توالی‌های زمانی هفت روزه به مدت ۲ ماه شمارش شدند. شاخص پلاستوکرون یا زمان لازم برای پیدایش هر برگ که میزان برگ‌زایی و اندام‌زایی را نشان می‌دهد. نتایج نشان داد، اثر تیمار TDZ و BAP بر روی سیب MM106 در سطح احتمال ۵ درصد معنی‌دار است. بیشترین میزان شاخص پلاستوکرون، تیمار ۰/۴ میلی‌گرم در لیتر TDZ و ۰/۶ میلی‌گرم در لیتر BAP و کمترین شاخص برگ‌زایی متعلق به شاهد بود (شکل ۳).



شکل ۳ - اثر غلظت‌های مختلف تیمار TDZ و BAP بر روی شاخص پلاستوکرون سیب MM_{106} در شرایط کشت درون شیشه‌ای.

نتایج تعیین پروتیئن های محلول کل

نتایج تعیین پروتیین های محلول نشان داد که تیمار TDZ و BAP بر روی پایه سیب در سطح احتمال ۵ درصد معنی دار است. میزان پروتئین محلول کل در تیمار ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر TDZ و ۰/۶ میلی‌گرم در لیتر BAP بر روی سیب MM106 در مقایسه با تیمارهای دیگر به طور معنی‌داری بیشتر بود. کمترین نسبت محتوی پروتئین‌های محلول کل به تیمار ۰/۳ میلی‌گرم در لیتر BAP مربوط بود (شکل ۴).



شکل ٤ - اثر غلظت‌های مختلف تیمار BAP و TDZ بر محتوای پروتئین‌های محلول کل پایه MM_{106} در شرایط کشت درون شیشه‌ای.

جدول ۲ – اثر غلظت‌های مختلف TDZ و BAP بر روی صفات رویشی سیب MM_{106} در شرایط درون شیشه‌ای.

Table 2 - Effect of different concentrations of TDZ and BAP on vegetative traits of MM106 apple under in vitro condition.

تیمار Treatment (mg.L^{-1})	شاخص پلاستوکرون Plastocron index	وزن خشک Dry weight (g)	وزن تر Fresh weight (g)	طول شاخه Shoot length (cm)	قطر شاخه Shoot diameter (mm)	تعداد ریشه Root numbers	تعداد شاخه Shoot numbers
T_1	0.375	0.017	0.14	1.528	3.824	0	0.8
T_2	0.5	0.028	0.092	1.666	5.452	0	1
T_3	0.625	0.034	0.056	1.65	4.712	0	1.4
T_4	0.875	0.035	0.052	2.086	4.506	0	1.4
T_5	0.875	0.026	0.052	2.162	6.428	0.01	1.6
T_6	1.125[b]	0.038	0.056	2.198	6.272	0.03	2.2
T_7	0.875	0.038	0.052	2.502	5.48	1.02	3.6[a]
T_8	1.875[a]	0.066[a]	0.082[a]	2.094	5.854[a]	4.32[a]	3.2
T_9	0.75	0.052	0.075	2.886[a]	6.148	2.15	3.2

