

اثر غلظت‌های مختلف اکسین و سایتوکینین، محیط کشت پایه و کیفیت نور بر

شاخه‌زایی از پینه قطعه‌های برگ‌ی دورگه هلو × بادام "HS314"^۱

Effect of Different Auxin and Cytokinin Concentrations, Basal Medium and Light Quality on Shoot Induction Using Callus of Leaf Segments in Peach×Almond Hybrid, HS314

جلیل دژم پور^{*}، فاطمه آقاچانی کلجاهی، علیرضا مطلبی آذر و حسین فتحی^۲

چکیده

به‌منظور بررسی اثر غلظت‌های مختلف اکسین و سایتوکینین روی شاخه‌زایی دورگه هلو × بادام "HS314" از قطعه‌های برگ‌ی گیاهچه‌های درون شیشه‌ای استفاده شد. قطعه‌های برگ‌ی روی محیط کشت طراحی شده برای بادام (AP) دارای چهار غلظت تیدیاژورون (TDZ) (۳، ۶، ۹ و ۱۲ میلی‌گرم در لیتر) در ترکیب با دو غلظت IBA (صفر و ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر) کشت گردید. در همه تیمارها پینه‌زایی دیده شد اما شاخه‌زایی تنها در محیط کشت AP دارای ۱۲ میلی‌گرم در لیتر TDZ و ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر IBA دیده شد. همچنین اثر نور سرخ نیز مورد بررسی قرار گرفت. به این منظور از دو محیط کشت موراشیک و اسکوک (MS) و گیاهان چوبی (WPM) دارای دو غلظت، صفر و ۱ میلی‌گرم در لیتر IBA در ترکیب با ۱۲ میلی‌گرم در لیتر TDZ و دو طیف نوری (سفید و سرخ) استفاده شد و مشخص شد که در هر دو محیط کشت با ۱ میلی‌گرم در لیتر IBA شاخه‌زایی غیر مستقیم اتفاق می‌افتد. شمار گیاه باززایی شده از برهمکنش محیط کشت و طیف نوری و نیز مقدار ۱ میلی‌گرم در لیتر IBA متاثر شد. بنابراین استفاده از محیط کشت MS در شرایط نور سرخ و یا WPM در شرایط نور سفید (حضور ۱ میلی‌گرم در لیتر IBA و ۱۲ میلی‌گرم در لیتر TDZ) برای باززایی از قطعه‌های برگ‌ی بهترین نتیجه را دادند.

واژه‌های کلیدی: باززایی، پایه درختان میوه، تنظیم کننده گیاهی، پینه‌زایی.

مقدمه

به علت اهمیت بسیار بالایی که پایه در ویژگی‌های رویشی و زایشی و در عمر اقتصادی درختان هسته‌دار دارد، پژوهش‌های بسیار گسترده‌ای برای دستیابی به به‌نژادی پایه‌های مناسب از راه تلاقی بین گونه‌ای در جنس *Prunus* انجام گرفته است (۱۰، ۲۵). اولین برنامه به‌نژادی در این زمینه معرفی دورگه طبیعی هلو × بادام است که توسط گراسلی و همکاران در فرانسه صورت گرفته است. در حال حاضر نیز از راه کشت بافت در سطح تجاری افزایش و از آن استفاده می‌شود (۱). اولین پژوهش‌های کشت درون شیشه‌ای پایه GF677 (هلو × بادام) توسط بتاکینیک و کستر انجام شد که توانستند با تغییرهایی در محیط کشت Knop، نمونه‌های گیاهی را کشت و

۱- تاریخ دریافت: ۹۵/۹/۱۷

تاریخ پذیرش: ۹۷/۲/۱۹

۲- به‌ترتیب دانشیار مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی استان آذربایجان شرقی، کارشناس ارشد بیوتکنولوژی، مجتمع علوم پایه و کشاورزی، دانشگاه پیام نور تهران شرق، دانشیار گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز و پژوهشگر مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی استان آذربایجان شرقی، تبریز، ایران.
* نویسنده مسئول، ایمیل: (dejampour@yahoo.com).

شاخه‌زایی نمایند (۱۰).

دورگه HS314 در ایستگاه پژوهشی باغبانی سهند تبریز از بین دورگه‌های بین بادام (*Prunus amygdalus* B.) و هلو (*P. persica* L.) گزینش شده است. این دورگه دارای قدرت رشد بالا و سازگاری اقلیمی بسیار خوب و دارای گل‌های کامل با قدرت باروری ۱۰ تا ۱۵٪ بوده، با این حال میوه آن‌ها غیرخوراکی می‌باشد (۱، ۱۱). توانایی ریشه‌زایی این دورگه در محیط درون شیشه‌ای و برون‌شیشه‌ای بیشتر از پایه استاندارد GF677 می‌باشد. نتیجه پژوهش‌ها نشان داده است که از دید ژنتیکی دورگه HS314 در مقایسه با دیگر نژادگان‌ها، قابلیت بیشتری برای افزایش درون شیشه‌ای دارد، به‌طوری که حتی از پایه GF677 بهتر عمل کرده است (۲، ۱۱، ۲۵). همچنین دژم پور و همکاران (۱۰) نشان دادند که تحمل به شوری این دورگه نسبت به GF677 بیشتر می‌باشد.

نوع و غلظت تنظیم‌کننده‌های رشد از مهم‌ترین عامل‌هایی هستند که بر مقدار شاخه‌زایی تاثیر می‌گذارند (۸). برای شاخه‌زایی در *Prunus* از BAP^۱، Kin^۲، Zeatin^۳ و Zip^۴ استفاده شده است اما شمار شاخه تولیدی به ازای هر ریز نمونه به نسبت پایین گزارش شده است (۱۷). برخی از آزمایش‌ها نشان داده است که TDZ^۵ نسبت به BAP در باززایی شاخه کارا تر است (۷، ۲۱، ۲۲). در باززایی از برگ گیلاس (۱۲) نیز از تیدپازورون استفاده شده است. با این حال تانگ و همکاران (۲۴) و نیز جنتیل و همکاران (۱۳) بیان کردند که به‌کارگیری BAP برای باززایی شاخه از قطعه‌های برگ گیلاس، آلبالو و هلو کارا تر از TDZ است. همچنین BAP برای باززایی درون‌شیشه‌ای از قطعه‌های برگ در دیگر گونه‌های *Prunus* به‌کار رفته است (۶) که نشانگر وابستگی ریخت‌زایی به نوع رقم و مقدار BAP می‌باشد. آینسلی و همکاران (۴) از TDZ و BAP به‌طور موفقیت آمیزی برای انگیزش شاخه نابه‌جا در بادام استفاده کردند. پرتورنر و بورگوس (۲۰) نشان دادند که بهترین درصد باززایی از قطعه‌های برگ زردآلو در حضور TDZ و NAA^۵ به‌وجود آمده شده است. تشکیل شاخه نابه‌جا به‌طور معنی‌داری زیر تاثیر نوع و غلظت اکسین است. به‌طوری که IBA و NAA گسترش جوانه نابه‌جا را در بادام بهبود بخشیدند (۳). بگوات و لان (۷) توانستند در قطعه‌های برگ گیلاس، شاخه‌زایی را در محیط کشت دارای NAA و TDZ به‌دست آورند. مطلبی آذر و همکاران (۱۹) در پژوهش شاخه‌زایی از قطعه‌های برگ پایه GF677 نشان دادند که قطعه‌های برگ مستعد تولید پینه بوده و در بیشتر تیمارهای دارای اکسین و سایتوکینین پینه‌زایی دیده شد که با انتقال آن‌ها به محیط کشت دارای غلظت‌های بالای TDZ و در حضور IBA^۶ شاخه‌زایی اتفاق افتاد.

با توجه به چند ساله بودن تولید دورگه‌های هلو-بادام و از سوی دیگر، استفاده از فناوری زیستی، تولید نژادگان‌های جدید را سرعت بخشیده و باعث گسترده شدن خزانه ژنی قابل دسترس برای به‌نژادی پایه‌های درختان میوه شده است (۱)، بنابراین گسترش روش‌های کارآمد باززایی گیاه لازم و ضروری می‌باشد، چون باززایی قابل اطمینان از بافت‌های بالغ پیش‌نیازی برای کاربرد روش‌های انتقال ژن برای به‌نژادی پایه‌های درختان میوه می‌باشد (۱۴). با توجه به این‌که تاکنون در زمینه شاخه‌زایی از قطعه‌های برگ HS314 پژوهشی انجام نشده است بنابراین، در این پژوهش سعی شده است که با استفاده از تیمارهای اکسین و سایتوکینین، باززایی غیر مستقیم گیاه کامل از قطعه‌های برگ گیاهان درون‌شیشه‌ای، انجام شود.

