پژوهش‌های میوه‌کاری
دوره دوم، شماره دوم، پاییز و زمستان ۱۳۹۶ (۱۶-۱)

بهینه‌سازی شرایط کشت بافت برای ریزازدیادی پایه سیب MM_{111}

عاطفه مشاری نصیرکندی*[۱]، بهمن حسینی[۲]، علیرضا فرخزاد[۳]، لطفعلی ناصری[۴] و خدیجه آقایی[۵]

۱- دانش آموخته کارشناسی‌ارشد بیوتکنولوژی و ژنتیک ملکولی محصولات باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه
۲و۴- دانشیار گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه
۳- استادیار گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه
۵- کارشناس گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۹/۲۷- تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۱۱/۲۴)

چکیده

فن‌آوری کشت بافت گیاهی برای تکثیر گیاهان در سطح وسیع استفاده می‌شود. ازدیاد پایه سیب MM_{111} به روش کشت بافت اغلب باعث تولید گیاهانی با رشد سریع می‌شود. پژوهش حاضر با هدف بهینه‌سازی شرایط ازدیاد درون شیشه‌ای پایه سیب MM_{111} و بررسی اثر محیط‌های کشت پایه، تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی مختلف بر پرآوری و ریشه‌زایی این پایه در قالب سه آزمایش جداگانه انجام گردید. در آزمایش اول، اثر پنج نوع محیط کشت پایه، شامل محیط کشت پایه MS، ½MS، 2MS، WPM و B_5، بر تعداد و طول ریزشاخه پرآوری شده، در آزمایش دوم اثر دو نوع تنظیم‌کننده رشد گیاهی BAP و TDZ در غلظت‌های صفر (شاهد)، ۲/۲، ۴/۴ و ۸/۸ میکرومولار بر صفات رویشی تعداد ریزشاخه، طول ریزشاخه، تعداد گره و طول میانگره و در آزمایش سوم، اثر دو نوع محیط کشت پایه MS و ½MS همراه با دو نوع اکسین در غلظت‌های صفر (شاهد)، ۷/۳۵، ۱۴/۷ و ۲۲/۰۵ میکرومولار IBA و در غلظت‌های صفر (شاهد)، ۸/۰۵، ۱۶/۱۱ و ۲۴/۱۶ میکرومولار NAA بر صفات تعداد و طول ریشه در سه و چهار روز نگهداری در تاریکی بررسی گردید. سازگاری گیاهچه‌های درون شیشه‌ای در بسترهای کشت پرلیت درشت، پرلیت ریز، پرلیت با پیت‌ماس (۱:۱) و پیت‌ماس بررسی شد. بر اساس نتایج بدست آمده از آزمایش اول، حداکثر میزان پرآوری (۱۳/۶۶ ریزشاخه به ازای هر ریزنمونه) در محیط 2MS مشاهده گردید. در آزمایش دوم، BAP در افزایش میزان پرآوری، تعداد گره و کاهش طول میانگره موثرتر از TDZ بود. حداکثر میزان پرآوری (۸/۶۶ ریزشاخه به ازای هر ریزنمونه) در غلظت ۴/۴ میکرومولار BAP مشاهده گردید. بر اساس نتایج آزمایش سوم، بیشترین تعداد ریشه با میانگین ۲/۶۵ ریشه به ازای هر ریزنمونه در محیط کشت MS به همراه ۸/۰۵ میکرومولار NAA مشاهده گردید.

کلمات کلیدی: ازدیاد درون شیشه‌ای، پایه رویشی، سازگاری، محیط کشت

* نویسنده مسئول
Email: ati.moshari@yahoo.com

مقدمه

سیب (*Malus domestica*) یکی از میوه‌های دانه‌دار و متعلق به تیره گلسرخیان (Rosaceae) و زیر تیره پوموئیده (Pomoideae) است. در سال های اخیر استفاده از پایه‌های رویشی و نیمه‌پاکوتاه به دلیل تولید درختان کوچک که هزینه‌های کارگری، سمپاشی، هرس، برداشت میوه و سایر عملیات باغبانی در باغ را کاهش می‌دهد، از رونق زیادی برخوردار است (محسنی‌آذر و همکاران، ۱۳۸۸؛ مهدویان و همکاران، ۱۳۸۹). پایه MM_{111} جزء پایه‌های نیمه‌قوی یا نیمه‌استاندارد است و درختان روی آن به اندازه ۹۰ درصد درختان پیوندی روی پایه‌های بذری است. از این پایه در خاک‌های فقیر و سبک به عنوان پایه و میان‌پایه استفاده می‌شود. پایه MM_{111} از تلاقی نورسن‌اسپای[1] و MI-793 حاصل شده است. این پایه با داشتن برگ‌های خشن و زبر، ساقه نازک و راست قابل تشخیص است. در آزمایش‌های مزرعه‌ای با میزان رطوبت متفاوت خاک ثابت شده است که پایه MM_{111} بیشترین مقاومت به خشکی خاک را دارد. طی آزمایش‌های طولانی مشخص شده است که گرچه درختان روی این پایه زودبارده نمی‌باشند ولی نسبت به درختان پیوندی روی پایه‌های بذری خیلی پربارده هستند (رادنیا، ۱۳۷۵).

تکنولوژی کشت بافت گیاهی بیشتر برای تکثیر در سطح وسیع گیاهان استفاده می‌شود. این تکنولوژی تجاری بر پایه ریزازدیادی است که در آن پرآوری سریع گیاه به وسیله ریزقلمه‌های ساقه‌ای کوچک، جوانه‌های محوری و در سطح محدودتری از رویان‌های سوماتیکی بدست می‌آید (سینگ[2]، ۲۰۰۵). برای ازدیاد مؤفق و نگهداری درون شیشه، انتخاب محیط کشت صحیح یکی از مهمترین گام‌ها در توسعه یک دستورالعمل مؤفق است. توسعه یک محیط کشت مناسب برای یک محصول ویژه می‌تواند کاملاً پیچیده باشد زیرا پاسخ به محیط کشت، اغلب وابسته به ژنوتیپ می باشد (رمیج و ویلیامز[3]، ۲۰۰۲؛ گرین‌وی و همکاران[4]، ۲۰۱۲). مؤفقیت در کشت درون شیشه مبتنی بر رشد و تمایز بافت‌های گیاه، با افزودن تنظیم کننده‌های رشد مناسب عملی است (قمر و همکاران[5]، ۲۰۱۵). شاخه‌زایی پایه‌ی سیب M_7 با کشت نوک شاخساره به عنوان ریزنمونه‌ی اولیه روی محیط کشت MS تغییریافته (محیط کشت نیم غلظت MS که به آن ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BA اضافه شده بود) تسریع و تحریک گردید (ورنر و بو[6]، ۱۹۸۰).

