مقاله پژوهشی

بررسی درون‌شیشه‌ای امکان شاخه‌زایی و ریشه‌زایی پایه‌های دورگ هلو و بادام

حسن ماستری‌فراهانی[۱]، یاور شرفی[۲]* و علی ایمانی[۳]

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۱۱/۱۴- تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۱۲/۲)

چکیده

پایه‌های دورگ بادام و هلو در توسعه تجاری پرورش بادام و هلو در مناطق وسیعی از جهان بویژه مناطق مثل ایران، از اهمیت بالایی برای اصلاحگران و باغداران برخوردار است. در این مطالعه امکان بهینه‌سازی سطوح مواد تنظیم کننده رشد گیاهی در محیط کشت درون‌شیشه‌ای جهت پرآوری و ریشه‌زایی مناسب دو نوع پایه هیبرید هلو و بادام شامل GF677 و TT (از ژنوتیپ‌های امیدبخش برنامه‌های اصلاحی موسسه تحقیقات باغبانی کشور) در قالب دو آزمایش فاکتوریل جداگانه مورد مطالعه قرار گرفت. آزمایش اول جهت شناسایی بهترین سطوح مواد تنظیم کننده رشد گیاهی BA و IAA جهت پرآوری و آزمایش دوم جهت شناسایی سطوح مطلوب IAA و NAA برای ریشه‌زایی مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که تیمار ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر BA و ۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر IAA بهترین اثر را در پرآوری داشتند. همچنین، IAA با سطح یک میلی‌گرم در لیتر بهترین اثر را در صفات درصد و تعداد ریشه‌زایی و وزن تر و خشک ریشه داشته و NAA بیشترین طول ریشه را در سطح ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر ایجاد نمود. بطورکلی سطح یک میلی‌گرم در لیتر IAA می‌تواند غلظت مؤثری برای مرحله ریشه‌زایی پایه‌های دورگ مورد مطالعه در نظر گرفته شود.

کلمات کلیدی: پایه‌های دورگ، پرآوری، ریشه‌زایی، مواد تنظیم کننده رشد گیاهی

۱- دانشجوی سابق، گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شاهد، تهران