مواد و روش‌ها

برگ‌ها از گیاهچه‌های درون‌شیشه‌ای که در محیط کشت پایه DKW با ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP، ۵ میلی‌گرم لیتر GA₃ و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر IBA در آزمایشگاه کشت بافت پژوهشکده بیوتکنولوژی شمال غرب

۴- Thidiazuron

۳- 6-(γ,γ-Dimethylallylamino)purine

۲- Kinetin

۱- Benzylamino purine

۶- Indolebutyric acid

۵- Naphthaleneacetic acid

در تبریز نگهداری می‌شدند، تهیه شده و به قطعه‌های تقریبی ۰/۵ الی ۱ سانتی‌متری بریده شد. سپس از قسمت پشت به پتری‌دیش‌های دارای محیط کشت AP (۳) دارای ۴ غلظت TDZ (۳، ۶، ۹ و ۱۲ میلی‌گرم در لیتر) در ترکیب با ۲ غلظت IBA (صفر و ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر) (محیط کشت شاخه‌زایی) انتقال داده شدند. کشت‌ها در شرایط تاریکی و دمای 24 ± 2 درجه سلسیوس به مدت ۱ ماه نگهداری شدند و سپس به مدت ۱ ماه در شدت نور ۹۰ میکرومول بر متر مربع در ثانیه نگهداری شدند. نمونه‌ها از دید باززایی مورد بررسی قرار گرفتند، همچنین درصد پینه‌زایی و قطر پینه نمونه‌ها اندازه‌گیری شد.

به دلیل تولید شاخه در محیط کشت AP دارای ۱۲ میلی‌گرم در لیتر TDZ و ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر IBA، آزمایش بعدی برای مقایسه تاثیر دو نوع محیط کشت MS و WPM (با ۱۲ میلی‌گرم در لیتر TDZ) و دو غلظت IBA (صفر و ۱ میلی‌گرم در لیتر) و تاثیر نوع نور (سفید بدون فیلتر و سرخ تامین شده با فیلتر سرخ) بر باززایی رقم مورد نظر انجام گرفت. برای این منظور پس از کشت قطعه‌های برگ‌ی در محیط‌های کشت مربوط، نیمی از کشت‌ها در شرایط تاریکی و دمای 24 ± 2 °C به مدت یک ماه نگهداری و سپس برای یک ماه دیگر در شرایط نور سفید (با شدت ۴ کیلو لوکس) قرار گرفتند و دیگر نمونه‌ها در شرایط نور سرخ قرار گرفت. بعد از یک ماه قطر پینه، درصد پینه‌زایی، شمار پینه دارای شاخه و شمار شاخه تولیدی به ازای هر پینه اندازه‌گیری شدند. سپس زیرکشت نمونه‌ها به همان محیط‌های کشت پیشین انجام یافت. بعد از ۳۰ روز درصد شاخه‌زایی و شمار گیاه باززایی شده اندازه‌گیری شد. شاخساره‌های به وجود آمده به محیط کشت MS بدون هورمون با ۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر کازئین هیدرولیز شده و ۱ میلی‌گرم در لیتر GA₃ انتقال داده شد.

در هر دو مرحله، از آزمایش فاکتوریل در قالب طرح به‌طور کامل تصادفی با ۴ تکرار استفاده شد. در هر پتری‌دیش ۱۰ ریزنمونه برگ‌ی قرار داده شد. برای واکاوی ویژگی‌های اندازه‌گیری شده از نرم افزار SPSS ویرایش ۱۹ و برای مقایسه میانگین‌ها از آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ۵٪ استفاده شد.

نتایج و بحث

نتیجه آزمایش اول

در آزمایش اول از محیط کشت AP دارای غلظت‌های مختلف TDZ (۳، ۶، ۹ و ۱۲ میلی‌گرم در لیتر) و IBA (صفر و ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر) برای پینه زایی و باززایی شاخه از قطعه‌های برگ‌ی استفاده شد. پینه‌زایی از ریزنمونه‌های برگ‌ی پس از ۷ تا ۱۰ روز شروع شد و پینه‌های تولیدی در یک ماه رشد کردند (شکل ۱). نتیجه‌های به‌دست آمده از داده‌های درصد پینه‌زایی نشان دادند که در هر چهار غلظت TDZ در نبود IBA پینه‌زایی دیده شد. بیشینه مقدار تولید پینه در محیط کشت دارای تنها ۳ میلی‌گرم در لیتر TDZ دیده شد (۵۰٪) و با افزایش مقدار TDZ درصد پینه‌زایی کاهش و در ۱۲ میلی‌گرم در لیتر TDZ درصد پینه‌زایی به کمینه رسید (۱۰٪). این نتیجه‌ها نشان داد که برای پینه‌زایی از قطعه‌های برگ‌ی دورگه هلو × بادام HS314 نیازی به حضور اکسین نبوده و پینه‌زایی در حضور سایتوکینین نیز امکان پذیر می‌باشد. بنابراین به‌نظر می‌رسد که مقدارهای اکسین داخلی در پینه تولیدی از قطعات برگ‌ی تولید می‌شود (شکل ۱). پینه‌زایی از قطعه‌های برگ‌ی افزون بر این‌که به نژادگان گیاه مادری وابسته است به غلظت هورمون‌های داخلی و خارجی بستگی داشته و در اندک پژوهش‌های انجام شده، کارا بودن سایتوکینین به تنهایی در پینه‌زایی به اثبات رسیده است (۱۲، ۱۹).

نتیجه‌های به‌دست آمده از تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که پینه‌زایی از قطعه‌های برگ‌ی زیر تاثیر غلظت‌های مختلف TDZ، IBA و برهمکنش آن‌ها قرار نگرفت. این امر از این پدیده ناشی می‌شود که در همه تیمارها پینه‌زایی اتفاق افتاده و به‌طور میانگین ۳۰٪ پینه‌زایی در همه نمونه‌ها دیده شد، به عبارت دیگر نیازهای هورمونی برای پینه‌زایی توسط همه ترکیب‌های تیماری تامین شده است (۱۰). گزینش یکی از این تیمارها بی‌شک وابسته به این خواهد بود که در کدامیک از تیمارها شاخه‌زایی بهینه‌ای دیده شود. پینه‌های تولیدی در محیط کشت مربوط

رشد کردند. داده‌های به‌دست آمده از قطر پینه در محیط‌های کشت دارای TDZ و بدون IBA نشان داد که حضور TDZ برای رشد پینه کافی است. در این زمینه قطر پینه از ۳/۸ الی ۹/۶ میلی‌متر متغیر بود. بیشینه قطر پینه مربوط به ۳ میلی‌گرم در لیتر TDZ و کمینه آن در ۱۲ میلی‌گرم در لیتر TDZ دیده شد. این بدان معنی است که با افزایش غلظت TDZ از رشد پینه تا حدودی کاسته می‌شود اما به صفر نمی‌رسد. در محیط‌های کشت دارای غلظت‌های مختلف TDZ و دارای ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر IBA رشد پینه به‌نسبت میانگین بوده و بیشینه آن در غلظت ۹ میلی‌گرم در لیتر TDZ و ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر IBA دیده شد (۸/۹ میلی‌متر). این امر نشان داد که امکان رشد پینه در حضور هر دو هورمون نیز وجود دارد. این یافته با نتیجه‌های به‌دست آمده از رشد پینه در پایه GF677 مطابقت دارد (۱۹).