در پایه‌های سیب (M_9، M_{27} و MM_{106})، سرعت رشد، اساساً بستگی به نوع تنظیم‌کننده‌ی رشد گیاهی بویژه بنزیل‌آدنین (BA)، غلظت نمک‌ها و ژنوتیپ دارد (امیری و الهی‌نیا، ۲۰۱۱). در یک بررسی که برای تعیین محیط کشت مناسب جهت رشد سیب‌های

1. Northern spy

2. Singh
3. Ramage and Williams
4. Greenway *et al*.
5. Qamar *et al*.
6. Werner and Boe

پاکوتاه انجام شد، سه نژاد از سیب McIntosh با عادت‌های رشد استاندارد تا خیلی پاکوتاه انتخاب شده و از نوک مریستم آنها به عنوان ریزنمونه استفاده شد و در محیط کشت MS تکمیل شده با غلظت‌های مختلف BA کشت شدند و همهٔ نژادها در غلظت ۶-۳ میکرومولار BA بیشترین میزان پرآوری ریز شاخه و افزایش وزن را نشان دادند، با این حال تحمل به غلظت‌های بیش از حد مطلوب سیتوکینین، بستگی به عادت رشد داشت. برای مثال در غلظت ۱۰ میکرومول در لیتر، میزان تولید شاخساره برای انواع پاکوتاه، متوسط و استاندارد به ترتیب ۹۰، ۲۰ و ۰ درصد بود (لین و همکاران[1]، ۱۹۸۲).

افزودن ترکیبات $CaCl_2$، $MgSO_4$، KH_2PO_4 و ترکیبات نیتروژن به محیط MS (موراشیگ و اسکوگ[2]، ۱۹۶۲) باعث بهبود رشد شاخه‌ها گردید و بیشترین غلظت (۲/۵ × MS) ترکیبات $CaCl_2$، $MgSO_4$ و KH_2PO_4 بیشترین تعداد شاخه‌چه را در گلابی پیرودوآرف[3] تولید نمود. ترکیبات $CaCl_2$، $MgSO_4$ و KH_2PO_4 بر بیشتر پاسخ‌های رشدی گیاهان و ژنوتیپ‌ها اثر می‌گذارند (رید و همکاران[4]، ۲۰۱۳). ترکیب محیط کشت بر میزان پرآوری و ازدیاد پایه‌های هسته‌دار تأثیر داشت، بطوریکه پس از انجام ۹ زیرکشت، تعداد شاخساره روی محیط QL[5] در مقایسه با محیط MS و WPM[6] به طور معنی‌داری کاهش یافت (آندرو و مارین[7]، ۲۰۰۵). پژوهشگران، غلظت‌های مختلف BA را برای پرآوری ریزنمونه‌های انجیر (*Ficus carica*) به کار بردند که بیشترین پرآوری در محیط حاوی ۲/۲ میکرومولار (۰/۵ میلی گرم در لیتر) به دست آمد (نوبر و رومنو[8]، ۱۹۹۷). پژوهشگران بیان کردند که علت پاسخ‌دهی بهتر ریزنمونه‌های ارقام شاهرودی و بیدانه سفید انگور به محیط MS در مقایسه با محیط WPM با غلظت‌های هورمونی مساوی، بالا بودن درصد عناصر غذایی و نیتروژن آن می‌تواند باشد (کلاته جاری، ۱۳۸۵). جیسکنی و همکاران[9] (۲۰۰۸)، به این نتیجه رسیدند که حداکثر شاخه‌زایی انگور (*Vitis vinifera*) در محیط کشت MS دارای ۵ میکرومولار بنزیل‌آدنین می‌باشد که این محیط برای پرآوری شاخه نیز مناسبتر ترجیح داده شد در ضمن محیط‌های تازه MS برای واکشت جهت حذف قهوه‌ای شدن اکسیداتیو پیشنهاد شد.

تکثیر، پرآوری و ریشه‌زایی شاخساره در کشت درون شیشه‌ای تحت تأثیر عوامل زیادی از جمله گونه، ژنوتیپ، رقم، محیط کشت، نمک‌های معدنی، مواد آلی، کربوهیدرات‌ها، تنظیم‌کننده‌های رشد و شرایط محیطی قرار می‌گیرد (جورج و همکاران[10]، ۲۰۰۸). در

1. Lane *et al*.
2. Murashige and Skoog
3. Pyrodwarf
4. Reed *et al*.
5. Quoirin and Lepoivre
6. Woody Plant Medium (WPM)
7. Androu and Marin
8. Nobre and Romano
9. Jaskani *et al*.
10. George *et al*.

ریزازدیادی انگور هیبرید Southem Home، نتیجه گرفته شد که به ترتیب ۷۶ و ۸۳ درصد از شاخه‌های پرآوری شده پس از انتقال به محیط کشت حاوی ۱ میکرومولار NAA یا IBA ریشه‌دار شدند در حالیکه فقط ۴۳ درصد از شاخه‌چه‌های این رقم در محیط فاقد اکسین ریشه‌دار شدند (کامپتون و گری[1]، ۱۹۹۴). خدایی‌چگنی و همکاران (۱۳۹۰)، گزارش نمودند که تیمار کوتاه مدت IBA نسبت به تیمار بلند مدت در ریشه‌زایی دو رگه گلابی، موثرتر بود.

با توجه به موارد فوق هدف از انجام پژوهش حاضر، بهینه‌سازی پرآوری و تعیین مناسبترین محیط کشت و تنظیم‌کننده رشد گیاهی برای پرآوری و ریشه زایی درون شیشه‌ای پایه‌ی سیب MM_{111} بود.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی اولیه این آزمایش ریزشاخه‌های پایه سیب MM_{111} بود که از شرکت اروم زیست‌تاک تهیه گردید. این نمونه‌ها پس از جداسازی از محیط کشت و جدا کردن برگ‌ها برای کشت در محیط کشت آماده شدند. به منظور بررسی شرایط بهینه تکثیر درون شیشه‌ای این پایه، در سه آزمایش مجزا و به ترتیب اثر محیط‌های کشت، نوع و غلظت تنظیم‌کننده رشد گیاهی و شرایط ریشه‌زایی بر پایه سیب MM_{111} بررسی گردید. آنالیز داده‌ها بوسیله نرم‌افزار SAS صورت گرفت. برای رسم نمودارها از نرم‌افزار Microsoft Office Excel 2007 استفاده گردید. مقایسه میانگین داده‌ها بوسیله آزمون چنددامنه‌ای دانکن در سطح احتمال یک و پنج درصد صورت گرفت.

آزمایش اول: بررسی اثر نوع محیط کشت پایه بر ریزازدیادی پایه سیب MM_{111}

در این آزمایش اثر پنج نوع محیط کشت پایه شامل MS، ½MS (یک‌ونیم برابر سه نمک $CaCl_2$، $MgSO_4$ و KH_2PO_4)، 2MS (دو برابر سه نمک $CaCl_2$، $MgSO_4$ و KH_2PO_4)، WPM و B_5[2] بر میانگین تعداد طول ریزشاخه پایه نیمه‌پاکوتاه کننده سیب MM_{111} با هدف تعیین مطلوبترین محیط کشت پایه بررسی گردید. آزمایش به صورت طرح آماری کاملاً تصادفی با سه تکرار و سه ریزنمونه در هر تکرار انجام گردید. در کلیه محیط‌های مورد استفاده، از ۱ میلی‌گرم بر لیتر بنزیل آدنین استفاده گردید. نمونه‌ها در شرایط ۱۶ ساعت روشنایی و دمای شبانه‌روزی ۱±۲۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری گردید. یادداشت برداری‌ها پس از چهار هفته و قبل از ورود ریزشاخه‌ها به مرحله پیری و چوبی شدن انجام گردید.