بحث

توسعه محیط کشت مناسب برای یک محصول ویژه می‌تواند کاملا پیچیده باشد، زیرا پاسخ به محیط کشت، در بیشتر مواقع وابسته به ژنوتیپ می‌باشد (Greenway et al., 2012. Ramage and Williams, 2002). قبلا نشان داده شده است که شاخه‌زایی پایه سیب M7 با کشت نوک ریز شاخه به عنوان ریزنمونه اولیه روی محیط کشت MS تغییر یافته (محیط کشت نیم غلظت MS که به آن ۰/۵ میلی گرم در لیتر BAP اضافه شده بود) تسریع و تحریک می گردد (Edwin and Paul, 1984). در این تحقیق نیز نتایج نشان داد که غلظت ۰/۴ میلیگرم در لیتر TDZ و ۰/۶ میلیگرم در لیتر BAP بیشترین میزان شاخص برگ و پرآوری را داشت.در پژوهشی با هدف بازازایی ریزنمونه‌های (Cydonia oblonga) با استفاده از سایتوکنین‌های مختلف، BAP کارایی کمتری در مقایسه با TDZ به منظور تحریک تولید جوانه‌های نابجا نشان داد (D'Onofrie and Morini., 2005). ازدیاد سیب گوشت سرخ در محیط کشت MS حاوی ۴ میکرومولار BAP و ریشه‌دار کردن ریزنمونه‌ها در محیط کشت MS ۱/۲ و فاقد ویتامین، حاوی ۳ میکرومولار IBA ، مسیر مناسبی جهت ریزازدیادی موفق سیب گوشت سرخ است (Kazemi et al., 2020). محیط کشت 2MS حاوی ۱ میلی گرم بر لیتر بنزیل آدنین با میانگین ۱۳/۶۶ ریزشاخه به ازای هر ریزنمونه، مطلوب‌ترین محیط برای برآوری سیب MM111 بود (حیات الغیثی و مظفری، ۲۰۱۹). غلظت‌های ۱ تا ۳ میلی‌گرم در لیتر هورمون BAP همراه با ۰/۰۱ تا ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر هورمون IBA، میزان بازازایی مطلوب‌تری نسبت به محیط‌های فاقد اکسین دارد. با افزایش غلظت سایتوکنین استفاده شده، میزان ضریب تکثیر بهبود می‌یابد و با توجه به طول ساقه گیاهچه‌ها و ضریب تکثیر آن، غلظت ۵ میلی گرم در لیتر برای ازدیاد گیاهچه‌ها مناسب‌تر است(صفرنژاد و همکاران، ۲۰۱۶). کاربرد سایتوکنین‌ها عموما یکی از راهکارهای ضروری برای پرآوری شاخه در کشت بافت گیاهان، پذیرفته شده است. برخی موارد استفاده از این تنظیم‌کننده‌های رشد، علاوه بر این که موجب افزایش هزینه در تولید تجاری می‌شود، همچنین باعث به وجود آمدن مشکلات فیزیولوژی از جمله شیشه‌ای شدن یا ویتریفیکاسیون (Vitrification) ، جارویی شدن گیاهچه‌ها و تولید کالوس‌های ناخواسته می‌شود. محققین گزارش کرده‌اند که در شرایط درون شیشه‌ای، افزایش غلظت سایتوکنین، باعث افزایش شاخه زایی در ارقام مختلف گلابی شده است (Karimp et al., 2013). تنظیم کننده‌های رشد از جمله سایتوکنین‌ها که یکی از مهمترین آنها TDZ است در تقسیم سلولی و برای القاء رویان‌زایی نقش ایفا می کنند(نادری و همکاران، ۲۰۲۰). آینسلی و همکاران در سال ۲۰۰۰ اثر تیدیازورون (TDZ) و ایندول بوتریک اسید (IBA) را بر بازازایی شاخساره نابجا از برگ‌های بالغ بادام در ازقام مختلف مورد بررسی قرار دادند. آنها بیشترین بازازایی (۴۴/۴ ٪) را برای Ne Plus Ultra با محیط کشت حاوی ۵ میلی‌گرم در لیتر TDZ و ۲ میلی‌گرم در لیتر IBA به دست آوردند (Ainsley et al., 2000).

٤. نتیجه‌گیری

با توجه به نتایج بدست آمده می‌توان گفت که محیط کشت مناسب برای شاخص پلاستوکرون MM106، ۰/۴ میلی‌گرم TDZ و ۰/۶ میلی‌گرم BAP (تعداد برگ با میانگین برگ ۱/۸۷) می‌باشد.