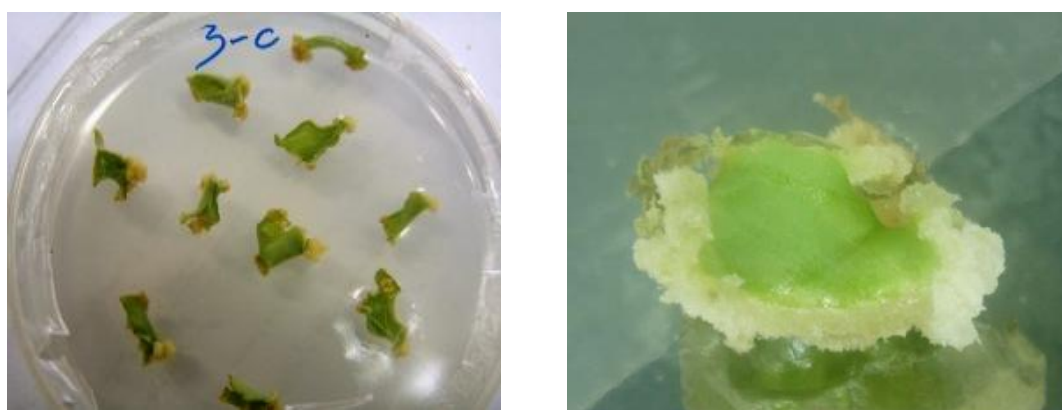


Fig. 1. Callus initiation in callus induction medium using leaf disk explants.

شکل ۱- پیدایش پینه در محیط کشت پینه‌زایی از ریزنمونه‌های قرص برگ.

نتیجه‌های به‌دست آمده از تجزیه واریانس داده‌های مربوط به قطر پینه نشان داد که اثر غلظت‌های مختلف TDZ و IBA و برهمکنش بین آن‌ها روی قطر پینه معنی‌دار نبوده و این امر بیانگر این نکته است که امکان رشد پینه در همه تیمارها وجود دارد. بنابراین برای رشد پینه می‌توان ۳ میلی‌گرم در لیتر TDZ را بدون افزودن IBA به عنوان یک تیمار بهینه در نظر گرفت.

با این حال با توجه به این‌که هدف پایانی از این آزمایش شاخه‌زایی از قطعه‌های برگ است و از سوی دیگر امکان رشد پینه در همه تیمارها وجود داشت بنابراین انتخاب تیماری که باعث رشد بهتر پینه شود منوط به این خواهد بود که تیمار مورد نظر باعث شاخه‌زایی از پینه شود.

پس از یک ماه، یادداشت‌برداری از شاخه‌های تولیدی انجام شد و داده‌های به‌وجود آمده نشان داد که شاخه‌زایی تنها روی محیط کشت AP دارای ۱۲ میلی‌گرم در لیتر TDZ و ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر IBA مشاهده شد. با توجه به این‌که دیگر تیمارها قادر به شاخه‌زایی نبودند، بنابراین به‌نظر می‌رسد که می‌توان تیمار یاد شده را مبنایی بر بهینه سازی شرایط شاخه‌زایی در نظر گرفت.

نتیجه‌های آزمایش دوم

در آزمایش دوم، نوع محیط کشت پایه تاثیر معنی‌داری روی قطر پینه نداشت و به‌طور میانگین قطر پینه ۱۱/۲۵ میلی‌متر در محیط‌های کشت MS و WPM دیده شد. دو غلظت IBA و وضعیت نوری تاثیر معنی‌داری بر قطر پینه داشتند ($P \leq 0.05$) با این حال برهمکنش IBA × محیط کشت پایه و محیط کشت پایه × نور و IBA × نور معنی‌دار نبود. این در حالی است که برهمکنش محیط کشت پایه × IBA × نور تاثیر معنی‌داری بر قطر پینه داشت ($P \leq 0.05$). همان‌طوری که در شکل ۲ دیده می‌شود، محیط‌های کشت بدون IBA از کمینه قطر پینه در دو

نوع محیط کشت پایه و در دو نوع وضعیت نوری برخوردار بودند. این در حالی است که در محیط‌های کشت دارای ۱ میلی‌گرم در لیتر IBA قطر پینه در هر دو نوع آن و دو نوع وضعیت نوری برابر و بیشینه بودند. بنابراین رشد پینه زیر تاثیر غلظت IBA قرار گرفته است و نوع محیط کشت پایه و وضعیت نوری تاثیر معنی‌داری بر قطر پینه نداشته است. در این رابطه، آینسلی و همکاران (۲) و مطلبی آذر و همکاران (۱۹) تشکیل پینه را پس از ۷ تا ۱۰ روز، روی سطح رگبرگ اصلی قطعه‌های برگ‌گی گزارش کردند. مقدارهای کمتر از یک میلی گرم بر لیتر اکسین، باعث تولید پینه نرم با ریخت آبی شد در حالی‌که در غلظت‌های بالاتر از یک میلی گرم بر لیتر، پینه گره‌دار دیده شد. در این پژوهش پینه‌زایی در محیط کشت دارای 2,4-D و IAA دیده نشد. افزون بر این، در قطعه‌های منشا گرفته از قسمت انتهایی برگ، تولید پینه ضعیف بوده و هیچ جوانه ناب‌جایی نیز تشکیل نشد.

درصد شاخه‌زایی

نوع محیط کشت پایه تاثیر معنی‌داری بر درصد شاخه‌زایی نداشت و به‌طور میانگین درصد شاخه‌زایی در محیط کشت MS ۱۸/۵۵٪ و در محیط کشت WPM ۱۵/۱۸٪ دیده شد. دو غلظت IBA تاثیر معنی‌داری بر درصد شاخه‌زایی پینه‌ها داشتند ($P \leq 0.05$) و با این که وضعیت نوری به تنهایی تاثیری بر شاخه‌زایی نداشت ولی برهمکنش محیط کشت $\times$ نور بر درصد شاخه‌زایی معنی‌دار بود ($P \leq 0.05$). این در حالی است که برهمکنش محیط کشت $\times$ IBA و IBA $\times$ نور و نیز اثرهای سه‌گانه محیط کشت پایه $\times$ IBA $\times$ نور بر شاخه‌زایی معنی‌دار نبود.

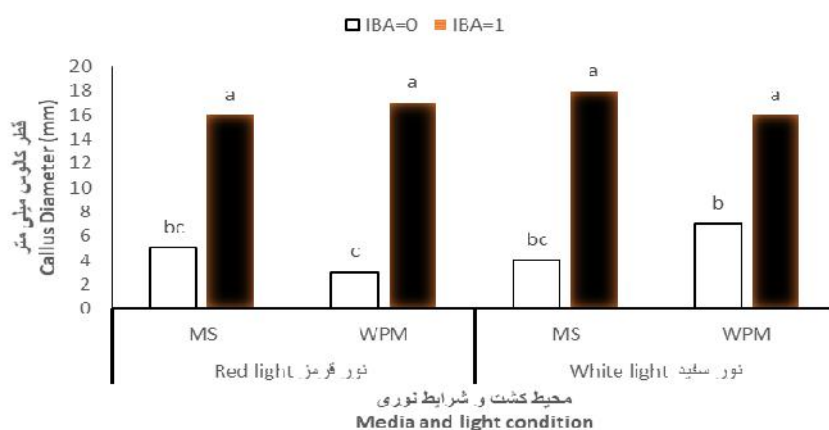


Fig. 2. Mean of callus diameter in two media, two light conditions and two concentrations of IBA
 شکل ۲- میانگین قطر پینه در دو نوع محیط کشت، دو شرایط نوری و دو غلظت IBA.

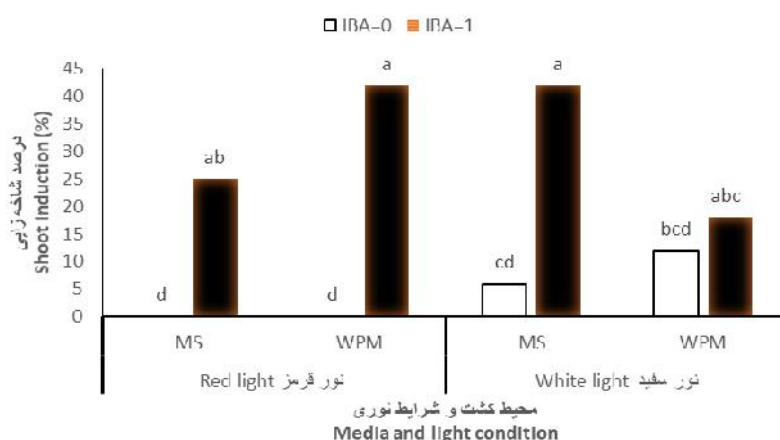


Fig. 3. Mean of shoot regeneration in two media, two light conditions and two concentrations of IBA.
 شکل ۳- میانگین شاخه‌زایی در دو نوع محیط کشت، دو شرایط نوری و دو غلظت IBA.