آزمایش دوم: بررسی اثر نوع و غلظت تنظیم کننده رشد گیاهی بر ریزازدیادی پایه سیب MM_{111}

1. Compton and Gray

2. Gamborg Medium (B5)

در این آزمایش از محیط کشت انتخابی 2MS (بدست آمده از آزمایش اول) و دو نوع تنظیم‌کننده رشد گیاهی ۶- بنزیل آمینو پورین[1] (BAP) و تیدیازورون[2] (TDZ) در چهار غلظت مختلف شامل صفر (شاهد)، ۲/۲، ۴/۴ و ۸/۸ میکرومولار استفاده گردید. آزمایش به صورت فاکتوریل (۲×۴) در قالب طرح آماری کاملاً تصادفی با سه تکرار انجام گردید. شاخص‌های مورد بررسی در این آزمایش شامل، میانگین تعداد و طول ریزشاخه، تعداد گره و طول میانگره بود. یادداشت‌برداری‌ها پس از چهار هفته انجام گردید. مقایسه میانگین داده‌ها بوسیله آزمون چنددامنه‌ای دانکن در سطح احتمال یک و پنج درصد صورت گرفت.

آزمایش سوم: ارزیابی توان ریشه‌زایی

ریزشاخه‌های ازدیاد شده در محیط‌های کشت پایه MS و ½MS حاوی دو نوع تنظیم‌کننده رشد گیاهی اسیدایندول‌بوتیریک[3] (IBA) در چهار غلظت ۷/۳۵، ۱۴/۷ و ۲۲/۰۵ میکرومولار و اسیدنفتالین‌استیک[4] (NAA) در چهار غلظت صفر (شاهد)، ۸/۰۵، ۱۶/۱۱ و ۲۴/۱۶ میکرومولار قرار گرفتند. آزمایش به صورت فاکتوریل (۴×۲×۲) در قالب طرح آماری کاملاً تصادفی با سه تکرار انجام گردید. برای این منظور ریز شاخه‌های پایه سیب MM_{111} در تیمارهای آزمایشی شامل MS و ½MS با غلظت‌های مختلف اسید ایندول بوتیریک و اسید نفتالین استیک واکشت گردید. محیط‌های کشت حاوی نمک‌های MS با ۳۰ گرم بر لیتر ساکارز و ۶ گرم آگار بود. ویتامین‌های محیط کشت شامل؛ تیامین، نیکوتینیک‌اسید و پیریدوکسین بود. اسیدیته کلیه محیط‌های کشت قبل از افزودن آگار در حد ۵/۷ تنظیم شد. کلیه ریز شاخه‌های مورد استفاده برای ریشه‌زائی به صورت جداگانه به مدت سه روز و چهار روز در محیط حاوی تنظیم کننده رشد گیاهی (محیط القاء) و در تاریکی قرار گرفتند. سپس به محیط عاری از تنظیم‌کننده‌رشد گیاهی منتقل شدند. شاخص‌های مورد ارزیابی شامل میانگین تعداد ریشه به ازاء هر ریزشاخه و طول ریشه‌چه‌های هر ریزشاخه در محیط های مختلف بود. یادداشت برداری‌ها بر اساس شروع آغازش و رشد ریشه‌ها پس از گذشت چهار هفته انجام گردید. مقایسه میانگین داده‌ها بوسیله آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال یک و پنج درصد صورت گرفت.

به منظور بررسی اثر نوع محیط‌های کشت بر استقرار مواد گیاهی در محیط خارج شیشه، شاخه‌چه های گیاهی ریشه‌دار شده به صورت جداگانه به محیط‌های کشت حاوی پرلیت درشت (۸-۶ میلی متر)، پرلیت ریز (کمتر از ۴ میلی‌متر)، پیت‌ماس همراه با پرلیت و پیت‌ماس منتقل شدند. به طوریکه ابتدا درب شیشه‌های حاوی گیاهچه‌های ریشه‌دار شده

1. 6-Benzylaminopurin
2. Thidiazuron
3. Indol-3-Butyric-Acid
4. 1.Naphthaleneaceticacid

در محیط کشت بدون تنظیم‌کننده رشد پس از گذشت چهار هفته باز گردید. پس از خروج گیاهچه‌ها، آگار را از ریشه آنها با دست جدا شد و شستشوی ریشه‌ها با آب معمولی انجام گردید. پس از شستشوی ریشه‌ها، گیاهچه‌های ریشه‌دار شده به ظروف پلاستیکی حاوی چهار نوع محیط کشت پرلیت درشت، پرلیت ریز، پیت‌ماس همراه با پرلیت و پیت ماس منتقل گردید. آبیاری به صورت یکنواخت و معمول انجام گردید. با گذشت زمان درب ظروف پلاستیکی کم کم باز شد تا با محیط جدید بتدریج سازگاری ایجاد شود. پس از گذشت حداقل چهار هفته و سازگاری کامل گیاهچه‌ها به شرایط معمولی گلخانه، یاداشت برداری انجام گردید. رطوبت گلخانه سازگاری ۹۰ درصد و متوسط دما ۲۴ درجه سانتی‌گراد بود. این آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار انجام گردید. مراحل مختلف ریزازدیادی پایه سیب MM_{111} در شکل ۱ نشان داده شده است.

نتایج و بحث

بررسی اثر نوع محیط کشت پایه بر ریزازدیادی پایه سیب MM_{111}

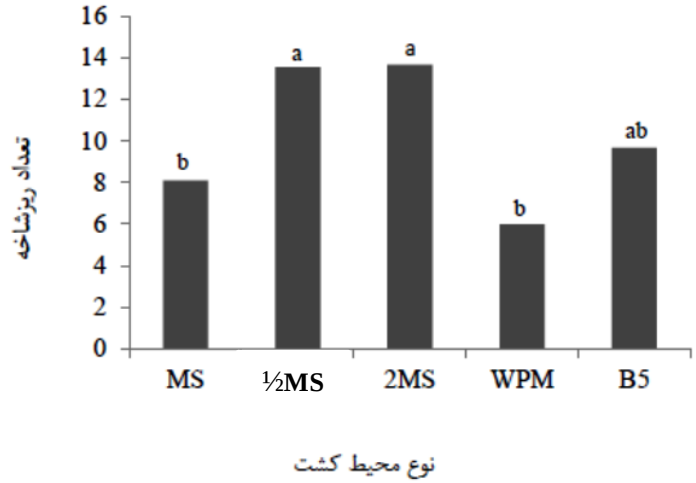
مقایسه تأثیر نوع محیط کشت در ریزازدیادی پایه سیب MM_{111} نشان داد که نوع محیط کشت پایه تأثیر معنی‌داری بر تعداد ریزشاخه داشت ولی نوع محیط کشت بر طول ریزشاخه تأثیر معنی‌داری نداشت. نتایج مقایسه میانگین داده‌ها نشان داد که حداکثر تعداد ریزشاخه با میانگین ۱۳/۶۶ ریزشاخه در هر تیمار در محیط کشت 2MS و حداقل تعداد ریزشاخه با میانگین ۵/۹۹ ریزشاخه در هر تیمار در محیط کشت WPM مشاهده گردید. محیط‌های کشت ½MS و 2MS تفاوت معنی‌داری نسبت به محیط‌های کشت MS و WPM نشان داد. (نمودار ۱). افزودن ترکیبات $CaCl_2$، $MgSO_4$ و KH_2PO_4 به محیط کشت موراشیگ و اسکوگ (MS) باعث بهبود رشد شاخه‌ها شده و بیشترین تعداد ریزشاخه در گلابی پیرودوارف در بیشترین غلظت ترکیبات $CaCl_2$، $MgSO_4$ و KH_2PO_4 (۲xMS) مشاهده شد.