۲- استادیار گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شاهد، تهران

۳- دانشیار گروه علوم باغبانی، موسسه اصلاح نهال و بذر، کرج

* پست الکترونیک: y.sharafi@shahed.ac.ir

مقدمه

پایه‌های درختان میوه در تأمین نیازهای کشت در اولویت خاصی قرار دارند. به دلیل تفرق صفات بذر در درختان میوه حاصل از دانهال‌ها، استفاده از پایه‌های همگروهی جهت ایجاد باغات یکنواخت فوق‌العاده مهم می‌باشد (هارتمن[1] و همکاران، ۲۰۱۷؛ احمد[2] و همکاران، ۲۰۰۳ و اکبری[3] و همکاران، ۲۰۰۷). در همه کشورها بر اساس شرایط موجود، برنامه‌های اصلاح پایه‌ها در جهت توسعه پایه‌ها با صفات مطلوب و با معیارهای مختلف طراحی و اجرا می‌شوند. پایه‌های رویشی با القای زود باردهی، پاکوتاهی و در نهایت عملکرد بالا نسبت به پایه‌های بذری ترجیح داده می‌شوند (آنتونوپولون[4] و همکاران، ۲۰۰۷؛ عرب[5] و همکاران، ۲۰۱۴؛ عرب و همکاران[6]، ۲۰۱۶؛ بارتولینی[7] و همکارن، ۲۰۰۰؛ کاس[8] و همکاران، ۲۰۰۴ و داریون[9] و همکاران، ۱۹۹۳). با توجه به مزایای فراوان پایه‌های همگروهی و افزایش کیفیت و کمیت محصول در اثر استفاده از آنها، استفاده از پایه‌های همگروهی روز به روز در حال افزایش است. استفاده از دورگ‌گیری بین گونه‌ای در اصلاح ارقام و پایه‌های درختان میوه جهت بدست آوردن هیبریدهای مناسب برای خاک‌ها و مناطق مختلف از مهمترین عملیات باغبانی بوده و به ویژه برای درختان میوه هسته‌دار از چند دهه پیش در کشورهای پیشرفته معمول شده و راهگشای بسیاری از مشکلات درختان میوه هسته‌دار شده است (بونگا[10] و همکاران، ۱۹۸۲؛ کاس و همکاران، ۲۰۰۴؛ دیماسی و تیو[11]، ۱۹۹۵؛ دوبرانشکا و تکسرا[12]، ۲۰۱۰؛ ارسیسلی[13] و همکاران، ۲۰۰۲؛ فابیجان[14] و همکاران، ۱۹۸۱؛ جورج[15] و همکاران، ۲۰۰۸ و ضمیر[16] و همکاران، ۲۰۰۴). هر ساله چندین پایه همگروهی به خصوص از طریق دورگ‌گیری بین گونه‌ای مختلف در جنس *Prunus* تهیه و معرفی می‌گردد که هر یک دارای خصوصیات منحصر به فردی هستند. پایه‌های هیبرید هلو و بادام دارای ویژگی‌هایی مثل مقاومت خوب در برابر شرایط نامساعد محیطی، مقاومت به نماتد گره ریشه و سازگاری پیوند با طیف وسیعی از ارقام هلو و بادام همچنین، برخی از ارقام آلو و زردآلو است (بادونی[17] و همکاران، ۲۰۱۰ و شبّیر[18] و همکاران، ۲۰۰۹).

بطور کلی می‌توان گفت مهمترین راهکار مؤثر در تکثیر انبوه پایه‌های مناسب و یکنواخت، استفاده از تکثیر همگروهی با کمک روش‌های کشت درون‌شیشه‌ای بویژه ریزازدیادی است (دوبرانشکا و تکسرا، ۲۰۱۰ و ضمیر و همکاران، ۲۰۰۴). در این روش، مستقل از فصول مختلف سال می‌توان در هر زمانی گیاهان را تکثیر نموده و با سرعت بالا نهال مطلوب مورد نیاز را تولید کرد (بونگا و همکاران، ۱۹۸۲). با توجه به اهمیت فوق‌العاده پایه‌های همگروهی بویژه پایه‌های دورگ، بکارگیری روش‌هایی که بتواند در زمان کوتاه‌تر، فضای کوچک‌تر و هزینه کمتر تکثیر نمود از اهمیت خاصی برخوردار است. ریزازدیادی روشی مناسب با کارایی بالا برای ازدیاد ارقام در مدت زمان کوتاه‌تر، کیفیت بالاتر و با قیمت مناسب و قابل رقابت، برای احداث باغات یکنواخت با عملکرد بالا می‌باشد (پت[19] و همکاران، ۲۰۰۶؛ سن[20] و همکاران، ۲۰۱۲؛ تورپ[21] و همکاران، ۲۰۰۸ و ضمیر و همکاران، ۲۰۰۴). در اکثر درختان میوه، حداقل دو تا سه ماه تا ریشه‌دار شدن قلمه‌ها زمان لازم است ولی با استفاده از فنون کشت درون شیشه‌ای می‌توان این مدت را به حداقل زمان ممکن رساند. در عین حال با ریزازدیادی می‌توان ریزنمونه‌ها را با تعداد زیاد و در یک مکان محدودتر و در محیطی عاری از آلودگی در سطح وسیع تکثیر، کشت و نگهداری نمود و در مدت زمان کمتری اقدام به ریشه‌دار

1. Hartman
2. Ahmed
3. Akbari
4. Antonopoulou
5. Arab
6. Arab and Shekafandeh
7. Bartolini
8. Cos
9. Darion
10. Bonga
11. Dimassi and Theiou
12. Dobránszki and Teixeira
13. Ercisli
14. Fabijan
15. George
16. Zamir
17. Badoni
18. Shabbir
19. Pati
20. Sen
21. Thorpe