منابع

- حیات الغیثی، سید محمدحسین و مظفری. (۲۰۱۹). بررسی تاثیر نیتریک اکسید (NO) بر پرآوری و ریشه‌زایی MM_{111} و MM_{106} در شرایط درون شیشه‌ای. علوم باغبانی، ۳۳(۱)، ۶۵ – ۷۷.
- صفرنژاد, ع., عباس, علمداری, سیده بی‌بی لیلا, درودی, هادی و دلیر. (۲۰۱۶). بررسی اثر تنظیم‌کننده‌های رشد (BAP وIBA) بر باززایی، پرآوری و ریشه‌زایی گیاه گلابی نطنز با روش کشت در شیشه .زیست‌شناسی گیاهی ایران۹۰-۷۷، (۲۹)۸.
- صفرنژاد, ع., عباس, علمداری, سیده بی‌بی لیلا, درودی, هادی ,ودلیر. (۲۰۱۶). بررسی اثر تنظیم‌کننده‌های رشد (BAP و IBA) بر باززایی، پرآوری و ریشه‌زایی گیاه گلابی نطنز با روش کشت در شیشه .زیست‌شناسی گیاهی ایران. ۹۰ – ۷۷، (۲۹)۸.
- مشاری نصیرکندی, حسینی, فرخ زاد, ناصری و لطفعلی. (۲۰۱۹). بهینه سازی شرایط کشت بافت جهت ریزازدیادی پایه نیمه پاکوتاه سیب M7.مجله پژوهش‌های تولید گیاهی۱۳۷-۱۱۹، (۲)۲۵.
- مشاری نصیرکندی, حسینی, فرخزاد, ناصری, لطفعلی و آقایی. (۲۰۱۸). بهینه‌سازی شرایط کشت بافت برای ریزازدیادی پایه سیب MM111. پژوهش های میوه کاری ,۱۶-۱، (۲)۲.
- نادری بلداجی, حسین, دیانتی دیلمی, نوروزی, علی نیایی فرد, ساسان و علی. (۲۰۲۰). تأثیر طیف‌های نور و تنظیم کننده رشد تیدیازورون بر رویان‌زایی و سیستم فتوسنتزی ارکیده فالانوپسیس .مجله پژوهش‌های تولید گیاهی. ۲۰۶ – ۱۹۷، (۷)۲۷.

- Ainsley, P.J., G. Collins and M. Sedgley. 2000. Adventitious shoot regeneration from leaf explant of almond (Prunus dulcis Mill.). In Vitro Cell Dev. Biol. Plant. 36:470-474.
- Banilas, G. and Korkas, E. 2007. Rapid micropropagation of grapevine cv. Agiorgitiko through lateral bud development. Journal of Science and Technology, 42: 31-38.
- Brown, S. (2012). Fruit breeding, handbook of plant breeding. In M. L. Badenes and D. H. Byrne, (Eds), Fruit breeding (pp. 329-367). Berlin, Germany: Springer Science & Business Media.
- Cornille, A., Gladieux, P., Smulders, M. J., Roldan-Ruiz, I., Laurens, F., Le Cam, B., Nersesyan, A., Clavel, J., Olonova, M., Feugey, L. and Gabrielyan, I. (2012). New insight into the history of domesticated apple: Secondary contribution of the European wild apple to the genome of cultivated varieties. PLoS genetics, 8(5), e1002703.
- D'Onofrie, C. and Morini, S. 2005. Development of adventitious shoots from in vitro grown Cydonia oblonga leaves as influenced by different cytokinins and treatment duration.m Biol. Plant. 49: 1. 17-21.
- Edwin, R.F. and Paul, D.S. 1984. Plant propagation by tissue culture. Handbook and directory of commercial laboratories. First published. Exegetics Ltd. Eversley, Basingstoke. Hants. RG27 OQY, England, 709p.
- Gerdakaneh, M., Badakhshan, H., Mohamadi, M., and Arji, I. (2019). Effect of Different Media and Growth Regulators on Micropropagation of GF677. Plant Productions, 43(2), 241-254. [In Farsi]
- Greenway, M.B., Phillips, I.C., Lloyd, M.N., Hubstenberger, J.F. and Phillips, G.C. 2012. A nutrient medium for diverse applications and tissue growth of plant species in vitro. In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant. 48: 403-410.
- Ibanez, A., Valero, M. and Morte, A. 2005. Establishment and in vitro clonal propagation of the Spanish autochthonous table grapevine cultivar Napoleon: an improved system where proliferating cultures alternate with rooting ones. Anales de Biologia, 27: 211-220.
- Jhanji S., Setia R.C., Kaur N., Kaur P. and Setia N. 2012. Role of nitric oxide in cadmium-induced stress on growth, photosynthetic components and yield of Brassica napus L. Journal of Environmental Biology, 33:1027-1032.
- Kazemi, N., Amiri, M. E., Jaffarkhani Kermani, M., & Hosseini, Z. S. (2020). Optimizing micro propagation of red flesh apple genotype. Journal of Plant Productions (Agronomy, Breeding and Horticulture), 43(3), 337-348.
- Mahdavian, M., Bouzari, N. and Abdollahi, H. 2010. Effects of culture media and growth regulators on proliferation and rooting of vegetative Mahaleb (St. Lucie 64). Seed Plant Improve. J. 26: 1. 26-15. (In Persian).
- Nasib, A., Ali, K. and Khan, S. 2008. An optimized and improved method for the in vitro proparagation of Kiwifruit (Actinidia deliciosa) using coconut water. Pakistan. J. Bot. 40: 6. 2355-2360.
- Ramage, C.M. and Williams, R.R. 2002. Mineral nutrition and plant morphogenesis. In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant. 38: 116-124.