بررسی اثر نوع و غلظت تنظیم‌کننده رشد گیاهی بر ریزازدیادی پایه سیب MM_{111}

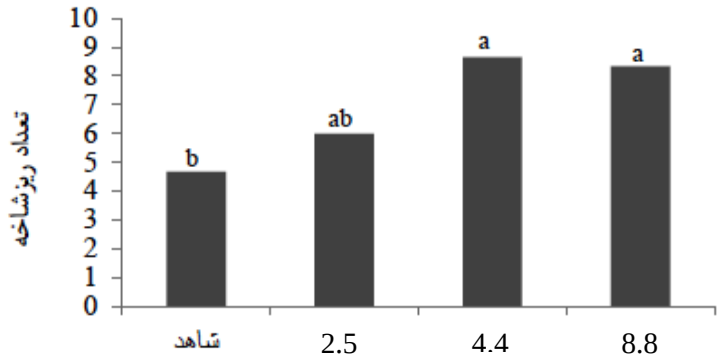
مقایسه اثر نوع و غلظت تنظیم‌کننده رشد گیاهی و اثر متقابل آنها نشان داد غلظت تنظیم‌کننده رشد گیاهی بر تعداد ریزشاخه تأثیر معنی‌داری داشت. نتایج مقایسه میانگین داده‌ها نشان داد که حداکثر تعداد ریزشاخه با میانگین ۸/۶۶ ریزشاخه در هر تیمار در محیط کشت 2MS همراه با تنظیم‌کننده رشد گیاهی BAP در سطح ۴/۴ میکرومولار و حداقل تعداد ریزشاخه با میانگین ۴/۶۶ ریزشاخه در هر تیمار در محیط کشت فاقد تنظیم‌کنند رشد گیاهی (شاهد)

A B C

شکل ۱- مراحل مختلف ریزازدیادی پایه سیب MM_{111}.
A) باززایی، B) ریشه‌زایی و C) سازگاری.



نمودار ۱- اثر نوع محیط کشت پایه بر تعداد ریزشاخه در پایه سیب MM_{111}. میانگین‌هایی با حروف مشترک بر اساس آزمون (چند دامنه‌ای) دانکن، اختلاف معنی‌داری با یکدیگر در سطح احتمال ۱ درصد ندارند.



نمودار ۲- اثر غلظت تنظیم‌کننده رشد گیاهی BAP بر تعداد ریزشاخه در پایه سیب MM_{111} در محیط کشت 2MS. میانگین‌هایی با حروف مشترک بر اساس آزمون (چند دامنه‌ای) دانکن، اختلاف معنی‌داری با یکدیگر در سطح احتمال ۱ درصد ندارند.

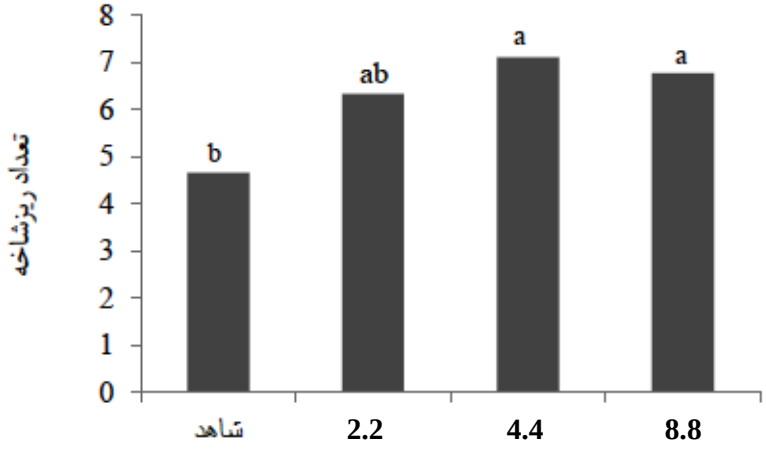
مشاهده گردید (نمودار ۲). بین تیمار شاهد و ۲/۲ میکرومولار BAP تفاوت معنی‌دار مشاهده نگردید. غلظت ۴/۴ میکرومولار BAP بهترین نتیجه را برای پرآوری نشان داد ولی کاربرد غلظت‌های بالاتر باعث عارضه شیشه‌ای شدن نیز شد. ارتباط مستقیم بین افزایش سطوح سیتوکینین و شیشه‌ای شدن به علت تقسیمات سریع سلولی و جذب بیش از حد آب می‌باشد (اورس و همکاران[1]، ۱۹۸۸). نتایج تحقیقات وانگ[2] (۲۰۰۹) در پایه *Vitis champini* رقم Dog Ridge کشت شده در دو نوع محیط کشت پایه MS و WPM حاوی BAP (غلظت‌های صفر، ۴/۴ و ۸/۸ میکرومولار) نشان داد که ریزنمونه‌ها در محیط‌های MS با ۴/۴ و ۸/۸ میکرومولار BAP، بدون توجه به غلظت BAP، پرآوری بهتری داشتند که با نتایج بدست آمده از این پژوهش مطابقت داشت.

نتایج مقایسه میانگین داده‌ها نشان داد که حداکثر تعداد ریزشاخه با میانگین ۷/۱۰ ریزشاخه در هر تیمار در محیط کشت 2MS با تنظیم‌کننده رشد گیاهی TDZ در سطح ۴/۴ میکرومولار و حداقل تعداد ریزشاخه با میانگین ۴/۶۶ ریزشاخه در هر تیمار در محیط کشت 2MS فاقد تنظیم‌کنند رشد گیاهی (شاهد) مشاهده گردید (نمودار ۳). بین تیمار شاهد با تیمار ۲/۲ میکرومولار تفاوت معنی‌دار مشاهده نگردید.