کردن نمود (جورج و همکاران، ۲۰۰۸؛ ضمیر و همکاران، ۲۰۰۴). عرب و شکافنده (۲۰۱۶) کوتیلدون‌های بالغ حاصل از بذور رقم GF677 را در محیط کشت حاوی ۲/۵ میکرومول IBA و غلظت‌های مختلف سیتوکینین (۰، ۴، ۸، ۱۶ و ۳۲ میکرومول) کشت نموده و شاخه‌زایی و ریشه‌زایی را بررسی و گزارش کردند که بیشترین درصد ریشه‌زایی در تیمار تاریکی اولیه همراه با دو میلی‌گرم در لیتر IBA در محیط کشت MS بدست آمد. فوتوپلوس و سوتیروپلوس[1] (۲۰۰۵)، ریشه‌زایی درون شیشه‌ای پایه دورگ بادام و هلو بنام PR 204/84 را تحت تیمارهای نوری و ترکیبات مواد تنظیم کننده رشد گیاهی بررسی نموده و گزارش کردند که دوره تاریکی، نسبت و غلظت ترکیبات مواد تنظیم‌کننده رشد گیاهی محیط کشت بر ریشه‌زایی موثر است.

عرفانی[2] و همکاران (۲۰۱۷)، اثر نوع محیط کشت (MS، DKW و WPM)، ترکیبات مواد تنظیم‌کننده رشد گیاهی سیتوکینین BA (۰/۵، ۱ و ۲ میلی‌گرم در لیتر) و منبع کربن (سه درصد سوربیتول و ساکارز) را بر پرآوری و ریشه‌زایی رقم Garnem (دورگ هلو و بادام) بررسی کردند. ایشان نتیجه گرفتند که رقم Garnem در محیط کشت 1/2 MS همراه با دو میلی‌گرم در لیتر IBA و منبع کربن سوربیتول بهترین پرآوری و ریشه‌زایی را دارد. کوسه و کانیل[3] (۲۰۱۵) و همچنین رضایی و حسین‌پور[4] (۲۰۱۵) در مطالعه مشابه روی همین رقم نتایج تقریباً یکسانی را گزارش نمودند.

عرب و همکاران (۲۰۱۴)، اثر نوع محیط کشت (MS و QL)، نوع سیتوکینین (BA و BAP) و غلظت‌های مختلف سیتوکینین (۰، ۰/۵، ۰/۷۵، ۱ و ۱/۲۵ میلی‌گرم در لیتر) را بر پرآوری رقم G × N15 (هیبرید هلو و بادام)، بررسی کردند. نتایج نشان داد که بیشترین شاخه‌زایی (۸/۵) در محیط کشت M با یک میلی‌گرم در لیتر سیتوکینین BAP بدست آمد.

با توجه به اهمیت تکثیر انبوه پایه‌های رویشی، بهینه‌سازی ریزازدیادی پایه‌های هلو و بادام و دستیابی به ریزنمونه‌های با کیفیت و کمیت مطلوب در شرایط کشت درون‌شیشه‌ای، در پژوهش حاضر امکان بهینه‌سازی سطوح مواد تنظیم کننده رشد گیاهی جهت پرآوری و ریشه‌زایی دو نوع پایه شامل GF677 (هیبرید هلو و بادام) و TT (از ژنوتیپ‌های جدید امیدبخش حاصل از برنامه‌های اصلاحی ایران) مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