- Skiada, F., Grigoriadou, K. and Eleftheriou, E.P. 2010. Micropropagation of Vitis vinifera L. cv. Malagouzia and Xinomavro. Cen. Euro. J. Biol. 5: 6. 839-852.
- Tavallali V. and Rahemi M. 2007. Effects of Rootstock on Nutrient Acquisition by Leaf, Kernel and Quality of Pistachio (Pistacia vera L.). American-Eurasian Journal of Agricultural and Environmental Science, 2:240-246.

Improvement of basal multiplication of MM 106 apples using BAP and TDZ cytokines

Mahdieh Rezaei Tabar[1*] ،Mohammad Reaza Dadpour[2]
[*]1- MSc., Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz, Iran.
2- Associate Professor, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz, Iran.
[*]Email Address:m.rezaietabar@gmail.com

Introduction

Apple is one of the most important trees in temperate and cold regions, which has attracted many consumers due to its pleasant flavor and high economic value. Traditional apple micropropagation by methods such as cuttings and seed cultivation have disadvantages such as dispersal of traits, hard rooting, spending more time growing, over-consumption of chemical fertilizers, and contamination with a variety of pests and diseases. Glass has partially solved these problems and has created breeding plants, free from diseases and pests and high and strong growth rate. The apple tree (Malus x domestica L.) is one of the most important seed plants of the Rosaceae family in cold and temperate regions of the world. A number of apple varieties are used as a base, one of the most common of which is the MM106 rootstock due to its good compatibility with different apple cultivars. The study of apple characteristics in in vitro conditions has been considered by many researchers due to the precise control of environmental conditions. The use of cytokinins is generally accepted as one of the essential strategies for branch proliferation in plant tissue culture.