مقایسه اثر نوع و غلظت تنظیم‌کننده رشد گیاهی و اثر متقابل آنها نشان داد نوع و غلظت تنظیم‌کننده رشد گیاهی بر طول شاخساره تأثیر معنی‌داری نداشت ولی اثر متقابل نوع و غلظت تنظیم‌کننده رشد گیاهی بر تعداد گره تأثیر معنی‌داری داشت. نتایج مقایسه میانگین داده‌ها نشان داد که حداکثر تعداد گره با میانگین ۹/۲۲ در محیط حاوی تنظیم‌کننده رشد گیاهی BAP در سطح ۲/۲ میکرومولار و حداقل تعداد گره با میانگین ۳/۹۹ در محیط فاقد تنظیم کننده رشد گیاهی (شاهد) مشاهده گردید (جدول ۱). بین تیمار BAP در سطوح ۲/۲ و ۸/۸ میکرومولار اختلاف معنی‌دار مشاهده نگردید. نتایج نشان می‌دهد که تولید گره بیشتر تحت تأثیر BAP است تا TDZ. کاربرد غلظت‌های زیاد BAP با تشدید رقابت بین جوانه‌های روی ریزنمونه، موجب تأثیر بازدارندگی در رشد ریزشاخه‌ها و تشکیل گره می‌شود (اورس و همکاران، ۱۹۸۸). نتایج تحقیقات یومبی و همکاران[3] (۲۰۰۶) در پرآوری شاخساره‌های موز (*Musa sapientum*) نشان داد که تیدیازورون تأثیر معنی داری در اندازه طول ریزشاخه، تعداد گره و میانگره نداشت که با نتایج بدست آمده از این پژوهش مطابقت داشت.

مقایسه اثر نوع و غلظت تنظیم‌کننده رشد گیاهی و اثر متقابل آنها نشان داد نوع تنظیم‌کننده رشد

1. Evers *et al*.
2. Wang
3. Youmbi *et al*.



نمودار ۳- اثر غلظت تنظیم‌کننده رشد گیاهی TDZ بر تعداد ریزشاخه در پایه سیب MM_{111} در محیط کشت 2MS.
میانگین‌هایی که با حروف مشترک، بر اساس آزمون (چند دامنه‌ای) دانکن، اختلاف معنی‌داری با یکدیگر در سطح احتمال ۱ درصد ندارند.

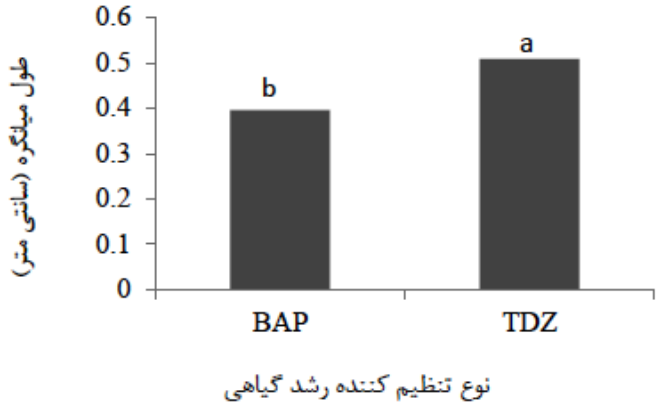
جدول ۱- مقایسه میانگین اثر متقابل نوع و غلظت تنظیم‌کننده رشد گیاهی بر تعداد گره در پایه سیب MM_{111} در محیط کشت 2MS

تعداد گره	نوع و غلظت تنظیم‌کننده‌رشد گیاهی
۳/۹۹^{c}	Control
۹/۲۲^{a}	BAP + 2.2 µM
۶/۲۱^{bc}	BAP + 4.4 µM
۷/۴۴^{ab}	BAP + 8.8 µM
۵/۱۰^{c}	TDZ + 2.2 µM
۴/۷۷^{c}	TDZ + 4.4 µM
۵/۱۰^{c}	TDZ + 8.8 µM

میانگین‌هایی که در هر ستون با حروف مختلف مشخص شده‌اند، بر اساس آزمون (چند دامنه‌ای) دانکن، اختلاف معنی‌داری با یکدیگر در سطح احتمال ۵ درصد دارند.

گیاهی بر طول میانگره تأثیر معنی‌داری داشت. با مقایسه میانگین اثر نوع تنظیم‌کننده رشد گیاهی، حداکثر طول میانگره با میانگین ۰/۵۰ سانتی‌متر در محیط کشت حاوی TDZ و حداقل طول میانگره با میانگین ۰/۳۹ سانتی‌متر در محیط کشت حاوی BAP مشاهده گردید (نمودار ۴).

با مقایسه اثر غلظت تنظیم‌کننده رشد گیاهی BAP، حداکثر طول میانگره با میانگین ۰/۵۳ سانتی متر در محیط کشت فاقد تنظیم‌کننده رشد گیاهی



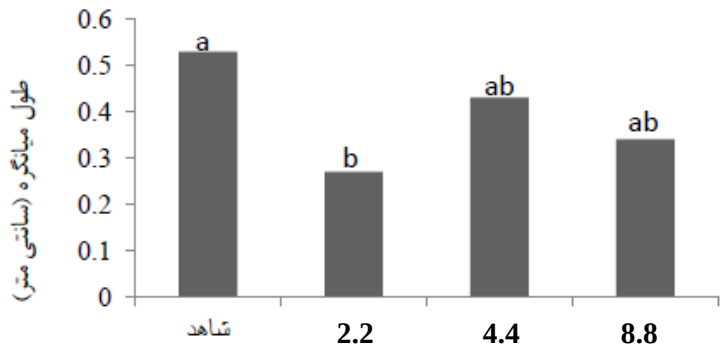
نمودار ۴- اثر نوع تنظیم‌کننده رشد گیاهی بر طول میانگره در پایه سیب MM_{111} در محیط کشت 2MS.
میانگین‌هایی که با حروف مشترک بر اساس آزمون (چند دامنه‌ای) دانکن، اختلاف معنی‌داری با یکدیگر در سطح احتمال ۱ درصد ندارند.

(شاهد) و حداقل طول میانگره با میانگین ۰/۲۷ سانتی‌متر در محیط کشت حاوی تنظیم‌کننده رشد گیاهی BAP در سطح ۲/۲ میکرومولار مشاهده گردید (نمودار ۵). بطور کلی نتایج نشان داد که میزان باززایی بر میانگین طول میانگره تأثیرگذار است. بطوری که تیمارهایی که میزان باززایی کمتری داشتند، از میانگین طول میانگره بیشتری برخوردار بودند. تفاوت در سن فیزیولوژیک ریزنمونه، پاسخ‌های مختلف در بیان ژن ریزنمونه به تنظیم‌کننده رشد به کار رفته، سطوح داخلی تنظیم‌کننده رشد درون‌زا و سایر عوامل دخیل بر اندام‌زایی درون شیشه‌ای مؤثر می‌باشد (زمانزاده و همکاران، ۱۳۸۹). می‌توان نتیجه گرفت عواملی که در افزایش تعداد و طول ریزشاخه موثر بوده‌اند بر میانگین طول میانگره‌ها نیز تأثیرگذار هستند. نتایج تحقیقات خدایی چگنی و همکاران (۱۳۹۰) در پایه‌های همگروه گلابی OH×F333 و OH×F69 نشان داد که بیشترین طول میانگره در غلظت ۱ میلی‌گرم در لیتر BAP مشاهده گردید که با نتایج بدست آمده از این پژوهش مطابقت نداشت.