همان‌طور که در جدول ۱ دیده می‌شود در نبود IBA درصد شاخه‌زایی ناچیز می‌باشد (۲٪) در حالی که با افزودن ۱ میلی‌گرم در لیتر به محیط کشت، درصد شاخه‌زایی افزایش زیادی نشان داده است و صرف‌نظر از محیط کشت و وضعیت نوری، ۳۰٪ شاخه‌زایی در ریز نمونه‌های قطعه‌های برگ‌ی دیده شد. این امر نشان داد که افزودن بر TDZ لازم است محیط کشت دارای یک اکسین ضعیف نیز باشد. پژوهش‌های متعددی در مورد مفید بودن استفاده از اکسین در غلظت‌های کم روی شاخه‌زایی انجام شده است. میژوتل و همکاران (۱۸) در یک رقم پوست سخت بادام تمایز شاخه نابه‌جا را در ۳ نوع اکسین IBA، IAA و 2,4-D بررسی کردند و گزارش نمودند که مقدارهای بالای ۲/۵ میلی‌مول اکسین باعث کاهش یا مانع باززایی می‌شود. چنین اثرهای مشابه در سیب (۱۲) و پایه‌های گیلان (۱۵) نیز دیده شده است. رقم‌های پوست کاغذی بادام می‌توانند در برابر افزایش مقدارهای اکسین مقاومت کرده و در مقدارهای بالای اکسین هم شاخه‌زایی کنند (۳).

همان‌طور که در شکل ۳ دیده می‌شود در هر دو نوع محیط کشت پایه و در هر دو وضعیت نوری شاخه‌زایی از پینه انجام شده است به‌طوری که درصد شاخه‌زایی از ۹/۳۸ تا ۲۳٪ متغیر بود. با این حال درصد شاخه‌زایی از نوع محیط کشت پایه و وضعیت نوری متاثر شد. به‌طوری که بیشینه درصد شاخه‌زایی در محیط کشت MS با نور سفید و در محیط کشت WPM در نور سرخ صورت گرفت و این دو تیمار اختلاف معنی‌داری با هم نشان ندادند. این در حالی است که کمینه درصد شاخه‌زایی در محیط کشت MS در نور سرخ و در محیط کشت WPM در نور سفید دیده شد، به‌طوری که بین دو تیمار اختلاف معنی‌داری دیده نشد.

جدول ۱- میانگین شاخه‌زایی، شمار گیاه باززایی شده و شمار شاخه در پینه (زیرکشت اول) در دو غلظت IBA.
Table 1. Mean of shoot regeneration, number of regenerated plants and number of shoots per callus in two concentrations of IBA.

شاخه‌زایی Shoot induction (%)	شمار شاخه تولیدی در هر پینه Number of produced shoots per callus	شمار گیاه باززایی شده Number of regenerated plants	غلظت IBA IBA Concentrations (mg L ⁻¹)
2.08 ± 1.09 b	0.04 ± 0.011 b	0.33 ± 0.12 b	0
27.95 ± 2.21 a	1.14 ± 0.52 a	9.25 ± 1.37 a	2

*Means in each column followed by the same letter are not significantly different ($P \leq 0.05$).

*میانگین‌های هر ستون که دارای حرف‌های یکسانی هستند از نظر آماری با یکدیگر تفاوت معنی‌داری ندارند ($P \leq 0.05$).

این امر نشان می‌دهد که درصد شاخه‌زایی وابسته به وضعیت نوری و محیط کشت بوده و برای به دست آوردن بیشینه شاخه‌زایی لازم است که بسته به نوع محیط کشت از نور مناسب استفاده شود. با توجه به این که محیط کشت MS نسبت به محیط کشت WPM فراگیرتر می‌باشد، بنابراین به‌نظر می‌رسد که برای به دست آوردن شاخه‌زایی مناسب، بهتر است که از محیط کشت MS و نور سفید (که به‌راحتی قابل تولید می‌باشد) استفاده شود. با این حال تصمیم‌گیری در مورد استفاده از محیط کشت MS یا محیط کشت WPM می‌تواند وابسته به دیگر ویژگی‌هایی که در ادامه عنوان خواهد شد، باشد. چرا که ممکن است درصد شاخه‌زایی محیط کشت MS (با نور سفید) و محیط کشت WPM (با نور سرخ) برابر باشند. بنابراین محیط کشتی ممکن است در پایان پیشنهاد شود که از شمار شاخه تولیدی بیشتری در هر پینه برخوردار باشد.

با توجه به این که برهمکنش سه گانه محیط کشت × IBA × نور معنی‌دار نبوده ولی برهمکنش محیط کشت ×

نور معنی‌دار می‌باشد، می‌توان نتیجه گرفت که مفید بودن IBA وابسته به نوع محیط کشت پایه و وضعیت نوری نمی‌باشد. با توجه به این‌که گزارشی در مورد اثر وضعیت نوری بر شاخه‌زایی گزارش نشده است بنابراین به‌نظر می‌رسد که استفاده از IBA در هر دو نوع محیط کشت و هر دو نوع وضعیت نوری می‌تواند در بهبود درصد شاخه‌زایی مفید واقع شود. چون در محیط کشت MS بدون IBA در هر دو وضعیت نوری درصد شاخه‌زایی ناچیز (۳٪) می‌باشد. افزون بر این در محیط کشت WPM در نبود IBA و در هر دو نوع وضعیت نوری شاخه‌زایی از پینه دیده نشد. بنابراین برای به دست آوردن بیشینه درصد شاخه‌زایی از پینه به‌وجود آمده از قطعه‌های برگ استفاده از IBA لازم و ضروری است و بایستی برای بهینه سازی مقدار IBA آزمایش‌های دیگری نیز انجام پذیرد.

شمار شاخه در هر پینه

یکی از معیارهای موفقیت تیمارهای به کار برده شده، بررسی داده‌های به‌وجود آمده از شمار شاخه تولیدی در هر پینه می‌باشد و در موارد بسیاری دیده شده است که درصد شاخه‌زایی یک تیمار پایین بوده اما شمار شاخه‌های تولیدی در هر پینه بالا می‌باشد. در این پژوهش شمار شاخه تولیدی در هر پینه به عنوان یکی از ویژگی‌های مهم یادداشت‌برداری و واکاوی شده است. نتیجه‌های تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که نوع محیط کشت تاثیر معنی‌داری روی شمار شاخه تولیدی در هر پینه نداشت، این در حالی است که اختلاف معنی‌داری بین دو غلظت IBA از دید شمار شاخه تولیدی در هر پینه دیده شد ($P \leq 0.05$). با این حال وضعیت نوری به تنهایی تاثیر معنی‌داری روی این ویژگی نداشت. از سوی دیگر برهمکنش محیط کشت پایه $\times$ IBA و $\times$ نور روی این ویژگی معنی‌دار نبود. با این حال شمار شاخه تولیدی در هر پینه به طور معنی‌داری از برهمکنش نور $\times$ محیط کشت پایه متاثر شد ($P \leq 0.05$).

همانطور که در جدول ۱ دیده می‌شود، محیط‌های کشت بدون IBA افزون بر این که از درصد شاخه‌زایی پایینی برخوردار بودند، شمار شاخه کمتری نیز در هر پینه تولید کردند به عبارت دیگر در نبود IBA به غیر از محیط کشت MS و نور سفید که در آن شاخه‌زایی ۶٪ بوده و به‌طور میانگین از هر ۱۰ پینه یک پینه شاخه‌زایی کرده و دارای یک شاخه بود، در بقیه تیمارها در محیط‌های کشت بدون IBA شاخه‌زایی روی پینه‌های تولیدی دیده نشد. این در حالی است که در صورت افزودن ۱ میلی‌گرم در لیتر IBA به محیط‌های کشت مورد بررسی، افزون بر افزایش درصد شاخه‌زایی، کمینه یک شاخه در هر پینه تولید شد و این امر نشان داد که شمار شاخه تولیدی روی پینه به شدت تحت تاثیر استفاده از IBA قرار می‌گیرد. در پژوهش آینسلی و همکاران (۲) با استفاده از IBA، باززایی ۱۶/۶٪ نسبت به NAA بیشتر بود. با این حال هیچ باززایی شاخه در حضور 2,4-D دیده نشد. غلظت‌های IBA (۴ تا ۲۴ میلی مول در لیتر) و NAA (۵ تا ۱۰ میلی مول در لیتر) گسترش جوانه نابه‌جا را در رقم نون پاریل اولترا در بادام بهبود بخشید در حالی‌که در نون پاریل، IBA در غلظت‌های ۰/۵ تا ۹/۸ میلی مول در لیتر کارا بود. در صورت استفاده از دومیلی گرم در لیتر IBA بیشینه باززایی در یلدا، ۱۹٪ و در نون پاریل ۵٪ بود.