Methodology

The plant materials used in this study were prepared from the young and growing branches of three-year-old apple trees MM106 in Tabriz, Khalatpooshan Research Center of Tabriz University. The prepared branches were transferred to the laboratory with a length of 15 to 20 cm and were divided into small pieces of 1 to 1.5 cm, in which there was at least one bud in each cut piece. After disinfection, the specimens were branched under the hood with a binocular loop. Murashig Skog (MS) basal culture medium was used in this study. Explants are the most important source of infection in plant tissue culture. The disinfection step is performed to remove most bacterial and fungal infections. After splitting into smaller pieces, the young shoots were washed with running water for 5 minutes and then disinfected with 2% sodium hypochlorite for 20 minutes and 70% ethanol for 5 minutes and then sterilized 3 times with distilled water. Laminar hoods were washed. After disinfection under the hood and using binocular loops, the explants were cultured at the tip of the branch and the buds were transferred to the culture medium containing MS and growth regulators after scaling. The number of shoots per experimental unit indicating fertility was obtained by counting emerging lateral shoots.Bradfor method was used to determine the concentration of total soluble proteins. In this method, first 0.5 g of each leaf sample was crushed and crushed by liquid nitrogen in a Chinese mortar and then 50 mg of polyvinyl pyrrolidone (PVP) was added to each sample. Then 1.5 ml of potassium phosphate buffer (pH = 7) containing sodium metabisulfide (0.019 g per 100 ml of buffer) was added and the contents of the mortar were transferred to 2 ml microtubes and placed in a refrigerated centrifuge at 15000 rpm. Minutes at 4 ° C for 20 minutes. The samples were then slowly removed from the refrigerator and 500 µl of the top phase of the extract was mixed with 175 µl of 50% glycerol and the resulting solution was transferred to 2000 µl microtubes and stored in a freezer at -80 ° C. To read the protein adsorption reading, 20 µl of the extract was mixed with 500 µl of Bradford solution and 2 minutes after adding the extract to the Bradford solution were read using a spectrophotometer based on spectroscopy at 595 nm. Factorial experiment was performed based on a completely randomized design. The number of roots per experimental unit, which indicates the percentage of rooting, was obtained by counting emerging roots. The diameter of the branches was measured using a digital caliper and the measurements were expressed in millimeters. The length of the branches was measured using a ruler and the sizes were expressed in centimeters and then recorded using data analysis software. The fresh weight of the samples was measured on a scale of

three zeros after being taken out of the culture medium, then to determine the dry weight, it was transferred to a dryer containing infrared light (to preserve the material and color of the sample) and measured using a scale. Calculations were performed by SPSS statistical software at a probability level of 5% and graphs were drawn by Excel software.

Conclusion

This study studied the effect of BAP and TDZ cytokines on proliferation and creating a suitable environment for MM106 apple tissue culture in a completely randomized design with three replications. Each experimental replicate consisted of five planted branch tips. After collecting the samples from the apple orchards of Khalatpooshan Research Station and disinfecting them with 70% ethanol, the microsamples were transferred to MS medium containing two concentrations of 0.5 and 0.6 mg BAP and 0.2 and 0.4 mg TDZ. The results showed that the suitable culture medium for Plastochron MM106 index was 0.4 mg TDZ and 0.6 mg BAP (number of leaves with average leaf 1.87). The effect of TDZ and BAP treatment on MM106 apples was significant at 1 and 5% probability levels, respectively. The highest fertility index was 0.4 mg / l TDZ and 0.3 mg / l BAP and the lowest fertility index belonged to the control (Figure 2). In this experiment, the leaves formed per shoot were counted in seven-day time sequences for 2 months. Plastocron index or time required for the emergence of each leaf, which indicates the degree of fertility and organ production. The results showed that the effect of TDZ and BAP treatment on MM106 apple was significant at 5% probability level. The highest amount of plastocron index was 0.4 mg / l TDZ and 0.6 mg / l BAP and the lowest selectivity index belonged to the control (Figure 3). The results of determination of soluble proteins showed that TDZ and BAP treatment on apple rootstock was significant at 5% probability level. The amount of total soluble protein in the treatment of 0.2 mg / l TDZ and 0.6 mg / l BAP on MM106 apple was significantly higher compared to other treatments. The lowest ratio of total soluble protein content was related to the 0.3 mg / L BAP treatment (Figure 4).

Keywords

Growth regulators; Processing; Apple MM_{106}; Tissue culture