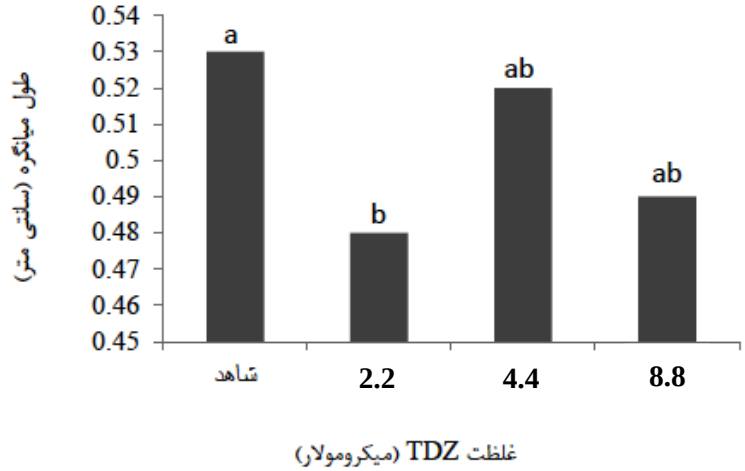
با مقایسه اثر غلظت تنظیم‌کننده رشد گیاهی TDZ، حداکثر طول میانگره با میانگین ۰/۵۳ سانتی‌متر در محیط کشت فاقد تنظیم‌کننده رشد گیاهی (شاهد) و حداقل طول میانگره با میانگین ۰/۴۸ سانتی‌متر در محیط کشت حاوی تنظیم‌کننده رشد گیاهی TDZ در سطح ۲/۲ میکرومولار مشاهده گردید (نمودار ۶).

ارزیابی توان ریشه‌زایی (تعداد و طول ریشه در مرحله سه روز تاریکی)

تجزیه واریانس تأثیر نوع محیط کشت پایه، نوع و غلظت تنظیم‌کننده رشد گیاهی نشان داد که اثرات اصلی این فاکتورها تأثیر معنی‌داری بر تعداد و طول ریشه نداشتند ولی اثر متقابل نوع محیط کشت پایه، نوع و غلظت تنظیم‌کننده رشد گیاهی تأثیر معنی‌داری بر تعداد و طول ریشه داشت. با مقایسه میانگین اثر متقابل نوع محیط کشت پایه، نوع و سطوح تنظیم



نمودار ۵- اثر غلظت تنظیم‌کننده رشد گیاهی BAP بر طول میانگره در پایه سیب MM_{111} در محیط کشت 2MS.
میانگین‌هایی که با حروف مشترک، بر اساس آزمون (چند دامنه‌ای) دانکن، اختلاف معنی‌داری با یکدیگر در سطح احتمال ۵ درصد ندارند.



نمودار ۶- اثر غلظت تنظیم‌کننده رشد گیاهی TDZ بر طول میانگره در پایه سیب MM_{111} در محیط کشت 2MS.
میانگین‌هایی که با حروف مشترک بر اساس آزمون (چند دامنه‌ای) دانکن، اختلاف معنی‌داری با یکدیگر در سطح احتمال ۵ درصد ندارند.

کننده رشد گیاهی، حداکثر تعداد ریشه با میانگین ۲/۶۵ ریشه در هر تیمار و طول ریشه با میانگین ۲/۳۹ سانتی‌متر در محیط کشت MS حاوی تنظیم کننده رشد گیاهی NAA در سطح ۸/۰۵ میکرومولار و حداقل تعداد و طول ریشه با میانگین صفر (فاقد ریشه‌زایی) در محیط کشت MS و ½MS فاقد تنظیم‌کننده رشد گیاهی، محیط کشت MS حاوی تنظیم‌کننده رشد گیاهی NAA در سطوح ۱۶/۱۱ و ۲۴/۱۶ میکرومولار، محیط کشت ½MS حاوی تنظیم‌کننده رشد گیاهی IBA در سطوح ۱۴/۷ و

۲۲/۰۵ میکرومولار و محیط کشت ½MS حاوی تنظیم‌کننده رشد گیاهی NAA در سطوح ۸/۰۵ و ۲۴/۱۶ مشاهده گردید (جدول ۲). افزایش تعداد و طول ریشه در محیط کشت MS می‌تواند به دلیل تأمین مناسب مواد غذایی جهت رشد بیشتر ریشه‌ها باشد. با دو برابر شدن غلظت نمک‌ها در محیط کشت MS نسبت به ½MS مواد غذایی بیشتری برای ریشه‌ها فراهم می‌گردد. NAA میزان تشکیل ریشه را نسبت به IBA بیشتر تحت تأثیر قرار می‌دهد و در غلظت‌های بیشتر IBA و NAA ریشه‌های به وجود آمده متورم و شکننده‌تر بودند. همچنین با کاهش غلظت اکسین میزان تشکیل کالوس نیز کاهش یافت. نتایج نشان داده است که با افزایش غلظت اکسین، طول ریشه‌های تولید شده کوتاهتر می‌گردد (زمانزاده و همکاران، ۱۳۸۹). هر ژنوتیپ دارای مقادیر خاصی از هورمون‌های درونی بوده و غلظت تیمارهای بکار گرفته شده بیشترین تأثیر را در چگونگی عملکرد و واکنش هورمون‌های درونی نسبت به آنها دارد (سرین و همکاران[1]، ۲۰۰۵). نتایج تحقیقات گنجی مقدم و همکاران (۲۰۰۸) بر روی محلب (*Prunus mahaleb*) نشان داد که محیط کشت MS به عنوان بهترین محیط کشت و غلظت ۰/۸ میلی‌گرم در لیتر IBA بهترین نتایج را برای ریشه‌زایی داشته است که با نتایج بدست آمده از این پژوهش مطابقت نشان نداد.

تعداد و طول ریشه در مرحله چهار روز تاریکی

تجزیه واریانس تأثیر نوع محیط کشت پایه، نوع و غلظت تنظیم‌کننده رشد گیاهی نشان داد که اثرات اصلی این فاکتورها تأثیر معنی‌داری برتعداد و طول ریشه نداشتند ولی اثر متقابل نوع محیط کشت پایه، نوع و غلظت تنظیم کننده رشد گیاهی تأثیر معنی‌داری بر تعداد و طول ریشه داشت. نتایج مقایسه میانگین داده‌ها نشان داد که حداکثر تعداد ریشه با میانگین ۱/۶۲ ریشه در هر تیمار و طول ریشه با میانگین ۱/۸۵ سانتی‌متر در محیط کشت MS حاوی تنظیم‌کننده رشد گیاهی IBA در سطح ۱۴/۷ میکرومولار و حداقل تعداد و طول ریشه با میانگین صفر (فاقد ریشه‌زایی) در محیط کشت MS و ½MS فاقد تنظیم‌کننده رشد گیاهی، محیط کشت MS حاوی تنظیم‌کنند رشد گیاهی IBA در سطح ۲۲/۰۵ میکرومولار و NAA در سطح ۲۴/۱۶ میکرومولار، محیط کشت ½MS حاوی تنظیم‌کننده رشد گیاهی IBA در سطوح ۱۴/۷ و ۲۲/۰۵ میکرومولار و NAA در سطوح ۱۶/۱۱ و ۲۴/۱۶ میکرومولار و محیط کشت ½MS حاوی تنظیم‌کننده رشد گیاهی NAA در سطح ۸/۰۵ میکرومولار مشاهده گردید (جدول ۲). غلظت زیاد اکسین موجب تحریک تولید ریشه‌های ثانویه در ریشه می‌گردد. کمبود مواد معدنی از جمله نیتروژن، فسفر، منیزیم، پتاسیم، کلسیم و روی موجب کاهش ریشه‌زایی می‌گردد (جلیلی‌مرندی، ۱۳۸۶). غلظت ۱۴/۷ میکرومولار IBA غلظت مناسب برای پاسخ به ریشه‌زایی می‌باشد در غلظت بیشتر از این