در این پژوهش از دو پایه GF677 و TT استفاده شد که GF677 دورگ بادام و هلو و TT از ژنوتیپ‌های امیدبخش حاصل از برنامه‌های اصلاحی موسسه تحقیقات باغبانی کشور در ایران می‌باشد که دارای خصوصیات مطلوب مقاومت به شرایط نامساعد اقلیمی ایران هست. ریزنمونه-های گیاهان از ایستگاه تحقیقات باغبانی واقع در جاده محمد شهر (۴۰۰ هکتاری) تهیه شد. آزمایشات درون شیشه‌ای در آزمایشگاه کشت بافت شرکت مزارع نوین ایرانیان متعلق به سازمان اتکا در تهران انجام گرفت. ریز نمونه‌ها از درختان بالغ ده ساله کاملا سالم و با رشد رویشی مناسب تهیه شدند. پژوهش حاضر در قالب دو آزمایش مستقل صورت گرفت. آزمایش اول مربوط به ضدعفونی، استقرار و پرآوری بوده و آزمایش دوم مربوط به ریشه‌زایی بود. در این پژوهش از محیط کشت پایه WPM برای پرآوری و از 1/2 MS برای بررسی ریشه‌زایی استفاده گردید. جهت ضدعفونی نمونه‌ها از آلودگی‌های سطحی و داخلی از هیپوکلریت‌سدیم استفاده گردید. پس از انتقال به آزمایشگاه، برگ‌های اضافی شاخه‌ها حذف شده و جوانه‌های ساقه جداسازی و تک جوانه شدند. پس از آن جوانه‌ها به مدت ۶۰ دقیقه در آب جاری شستشو و در محلول الکل ۷۰ ٪ زیر هود لامینار به مدت ۳۰ ثانیه قرار گرفتند، سپس با آب مقطر استریل شستشو شدند، پس از آن ضدعفونی با هیپوکلریت‌سدیم با ماده فعال ۱/۵ درصد در ۱۵دقیقه انجام شد. سپس نمونه‌های عاری از آلودگی در شیشه‌های حاوی محیط کشت به صورت هر شیشه یک ریزنمونه کشت شدند.

آزمایش پرآوری

در این مرحله پس از رشد جوانه‌های جانبی در ریزنمونه‌های استقرار یافته، هنگامی که شاخه‌های حاصل به میزان دو الی سه سانتی‌متر رشد کرده از ساقه مادری جدا شده و در محیط کشت مناسب هر یک از تیمارهای سطوح مواد تنظیم‌کننده رشد گیاهی مختلف مورد استفاده قرار گرفتند. آزمایش بصورت فاکتوریل در قالب طرح کاملا تصادفی انجام گرفت. فاکتور اول مواد گیاهی در دو سطح (GF677 و TT)،

1. Fotopoulos and Sotiropoulos
2. Erfani
3. Kose and Canli
4. Rezaei and Hoseipour

فاکتور دوم سطوح مواد تنظیم‌کننده رشد گیاهی BA (صفر، ۰/۵، ۱ و ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر) و فاکتور سوم IAA (۰، ۰/۱، ۰/۲ و ۰/۴ میلی‌گرم در لیتر) بود. برای هر کدام از تیمارها، چهار شیشه به عنوان چهار تکرار لحاظ گردید که داخل هر شیشه نیز چهار نمونه گیاهی با اندازه یکسان کشت گردیدند. سپس نمونه‌ها به اتاق رشد منتقل شدند. سپس صفات تعداد برگ، طول ساقه اصلی توسط خط‌کش، تعداد ساقه جانبی، تعداد ریشه، وزن تر کالوس، وزن خشک کالوس، وزن تر گیاهچه و وزن خشک گیاهچه توسط ترازوی حساس با دقت یک هزارم گرم، مورد اندازه‌گیری قرار گرفتند. طول بلندترین شاخساره و میانگین آن در هر شیشه محاسبه و ثبت شد. تعداد برگ‌های بزرگترین شاخه هر نمونه اندازه‌گیری و سپس میانگین هر شیشه ثبت گردید. همچنین، تعداد شاخصاره‌های جانبی داخل هر شیشه و میانگین آن محاسبه و ثبت شد.