بررسی تاثیر همزمان نوع محیط کشت پایه و وضعیت نوری نشان داد که یک برهمکنش قوی بین نوع محیط کشت و وضعیت نوری وجود دارد به‌طوری که بیشینه شمار شاخه در هر پینه در محیط کشت WPM و نور سرخ دیده شد (به ازای هر ۱۰ پینه ۱۳ شاخه تولید شد) و این تیمار به‌طور معنی‌داری شمار شاخه بیشتری نسبت به دیگر تیمارها داشت. در محیط کشت MS شمار شاخه در هر پینه در هر دو وضعیت نوری اختلاف معنی‌داری با هم نشان نداده و برابر بودند و به‌نظر می‌رسد که در صورت استفاده از محیط کشت MS استفاده از نور سفید و در صورت فراهم بودن شرایط نور سرخ استفاده از محیط کشت WPM می‌تواند در بهبود درصد شاخه‌زایی با بهینه سازی دیگر عامل‌ها، کارا واقع شود. در محیط کشت MS (نور سفید یا نور سرخ) به طور میانگین به ازای

هر ۱۰ پینه ۵ شاخه تولید شد که نسبت به گزارش‌های مطلبی آذر و همکاران (۱۹) روی پایه GF677 از شمار شاخه بیشتری برخوردار است. با این حال در محیط کشت WPM شمار شاخه تولیدی در نور سرخ به‌طور معنی‌داری بیشتر از نور سفید بود. به عبارت دیگر در این محیط کشت شمار شاخه تولیدی در هر پینه در نور سرخ سه برابر آن در نور سفید بود. لازم به ذکر است که در این محیط کشت و در نور سفید، شمار شاخه در هر پینه در حد مناسبی می‌باشد (۴ شاخه برای ۱۰ پینه) با این حال استفاده از نور سرخ یک افزایش شگرفی را در شمار شاخه در هر پینه باعث شده است که نسبت به گزارش‌های پیشین در حد بسیار بالایی می‌باشد. مطلبی آذر و همکاران (۱۹) در خصوص پایه GF677، ۱۵٪ گزارش نمودند.

با توجه به این که برهمکنش سه جانبه محیط کشت پایه × IBA × نور معنی‌دار نبوده ولی برهمکنش محیط کشت پایه × نور معنی‌دار می‌باشد بنابراین به‌نظر می‌رسد که استفاده از IBA در هر دو نوع محیط کشت و هر دو نوع وضعیت نوری مفید می‌باشد. بنابراین به منظور بهبود شمار شاخه تولیدی در هر پینه استفاده از محیط کشت WPM که حاوی یک میلی‌گرم در لیتر IBA می‌باشد و کشت‌ها در شرایط نور سرخ قرار داده می‌شوند، پیشنهاد می‌شود.

شمار گیاه باززایی شده (در زیرکشت اول)

موفقیت در هر پروژه ریخت‌زایی در پایان وابسته به این است که در هر کدام از تیمارها شمار گیاه باززایی شده بیشتر باشد. به عبارت دیگر برآیند همه ویژگی‌های اندازه‌گیری شده (درصد پینه‌زایی، قطر پینه، درصد شاخه‌زایی و شمار شاخه تولیدی در پینه) در شمار گیاه باززایی شده نمود پیدا می‌کند. در این پژوهش به غیر از تیمار محیط کشت MS با بکارگیری نور سرخ و WPM با بکارگیری نور سرخ و سفید بدون IBA، در دیگر تیمارهای مورد بررسی، باززایی گیاه مشاهده نشد (شکل ۴). به‌طوری‌که شمار گیاه باززایی شده از یک گیاه در محیط کشت MS با بکارگیری نور سفید و بدون IBA تا ۱۶ گیاه در محیط کشت WPM با بکارگیری نور سرخ و دارای ۱ میلی‌گرم در لیتر IBA متغیر بود.

نتیجه‌های به‌دست آمده از تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که شمار گیاه باززایی شده از نوع محیط کشت و وضعیت نوری متاثر نشد. این در حالی است که اختلاف معنی‌داری بین دو غلظت IBA از دید شمار گیاه باززایی شده دیده شد ($P \leq 0.05$). به غیر از برهمکنش نور × محیط کشت دیگر اثرهای دو گانه و سه گانه تاثیر معنی‌داری بر شمار گیاه باززایی شده نداشتند.

بررسی دو غلظت IBA در مورد ویژگی‌های پیشین و در مورد شمار گیاه باززایی شده (جدول ۱)، بیانگر این نکته می‌باشد که در نبود IBA شمار گیاه باززایی شده ناچیز می‌باشد و استفاده از IBA باعث بهبود و افزایش شمار گیاه باززایی شده، شده است. در این خصوص تنها در محیط کشت MS (نور سفید) و نبود IBA یک گیاه باززایی شد و در دیگر محیط‌های کشت بدون IBA در عمل باززایی گیاه دیده نشد. این در حالی است که در محیط‌های کشت دارای IBA به‌طور میانگین ۱۰ گیاه باززایی شد. این شمار نسبت به گزارش‌های مطلبی آذر و همکاران (۱۹) در خصوص پایه GF677 بیشتر بوده است.

شمار گیاه باززایی شده از اثر همزمان نوع محیط کشت و وضعیت نوری به‌طور معنی‌داری متاثر شد ($P \leq 0.05$) به‌طوری‌که بیشینه شمار گیاه باززایی شده در محیط کشت WPM و در نور سرخ به دست آمد و این تیمار اختلاف معنی‌داری با دیگر تیمارها نشان داد. با توجه به این‌که این تیمار از درصد شاخه‌زایی بالا و شمار شاخه بیشتری در هر پینه برخوردار بود، بنابراین بالا بودن شمار گیاه باززایی شده در این تیمار امری بدیهی است. در محیط کشت MS واکنش نمونه‌ها با نور سرخ و سفید از دید شمار گیاه باززایی شده، یکسان بود. به عبارت دیگر اختلاف معنی‌داری بین نور سرخ و نور سفید با استفاده از محیط کشت MS دیده نشد. با این حال به علت این‌که شمار گیاه باززایی شده در نور سفید (۶ گیاه) بیشتر از نور سرخ (۳ گیاه) بود به‌نظر می‌رسد که

می‌توان از محیط کشت MS و نور سفید استفاده کرد. از سوی دیگر در محیط کشت WPM شمار گیاه باززایی شده در نور سرخ به مراتب بیشتر از نور سفید بود (به تقریب ۳ برابر). این امر نشان می‌دهد که برای بالا بردن باززایی گیاه، افزون بر فراهم بودن شرایط تغذیه‌ای، بایستی شرایط فیزیکی نیز از دید وضعیت نوری مورد توجه قرار گیرد.

با توجه به این‌که برهمکنش سه جانبه نور × محیط کشت × IBA همانند ویژگی‌های پیشین معنی‌دار نبوده اما برهمکنش نور × محیط کشت معنی‌دار می‌باشد ($P \leq 0.05$)، بنابراین به نظر می‌رسد مفید بودن IBA مستقل از نوع محیط کشت و وضعیت نوری باشد. بنابراین برای به دست آوردن بیشینه گیاه باززایی شده، محیط کشت WPM، نور سرخ و استفاده از ۱ میلی‌گرم در لیتر IBA قابل توصیه می‌باشد.