1. Sorin *et al*.

جدول ۲- اثر متقابل نوع محیط کشت پایه، نوع و غلظت تنظیم‌کننده رشد گیاهی بر تعداد و طول ریشه در پایه سیب MM_{111}

نوع محیط کشت پایه، نوع و غلظت تنظیم‌کننده رشد گیاهی	سه روز تاریکی		چهار روز تاریکی	
	تعداد ریشه	طول ریشه (سانتی‌متر)	تعداد ریشه	طول ریشه (سانتی‌متر)
MS	۰^{f}	۰^{e}	۰^{c}	۰^{e}
MS + ۷/۳۵ µM IBA	۱/۲۸^{c}	۱/۵۶^{c}	۱/۰۵^{ab}	۱/۲۳^{c}
MS + ۱۴/۷ µM IBA	۱/۶۲^{b}	۲/۰۲^{b}	۱/۶۲^{a}	۱/۸۵^{a}
MS + ۲۲/۰۵ µM IBA	۰/۸۷^{d}	۰/۷۹^{d}	۰^{c}	۰^{e}
MS + ۸/۰۵ µM NAA	۲/۶۵^{a}	۲/۳۹^{a}	۱/۵۹^{a}	۱/۴۷^{b}
MS + ۱۶/۱۱ µM NAA	۰^{f}	۰^{e}	۰/۵۷^{bc}	۱/۲۱^{c}
MS + ۲۴/۱۶ µM NAA	۰^{f}	۰^{e}	۰^{c}	۰^{e}
½MS	۰^{f}	۰^{e}	۰^{c}	۰^{e}
½MS + ۷/۳۵ µM IBA	۱/۲۳^{c}	۰/۸۴^{d}	۱/۰۵^{ab}	۰/۹۰^{d}
½MS + ۱۴/۷ µM IBA	۰^{f}	۰^{e}	۰^{c}	۰^{e}
½MS + ۲۲/۰۵ µM IBA	۰^{f}	۰^{e}	۰^{c}	۰^{e}
½Ms + ۸/۰۵ µM NAA	۰^{f}	۰^{e}	۰^{c}	۰^{e}
½MS + ۱۶/۱۱ µM NAA	۰/۵۷^{e}	۰/۷۱^{d}	۰^{c}	۰^{e}
½MS + ۲۴/۱۶ µM NAA	۰^{f}	۰^{e}	۰^{c}	۰^{e}

میانگین‌هایی که در هر ستون با حروف مختلف مشخص شده‌اند، بر اساس آزمون (چند دامنه‌ای) دانکن، اختلاف معنی‌داری با یکدیگر در سطح احتمال ۱ درصد دارند.

مقدار میزان تشکیل کالوس افزایش می‌یابد و در نتیجه ریشه‌زایی را تحت تأثیر قرار می‌دهد. نتایج تحقیقات نورمحمدی و همکاران (۱۳۹۴) در پایه‌های گلابی نشان داد که محیط کشت MS همراه با ۱ میلی‌گرم در لیتر IBA، بیشترین تأثیر را در تعداد و طول ریشه‌ها داشت که با نتایج پژوهش حاضر مطابقت نداشت.

نتیجه‌گیری کلی

با توجه به نتایج به دست‌آمده از آزمایش اول، محیط کشت 2MS حاوی ۱ میلی‌گرم بر لیتر بنزیل آدنین با میانگین ۱۳/۶۶ ریزشاخه به ازای هر ریزنمونه، مطلوبترین محیط برای پرآوری سیب MM_{111} بود. بر اساس نتایج آزمایش دوم، بنزیل آمینوپورین تأثیر بیشتری نسبت به تیدیازورون روی پرآوری، تعداد گره و میانگره داشت ولی طول میانگره بیشتر تحت تأثیر تیدیازورون قرار گرفت. بیشترین پرآوری با میانگین ۸/۶۶ ریزشاخه به ازای هر ریزنمونه در محیط 2MS حاوی ۴/۴ میکرومولار BAP مشاهده گردید. در آزمایش سوم با هدف ارزیابی توان ریشه‌زایی، تیمار سه روز تاریکی نسبت به تیمار چهار روز تاریکی نتایج مطلوبتری داشت. سه روز تاریکی،

محیط کشت MS، تنظیم‌کننده رشد NAA در غلظت ۸/۰۵ میکرومولار بهترین شرایط برای ریشه زایی این پایه بود. بر اساس نتایج مربوط به بررسی اثر نوع بستر کشت بر سازگاری پایه سیب MM_{111} مشخص شد که نوع بستر کشت تأثیر معنی‌داری بر سازگاری پایه سیب MM_{111} نداشت.

سپاسگزاری

بدین وسیله از مدیریت شرکت دانش بنیان اروم زیست تاک به منظور تأمین گیاهچه استریل سیب MM_{111} تشکر و قدردانی می‌شود. از همکاری مسئول آزمایشگاه خانم مهندس آقایی و کلیه کارکنان آزمایشگاه کشت بافت گروه علوم باغبانی دانشکده کشاورزی دانشگاه ارومیه سپاسگزاری می‌شود.

منابع

جلیلی‌مرندی، ر. ۱۳۸۶. ازدیاد گیاهان. انتشارات جهاد دانشگاهی واحد استان آذربایجان‌غربی، ۴۶۹ص.

خدایی‌چگنی، ف.، عبداللهی، ح.، ارشادی، ا. و اثنی‌عشری، م. ۱۳۹۰. تعیین پروتکل ریزازدیادی برای پایه‌های کلونی گلابی OH×F333 و OH×F69. مجله تولید نهال و بذر، ۲۷(۳): ۲۹۷-۳۱۲.

رادنیا، ح. ۱۳۷۵. پایه‌های درختان میوه (تألیف روی‌سی‌روم و روبرت اف. کارلسون). ویرایش اول. انتشارات آموزش کشاورزی، ۶۳۷ ص.

زمانزاده، ح.، احسانپور، ا.ا. و امینی. ف. ۱۳۸۹. بررسی میزان اکسین در گیاهان باززائی شده از ریشه‌های تراریخت تنباکو حاوی Ri- T DNA. مجله سلول و بافت، ۱(۲): ۱-۷.

کلاته جاری، س. ۱۳۸۵. بررسی واکنش دو رقم انگور بیدانه سفید و شاهرودی به شرایط کشت درون شیشه. مجله علوم کشاورزی ایران، ۲: ۲۰۵-۲۱۵.

محسنی‌آذر، م.، ناظری، س. قدیم‌زاده، م. و ملبوبی، م.ا. ۱۳۸۸. اثر محیط کشت و برخی ترکیبات بیوشیمیایی بر پرآوری پایه پاکوتاه سیب گمی الماسی (*Malus domestica* Borkh). مجله فناوری تولیدات گیاهی، ۱(۲): ۳۳-۴۱.