آزمایش ریشه‌زایی

پس از اتمام آزمایش پرآوری، شاخه‌های مناسب تکثیر شده با اندازه سه الی چهار سانتی‌متر انتخاب و برای آزمایش ریشه‌زایی مورد استفاده قرار گرفتند. آزمایش به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی انجام شد. فاکتور اول شامل مواد گیاهی در دو سطح (GF677 و TT)، فاکتور دوم و سوم به ترتیب IAA و NAA هر کدام در چهار سطح (۰، ۰/۵، ۱ و ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر) بود. پس از گذشت چهار هفته از کشت، صفات درصد ریشه‌زایی، تعداد ریشه و طول ریشه در هر ریزنمونه ارزیابی و ثبت شد. قابل ذکر است که در این مرحله آزمایش از آهن Fe-EDDHA (آهن قرمز) به میزان ۸۰ میلی‌گرم در لیتر و ساکاروز به میزان ۳۰ گرم در لیتر استفاده گردید و برای هر کدام از تیمارها، چهار شیشه به عنوان چهار تکرار لحاظ گردید و در هر شیشه نیز تعداد ۱۵ ریزنمونه کشت گردید. سپس نمونه‌ها به اتاق رشد مشابه مرحله قبل منتقل شدند. در اتاق رشد، نمونه‌ها در شرایط دمایی متوسط ۲۴ درجه سانتی‌گراد روز و ۱۸ درجه سانتی‌گراد شب و طول روز ۱۶ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی با تشعشع فعال فتوسنتزی (PAR) برابر ۲۵ ژول‌مول بر مترمربع در ثانیه نگهداری شدند. سپس صفات درصد ریشه‌دهی، تعداد روز تا ظهور ریشه، تعداد ریشه، طول ریشه، وزن تر ریشه هر گیاهچه، وزن تر ریشه کل و وزن خشک ریشه مورد اندازه‌گیری قرار گرفتند. تعداد ریشه و میانگین آن نیز با شمارش تعداد ریشه‌های فرعی در هر کدام از ریز نمونه‌های ریشه‌دار شده محاسبه گردید. درصد ریشه از طریق محاسبه نسبت تعداد ریزنمونه‌های ریشه‌دار شده به کل ریزنمونه‌های کشت شده بدست آمد. طول ریشه و میانگین آن از طریق محاسبه طول ریشه‌های گیاهچه‌ها روی کاغذ مدرج بدست آمد. برای اندازه‌گیری وزن تر و خشک نمونه‌ها از ترازوی حساس با دقت یک هزارم گرم استفاده شد. داده‌ها توسط نرم‌افزار SAS ورژن ۹/۱ تجزیه و تحلیل شدند و مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح یک و پنج درصد صورت گرفت.

نتایج و بحث

پرآوری و کیفیت گیاهچه‌ها

باید توجه کرد که در آزمایش‌های فاکتوریل وقتی اثر متقابل فاکتورها معنی‌دار باشد به نتایج اثرات اصلی نمی‌توان مطمئن بود. همچنین، در آزمایش‌های با سه فاکتور وقتی اثر متقابل سه عامل معنی‌دار باشد، حتی اثرات متقابل دو فاکتور نیز اهمیت چندانی ندارد. بنابراین در این بخش اثرات اصلی تک تک فاکتورها و اثرات دو جانبه آورده نشده و بیشتر به اثرات متقابل سه جانبه فاکتورها پرداخته شده است.

تجزیه واریانس اثرات متقابل سه گانه رقم، BA و IAA بر صفات اندازه‌گیری شده نشان داد که کلیه صفات به جزء تعداد ریشه در سطح احتمال ۱٪ معنی‌دار شدند (جدول ۱). نتایج مقایسه میانگین داده‌ها نشان داد که بیشترین تعداد برگ (۱۶/۳۸)، وزن ترکالوس (۳/۳۷ میلی‌گرم) و خشک کالوس (۳۲/. میلی‌گرم) و وزن خشک گیاهچه (۴۹/. میلی‌گرم) در رقم TT با تیمار ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر BA و ۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر IAA به دست آمد. در حالی که بیشترین طول ساقه اصلی (۳/۴ سانتی‌متر) و وزن خشک کالوس (۴۴/. میلی‌گرم) در رقم GF677 با تیمار ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر BA و ۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر IAA به دست آمد همچنین، بیشترین تعداد ریشه (۵/۱۵) در رقم GF677 با تیمار ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر BA و ۰/۴ میلی‌گرم بر لیتر IAA شمارش شد و بیشترین وزن تر ریشه گیاهچه (۱۶/. میلی‌گرم) هم در رقم TT با تیمار یک میلی‌گرم BA و ۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر IAA حاصل گردید.