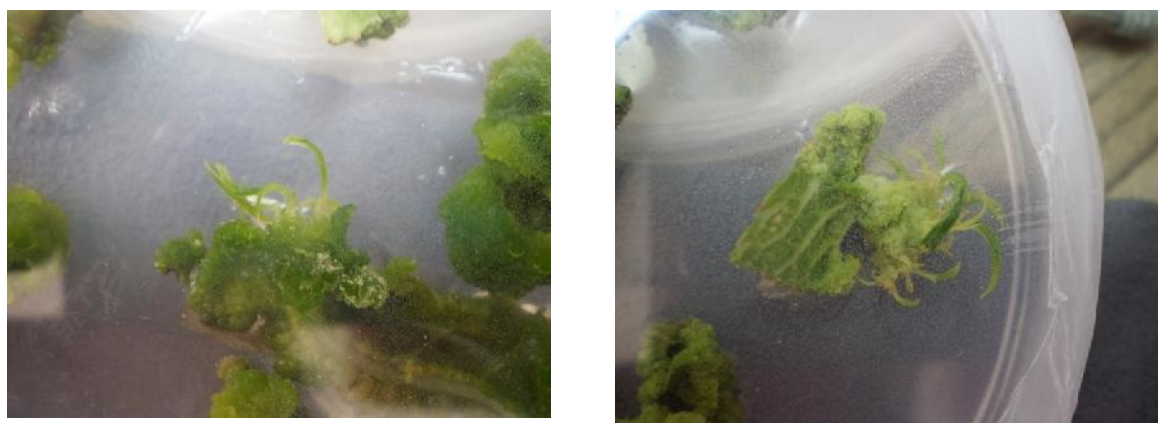


Fig.4. Some regenerated plants (45 days after planting).

شکل ۴- نمونه‌هایی از گیاهان باززایی شده (۴۵ روز بعد از کاشت).

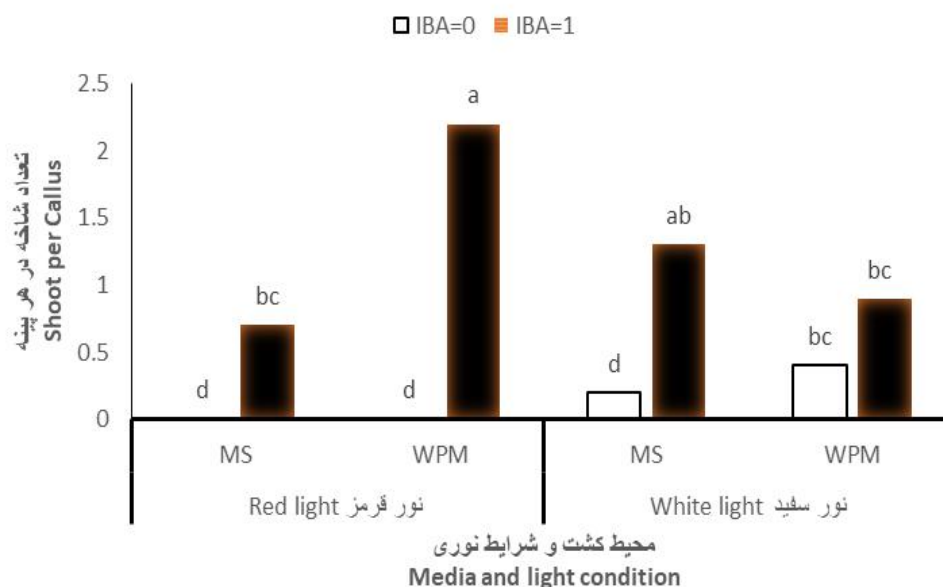


Fig. 5. Mean of shoot number per callus in two media, two light conditions and two concentrations of IBA. Means in each column followed by the same letter are not significantly different ($P \leq 0.05$).

شکل ۵- میانگین شمار شاخه در هر پینه در دو نوع محیط کشت، دو شرایط نوری و دو غلظت هورمون IBA. حرف‌های یکسان بیانگر نبود اختلاف معنی‌دار در سطح ۵٪ می‌باشد.

درصد شاخه‌زایی (در زیرکشت دوم)

نتیجه‌های تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که درصد شاخه‌زایی پایانی (پس از ۲ ماه) از نوع محیط کشت و وضعیت نوری (به تنهایی) متاثر نشد. با این حال اختلاف معنی‌داری بین دو غلظت IBA از نظر درصد شاخه‌زایی دیده شد ($P \leq 0.05$). این در حالی است که برهمکنش دو گانه معنی‌دار نبوده اما برهمکنش سه جانبه محیط کشت $\times$ نور $\times$ IBA معنی‌دار شد ($P \leq 0.05$). به عبارت دیگر درصد شاخه‌زایی پایانی از اثر همزمان سه فاکتور مورد بررسی به طور معنی‌داری تأثیر پذیرفت.

همان‌طور که در شکل ۵ دیده می‌شود در دو محیط کشت، درصد شاخه‌زایی صفر می‌باشد. این دو محیط کشت شامل محیط کشت MS و WPM (نور سرخ) و بدون IBA بود. در دیگر تیمارها درصد شاخه‌زایی پایانی از ۶/۲۵٪ (MS + نور سفید + بدون IBA) تا ۴۴٪ (WPM + نور سرخ + دارای IBA) متغیر بود. در تیمارهای مورد بررسی بیشینه درصد شاخه‌زایی پایانی در محیط‌های کشت MS نور سفید و ۱ میلی‌گرم در لیتر IBA (۴۳٪) و نیز در محیط کشت WPM نور سرخ و ۱ میلی‌گرم در لیتر IBA (۴۴٪) به دست آمد به عبارت دیگر یک برهمکنش جالبی بین وضعیت نوری و نوع محیط کشت وجود دارد به طوری که در محیط کشت MS نور سفید و در محیط کشت WPM نور سرخ باعث بیشینه شدن درصد شاخه‌زایی شده است. این درحالی است که وجود IBA در هر دو مورد بالا لازم و ضروری است به طوری که در تیمارهای بالا و در نبود IBA ۶/۲۵٪ (در محیط کشت MS و نور سفید) و صفر درصد (در محیط کشت WPM و نور سرخ) شاخه‌زایی به دست آمده است.

در محیط کشت MS دارای IBA درصد شاخه‌زایی در نور سفید (۴۳٪) به مراتب بیشتر از نور سرخ (۲۵٪) بود با این حال از نظر آماری این اختلاف معنی‌دار نبود. بنابراین با توجه به درصد شاخه‌زایی بالا در نور سفید و آسانی فراهم آوردن نور سفید، به نظر می‌رسد به منظور بهبود شاخه‌زایی می‌توان از محیط کشت MS با ۱ میلی‌گرم در لیتر IBA و نور سفید استفاده کرد. در محیط کشت WPM دارای IBA درصد شاخه‌زایی در نور سرخ (۴۴٪) بسیار بیشتر از نور سفید (۲۸٪) بود. با این حال، این اختلاف از دید آماری معنی‌دار نبود. بنابراین با توجه به بالا بودن شاخه‌زایی در نور سرخ استفاده از محیط کشت WPM (۱ میلی‌گرم در لیتر IBA) با نور سرخ برای به دست آوردن درصد بالای شاخه‌زایی پیشنهاد می‌شود. بررسی محیط‌های کشت بدون IBA نیز نشان داد که محیط کشت MS و WPM و استفاده از نور سفید باعث شاخه‌زایی از پینه می‌شود اما با فراوانی پایین (به ترتیب ۶ و ۱۲٪) (شکل ۶) و این امر نشان می‌دهد که وجود IBA برای افزایش درصد شاخه‌زایی در هر دو محیط کشت و در هر دو نوع وضعیت نوری لازم و ضروری است.

شمار شاخه در هر پینه (در زیرکشت دوم)

همانند درصد شاخه‌زایی، شمار شاخه تولیدی (شکل ۷) در هر پینه تنها از غلظت‌های مختلف IBA و برهمکنش سه‌گانه محیط کشت $\times$ نور $\times$ IBA به طور معنی‌دار متاثر شد ($P \leq 0.05$). همان‌طوری که در شکل ۵ دیده می‌شود در هر دو محیط کشت MS و WPM، در نبود IBA و نور سرخ، هیچ گونه شاخه‌ای روی پینه تشکیل نشد.