مهدویان، م.، بوذری، ن. و عبداللهی، ح. ۱۳۸۹. اثر محیط کشت و تنظیم‌کننده‌های رشد بر پرآوری و ریشه‌زایی پایه رویشی محلب (سنت لوسی ۶۴). مجله به‌نژادی نهال و بذر، ۲۶(۱): ۱۵-۲۶.

نورمحمدی، ن.، عبداللهی، ح.، معینی، ا. و روح الامین، ا. ۱۳۹۴. اثرات محیط رشد و منبع آهن بر ریزازدیادی و ریشه زایی پایه‌های نیمه‌پاکوتاه گلابی پیرودوارف و OH×F87. مجله به‌نژادی نهال و بذر، ۳۱(۲): ۲۶۵-۲۷۸.

Amiri, E. and Elahinia, A. 2011. Optimization of medium composition for apple rootstocks. African Journal of Biotechnology, 10(18): 3594-3601.

Androu, P. and Marin. J.A. 2005. *In vitro* culture establishment and multiplication of the prunus Rootstock Adesto 101 (*P. insititia* L) as affected by the type of propagation of the donor plant and by the culture medium composition. Scientia Horticulturae, 106(2): 258-267.

Compton, M. and Gray, D. 1994. Micropropagation of southern home hybrid grape. 107th annual meeting of the Florida state Horticultural Society Orlando. Florida. Proceeding of the Florida state Horticultural Society, 107: 308-310.

Evers, P.W., Donkers, J., Prat, A. and Vermeer, E. 1988. Micropropagation of forest trees through tissue culture: 98-102. In: Bonga, J.M., Aderkas,p. (Eds). *In vitro* culture of trees. Centre for Agricultural Publishing and Documentation, 236 p.

Ganji Moghadam, A., Bolandi, A. and Anahid, S. 2008. *In vitro* propagation of Four dwarf genotype selected of *Prunus mahlab*. Research and development on natural resources, 21(2): 54-61.

George, E.F., Hall, M.A. and De Klerk, G.D. 2008. The components of plant tissue culture media I: macro-and micro-nutrients. Springer, Netherlands, pp: 65-113.

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* Cellular and Developmental Biology-Plant, 48: 403-410.

Jaskani, M.J., Abbas, H., Sultana, R., Khan, M.M., Qasim, M. and Khan, I.A. 2008. Effect of growth hormones on micropropagation of *Vitis vinifera* L. cv. Perlette. Pakistan Journal of Botany, 40(1): 105-109.

Lane, W.D., Looney, N.E. and Mage, F. 1982. A selective tissue culture medium for growth of compact (dwarf) mutants of apple. Theoretical and Applied Genetics. 61(3): 219-223.

Murashige, T. and Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiologia plantarum, 15: 473-497.

Nobre, J. and Romano, A. 1997. *In vitro* cloning of *Ficus carica* L. adult trees. In I International Symposium on Fig, 480: 161-164.

Qamar, M., Tabassum qureshi, S., Ahmed khan, I. and Raza, S. 2015. Optimization of in vitro multiplication for exotic banana (*Musa* spp.) in Pakistan. African Journal of Biotechnology, 14(24): 1989-1995.

Quoirin, M. and Lepoivre, P. 1977. Improved medium for *in vitro* culture of *Prunus* sp. Acta Horticulturae, 78: 437-442.

Ramage, C.M. and Williams, R.R. 2002. Mineral nutrition and plant morphogenesis. *In Vitro* Cellular and Developmental Biology, 38: 116-124.

Reed, B.M., DeNoma, J., Wada, S. and Postman, J. 2013. Micropropagation of pear (*Pyrus* sp). Protocols for micropropagation of selected economically important horticultural plants, pp 3-18.

Singh, B.D. 2005. Plant cell and tissue culture - Biotechnology Fundamental and applications (pp.332-425). New Dehli. Kalyani Publishers.

Sorin, C. Bussell, J.D. Camus, I. Ljung, K. Kowalczyk, M. Geiss, G. Mckhann, H. Garcion, Ch. Vaucheret, H. and Sandberg, G. 2005. Auxin and light control of adventitious rooting in *Arabidopsis* require ARGONUTE1. American Society of Plant Biologists, 17: 1343-1359.

Wang, K.Y.I. 2009. *In vitro* culture of dog ridge grapevine. M.Sc. thesis, Faculty of Agriculture Texas A & M University, USA.

Werner, E.M. and Boe, A.A. 1980. *In vitro* propagation of M7 apple rootstoock. Horticultural Science, 15: 509-510.

Youmbi, E. Ella, B. and Tomekpe, K. 2006. Effect of thidiazuron on *in vitro* proliferation Capacityes of some banana (*Musa* spp.) cultivars with weak multiplication potential. Agricultural Journal of Akdeniz University, 19(2): 255-259.

Optimization of tissue culture conditions for micropropagation of MM_{111} apple rootstocks

Atefeh Moshari Nasirkandi*[1], Bahman Hosseini[2], Alireza Farokhzad[3], Lotfali Naseri[4] and Khadija Agaei[5]

1. Former M.Sc. Student of Biotechnology and Mulecular Genetics of Horticultural Crops, Department of Horticultural Sciences, Faculty of Agriculture, Urmia University
2,4. Associate proffesor, Department of Horticultural Sciences, Faculty of Agriculture, Urmia University
3. Assistant proffesor, Department of Horticultural Sciences, Faculty of Agriculture, Urmia University
5. B.S. Horticulture, Department of Horticultural Sciences, Faculty of Agriculture, Urmia University

(Received: Dec. 18, 2017 - Accepted: Feb. 13, 2018)

Abstract

Plant tissue culture technology is used for large-scale multiplication of the plants. I*n vitro* propagation methods of MM_{111} apple rootstock, often produce plants with accelerated growth. This research was performed with the aim of optimizing *in vitro* propagation conditions for MM_{111} rootstocks and survey effect of basal media and different plant growth regulators on proliferation and rooting in three separate experiments. In first experiment; the effect of five different basal media culture including, MS, ½MS, 2MS, WPM and B_5, on proliferated shoot number and length, in second experiment; the effects of plant growth regulators BAP and TDZ in various concentrations (0, 2.2, 4.4 and 8.8 µM) on shoot number, shoot length, node number, internode number and internode length, in third experiment; the effect of two basal media types (MS and ½MS) supplemented with two auxin types in different concentrations (0, 7.35, 14.7 and 22.05 µM) of IBA and in different concentrations of NAA (0, 8.05, 16.11 and 24.16 µM) during darkness for three and four days, on root number and root length were studied. Hardening of the rootstocks in coarse perlite, fine perlite, perlite and peat moss (1:1) and peat moss separately was surveyed. According to the results, highest proliferation rate (13.66 shoots per explant) was observed in 2MS medium. In the second experiment, BAP was more effective than TDZ on proliferation rate and number of nodes, and reduced internode length. The highest proliferation rate (8.66 shoots per explant) was observed in BAP (4.4 µM). According to the results obtained from third experiment, The highest root number (2.65 root per explant) was observed in MS medium supplemented with 8.05 µM NAA.

Keywords: Culture medium, Hardening, *In vitro* propagation, Rootstock

* Corresponding author E-mail: ati.moshari@yahoo.com