این امر نشان می‌دهد که در نبود IBA، نور سرخ از تولید شاخه در پینه ممانعت می‌کند. این در حالی است که در این نوع محیط‌های کشت پایه و در نبود IBA ولی در حضور نور سفید شاخه بر روی پینه تولید می‌شود (اما با فراوانی پایین‌تر نسبت به محیط‌های کشت دارای IBA). بنابراین نور سفید نقش تحریکی در تولید شاخه بر روی پینه دارد و نور سرخ این توانایی را در نبود حضور IBA نداشته ولی در حضور IBA افزون بر این‌که شاخه‌زایی در پینه را تحریک می‌کند، حتی باعث بهبود آن نیز می‌شود. به طوری‌که در محیط کشت WPM (دارای IBA و نور سرخ) بیشینه شمار شاخه روی پینه (۲۰ شاخه به ازای ۱۰ پینه) تولید می‌شود و این امر مفید بودن نور سرخ را در همکاری با نوع محیط کشت و اکسین مصرفی نشان می‌دهد. در صورت تغییر نوع محیط کشت

پایه یعنی استفاده از محیط کشت MS، نور سرخ باعث بهبود تولید شاخه روی پینه می‌شود ولی شمار شاخه تولیدی در هر پینه را بیشینه نمی‌کند. به‌طوری‌که در محیط کشت MS (دارای IBA و در نور سرخ) به ازای هر ۱۰ پینه، ۷ شاخه و در محیط کشت MS دارای IBA و نور سفید به ازای هر ۱۰ پینه، ۱۳ شاخه تولید شده است. به عبارت دیگر، اگر از محیط کشت MS استفاده کنیم نور سفید از اثر تحریک‌کنندگی بیشتری نسبت به نور سرخ برخوردار می‌باشد. در محیط کشت WPM و دارای IBA، نور سرخ به‌طور معنی‌داری شمار شاخه بیشتری نسبت به نور سفید روی پینه تولید کرد و این امر نشان می‌دهد که نور سرخ اثر تحریک بیشتری را با استفاده از محیط کشت WPM و در حضور اکسین نشان می‌دهد.

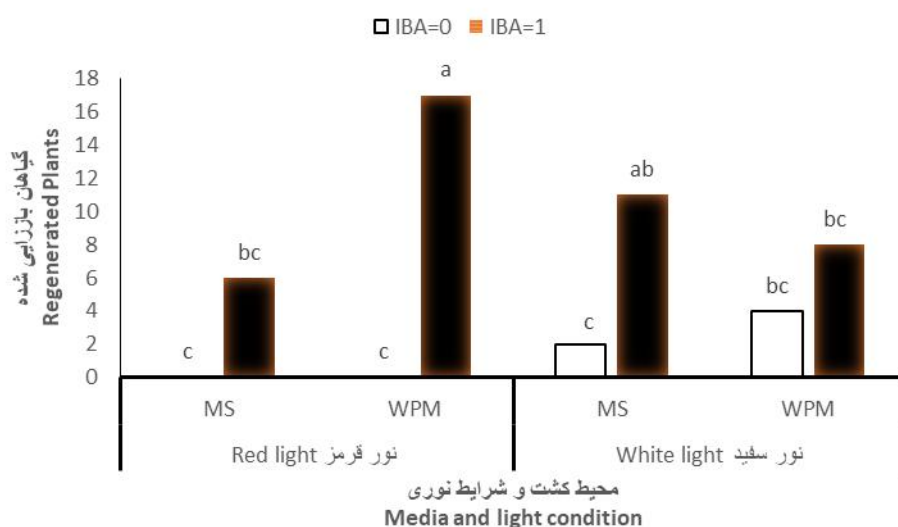


Fig.6. Mean of number of regenerated plants in two media, two light conditions and two concentrations of IBA. Means in each column followed by the same letter are not significantly different ($P \leq 0.05$).

شکل ۶- میانگین شمار گیاه باززایی شده در دو نوع محیط کشت، دو شرایط نوری و دو غلظت IBA. حرف‌های یکسان بیانگر نبود اختلاف معنی‌دار در سطح ۵٪ می‌باشد.

شمار گیاه باززایی شده پایانی (در زیرکشت دوم)

تجزیه واریانس داده‌های مربوط به شمار گیاهان باززایی شده نشان داد که از بین منابع تغییرهای مورد بررسی، غلظت‌های مختلف IBA و برهمکنش محیط کشت $\times$ نور $\times$ IBA معنی‌دار بوده ($P \leq 0.05$) و دیگر منابع تغییرها اثر معنی‌داری روی شمار گیاه باززایی شده پایانی نداشتند ($P \geq 0.05$). همان‌طور که در مورد درصد شاخه‌زایی و شمار شاخه در هر پینه گفته شد، در محیط کشت MS و WPM بدون IBA و نور سرخ هیچ گیاهی باززایی نشد که این امر ناشی از نبود شاخه‌زایی در تیمارهای مربوطه می‌باشد. این درحالی است که بیشینه شمار گیاه باززایی شده در محیط کشت WPM در حضور IBA و نور سرخ (۱۷ گیاه) و محیط کشت MS دارای IBA و نور سفید (۱۱ گیاه) به دست آمد. با این وجود که کمینه شمار گیاه باززایی شده (۱ گیاه) در محیط کشت MS بدون IBA و نور سفید به دست آمد در دیگر تیمارها شمار گیاه باززایی شده از ۳ تا ۸ گیاه متغیر بود. در محیط کشت MS و دارای IBA شمار گیاه باززایی شده در نور سفید به مراتب بیشتر از نور سرخ بود و این نشان می‌دهد که افزون بر نقش تحریکی IBA، نور سفید نیز در صورت استفاده از محیط کشت MS نقش تحریکی در شاخه‌زایی داشته و در نهایت شمار گیاه باززایی شده پایانی افزایش می‌یابد. در محیط کشت

WPM و در حضور IBA نور سرخ به مراتب از شمار گیاه باززایی شده بیشتری نسبت به نور سفید برخوردار بود. بنابراین نور سرخ نقش تحریکی بر شاخه‌زایی و باززایی گیاه دارد به شرط آن‌که از محیط کشت WPM و IBA استفاده شود. در محیط‌های کشت MS و WPM بدون IBA زمانی باززایی گیاه اتفاق می‌افتد که از نور سفید استفاده شود. بنابراین به نظر می‌رسد که نور سفید نقشی همانند IBA دارد. به عبارت دیگر، در صورتی‌که از غلظت‌های پایین IBA استفاده می‌شد شاید تاثیر نور سفید در حد غلظت‌های پایین IBA بود.

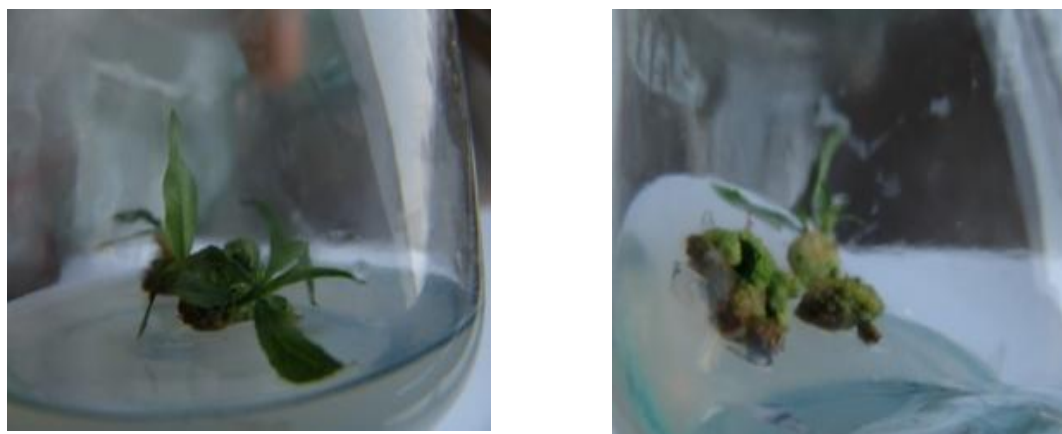


Fig.7. Calluses with regenerated shoots transferred to new media after second sub-culture.

شکل ۷- پینه‌های دارای شاخه باززایی شده، انتقال داده شده به محیط کشت جدید پس از زیرکشت دوم.

نتیجه‌گیری

استفاده از فناوری‌های زیستی در افزایش پایه‌های درختان میوه می‌تواند محدودیت‌های ایجاد پایه‌های جدید را از بین ببرد. در این راستا گام نخست در بهره‌برداری از این فناوری‌های نوین، گسترش روش‌های کشت بافت پایه‌های جدید مثل دورگه هلو × بادام "HS314" می‌باشد تا بتوان مراحل مختلف شاخه‌زایی و ریزاززایی را بهینه کرد. نتیجه‌های این آزمایش نشان داد که پینه‌زایی از قطعه‌های برگ‌ی هم در حضور IBA و هم در حضور TDZ انجام شده و به اندازه کافی پینه تولید می‌شود. با این حال شاخه‌زایی و باززایی گیاه در این پایه به سختی و در فراوانی پایینی انجام شد که نشان دهنده این است که شاید قطعه‌های برگ‌ی از توانایی پایینی برای اندام‌زایی برخوردارند. با این حال، بیشینه شمار گیاه باززایی شده در محیط کشت WPM در حضور IBA و نور سرخ (۱۷ گیاه) و محیط کشت MS دارای IBA و نور سفید (۱۱ گیاه) به‌دست آمد.

References

منابع

۱. دژم پور، ج.، و. گریگوریان، ا. مجیدی و ن. علی اصغرزاده. ۱۳۸۶. ارزیابی برخی ویژگی‌های مرفولوژیکی چند دورگه بین گونه‌ای جنس پرونوس و افزایش همگروهی آن‌ها. مجله علوم و فنون باغبانی ایران، ۵۴-۴۳: ۸(۱).
۲. دژم پور، ج.، و. گریگوریان، ا. مجیدی و ن. علی اصغرزاده. ۱۳۸۶. گندزدایی، استقرار و پرآوری در کشت درون‌شیشه‌ای چند دورگه بین گونه‌ای جنس پرونوس. مجله علوم و فنون باغبانی ایران، ۱۷۴-۱۶۵: ۸(۳).
3. Ainsley, P.J., F.A. Hammerschlag, T. Bertozzi, G.G. Collins, and M. Sedgley. 2001. Regeneration of almond from immature seed cotyledons. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 67:221-226.
4. Ainsley, P.J., G. Gollins and M. Sedgley. 2000. Adventitious shoot regeneration from leaf explants of almond. *In vitro Cell Dev. Bio-Plant.* 36:470-474.

5. Almelhdi, A.A., D. E. Parfitt. 1986. *In vitro* propagation of peach: 1. Propagation of Lovell and Nemaguard peach rootstocks. Fruit Var. J. 40:12-17.
6. Antonelli, M. and P. Druat. 1990. The use of a brief 2,4-D pretreatment to induce leaf regeneration on *Prunus canescens* Bois. Acta Hort. 280:45-50.
7. Bhagwat, B. and W.D. Lane. 2004. *In vitro* shoot regeneration from leaves of sweet cherry lapins and sweet heart. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 78:173-187.
8. Bojwani, S.S. and M.K. Razdan. 1983. Plant tissue culture: Theory and practice. Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam, the Netherlands, 756.
9. Dejampour, J., H. Rahnemoun, D. Hassani. 2005. Breeding almond interspecific hybrid rootstocks in Iran. Acta Hort. 726:45- 50.
10. Dejampour, J., I. Majidi, S. Khosravi, S. Farhadi and A. Sadmehr. 2011. *In vitro* propagation of HS314 rootstock (*Prunus amygdalus* x *P. persica*). HortScience, 46(6):928- 931.
11. Dejampour, J., N. Aliasgarzadeh, V. Grigorian and E. Majidi Heravan. 2012. Evaluation of salinity tolerance in some interspecific hybrids of *Prunus*. Seed Plant Improv. J. 28 (3):339-351
12. Fasolo, F., R.H. Zimmerman and I. Fordhan, I. 1989. Adventitious shoot formation on excised leaves of *in vitro* grown shoot of apple cultivars. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 16:75-87.
13. Gentile, A., S. Monticelli and C. Damiano. 2002. Adventitious shoot regeneration in peach. Plant Cell Rep. 20:1011-1016.
14. Hammatt, N. and N.J. Grant. 1998. Shoot regeneration from leaves and *Prunus avium* L. (wild cherry). Plant Cell Rep. 17:526-530.
15. James, D.J. and S.B. Malhotra. 1984. Organogenesis in callus derived from stem and leaf tissue of apple and cherry root stock. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 3:333-341.
16. Litz, R. E. and D. J. Gray. 1992. Organogenesis and somatic embryogenesis. In: Hammerschlag, F. A., R. E. Litz (eds). Biotechnology of perennial fruit crops. CAB Int. 476.
17. Mant, S., R. Scorza and J. Cordts. 1989. Plant regeneration from cotyledons of *Prunus persica*, *Prunus domestica* and *Prunus cerasus*. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 19:1-11.
18. Miguil, C.M., P. Duart and M. M. Oliveria. 1996. Shoot regeneration from adventitious buds induced on juvenile and adult almond explants. *In vitro* Cell. Dev. Bio-Plant. 32:148-153.
19. -Motallebi-Azar, A., N. Mahna, and A. Markafshi. 2011. Shoot regeneration from leaf segments of peach × almond hybrid, GF677 rootstock. Adv. Agr. Bot. 3:168-177.

20. 18-Pereze- Tornero, O.P. and L.S. Burgo. 2004. Adventitious shoot regeneration from *in vitro* cultured Leaves of apricot. Acta Hort. 538, 15-19.
21. Perez-Tornero, O., J. Egea, A. Vanoo and L. S. Burgo. 2000. Assessment of factors affecting and adventitious shoot regeneration from *in vitro* cultured leaves of apricot. Plant Sci. 158:61-70.
22. Espinosa A.C., P.M. Pijut and C.H. Michler. 2006. Adventitious shoot regeneration and rooting of *Prunus serotina in vitro* cultures. HortScience, 4:193-201.
23. Staniene, G. and V. Stanys. 2004. Plant regeneration from leavers of *Cydonia oblonga* cultivars. Acta Univer. Latvi. Biol. 676:231-233.
24. Tang, H., Z. Ren, G. Reustleand and G. Krcza. 2002. Plant regeneration from leaves of sweet and sour cherry cultivars. Sci. Hort. 93:3-9.
25. Vaghari-Azar, E., A. Vatanpour-Azghandi, E., Majidi-Heravan, Dejampour, A. Habashi. 2012. Micropropagation of two apricot × plum inter specific hybrid rootstocks (HS405 and HS706). Iranian J. Gen. Plant Breed. 1(2):42-51

Effect of Different Auxin and Cytokinin Concentrations, Basal Medium and Light Quality on Shoot Induction Using Callus of Leaf Segments in Peach×Almond Hybrid, HS314

J. Dejampour*, F. Aghajani, A. Motallebi-Azar and H. Fathi¹

To investigate the effects of auxin and cytokinin on shoot regeneration from leaf segments of HS314 rootstock, *in vitro* plantlets grown on DKW containing 0.5 mg L⁻¹ BAP, 5 mg L⁻¹ GA₃, 0.5 mg L⁻¹ IBA, and 200 mg L⁻¹ casein hydrolysate were used. Leaf segments (abaxial side) were cultured on shoot induction media containing different concentrations of TDZ (3, 6, 9, and 12 mg L⁻¹) and IBA (0.0 and 0.1 mg L⁻¹). Results showed that callus induction was achieved in all treatments, and IBA was not necessarily used. Nevertheless, only culture medium AP with 12 mg L⁻¹ TDZ and 0.1 mg L⁻¹ IBA caused shoot regeneration. In the next step, choosing the best culture medium and efficient hormonal levels, also the effect of the red light was investigated. Therefore, two culture media, MS and WPM (containing 0, 1 mg L⁻¹ IBA and 12 mg L⁻¹ TDZ) and two light conditions (red and white) were used. The results showed that shoot regeneration was occurred in both culture media with 1 mg L⁻¹ IBA. The numbers of regenerated plants were affected by interaction of culture medium × light condition and 1 mg L⁻¹ IBA. Finally, MS medium using red light and WPM using white light were considered as the best treatments for shoot regeneration from leaf segment (along with 1 mg L⁻¹ IBA and 12 mg L⁻¹ TDZ) for both of them.

Keywords: Callus induction, HS314 rootstock, Plant growth regulation, Shoot regeneration.

1. Associate Professor, Agriculture Research Center of East-Azerbaijan, Tabriz, M.Sc. Graduated Student of Plant Biotechnology, Associate Professor, Department of Horticultural Science, Faculty of Agriculture, University of Tabriz and Reasercher, Agriculture Research Center of East-Azerbaijan, Tabriz, Iran, respectively.

* Corresponding author, Email: (dejampour@yahoo.com).