در مجموع با توجه به نتایج ارایه شده در نمودارهای ۱ الی ۷ مشاهده گردید که بیشترین تعداد برگ (۱۶/۳۸)، طول اصلی ساقه (۳/۴ سانتی‌متر)، تعداد ساقه جانبی(۹/۴)، وزن

تر (۳/۳۷ میلی‌گرم) و خشک کالوس (۰/۳۲ میلی‌گرم) و وزن تر ریشه (۰/۵۰ میلی‌گرم) و وزن خشک ریشه (۰/۱۶ میلی‌گرم) در تیمار ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر BA و ۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر IAA به دست آمده ولی بیشترین تعداد ریشه (۵/۱۵) در ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر BA و ۰/۴ میلی‌گرم بر لیتر IAA به دست آمد. نتایج بدست آمده نشان داد که تیمار ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر BA و ۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر IAA بهترین تیمار برای پرآوری بود. دلیل نتایج فوق را می‌توان به نقش مهم سایتوکنین‌ها ارتباط داد. چون طبق گزارش‌ها سیتوکینین شروع و فعالیت مریستم‌های جانبی را که منجر به شکل‌گیری شاخه می‌شود، تحریک می‌کند. تقسیم سلولی، پرآوری شاخه و تشکیل جوانه کناری می‌تواند توسط سیتوکینین تقویت شود. تأثیر سایتوکینین‌ها بر روی بافت یا کشت اندام‌ها بر اساس نوع محیط کشت، نوع گیاه و سن ریز نمونه متفاوت است (دوبرانشکا و سیلوا، ۲۰۱۰؛ تورب و همکاران، ۲۰۰۸). در مطالعات بسیاری ثابت شده است که میزان پرآوری و رشد جوانه‌های جانبی توسط سیتوکینین کنترل شده و به میزان سایتوکنین مورد استفاده وابسته است و افزایش غلظت سیتوکینین تا حد معینی باعث افزایش تعداد شاخه‌ها ولی با افزایش بیشتر از شاخه‌زایی ممانعت می‌کند (جورج و همکاران، ۲۰۰۸).

تورب و همکاران (۲۰۰۸) هم در مطالعه‌ای نشان دادند، وقتی‌که غلظت BAP تا یک حد معینی افزایش پیدا می‌کند، تعداد شاخه‌ها افزایش پیدا می‌کند. با افزایش غلظت BAP تا یک میلی‌گرم در لیتر تعداد شاخه‌ها تا ۲/۵۴ شاخه در هر گیاهچه افزایش پیدا می‌کند. بسیاری از محققین نیز بهترین نتیجه پرآوری برای پایه بادام را در محیط MS و با غلظت تنظیم‌کننده‌های رشد یک میلی‌گرم بر لیتر BA و ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر IAA به دست آوردند (فوتوپلوس و سوتیروپلوس، ۲۰۰۵).

ریشه‌زایی

همچنان که قبلا یادآوری شد در آزمایش‌های فاکتوریل وقتی اثر متقابل فاکتورها معنی‌دار باشد اثرات اصلی اهمیت چندانی ندارند ولی در این آزمایش طبق جدول ۲ اثرات اصلی اکسین معنی‌دار شده است. نتایج جدول ۱ نشان داد که غلظت‌های مختلف اکسین در صفات مورد مطالعه ریشه‌زایی اثر معنی‌دار داشته است و اثر بقیه فاکتورها بر همه صفات غیرمعنی‌دار بوده است.

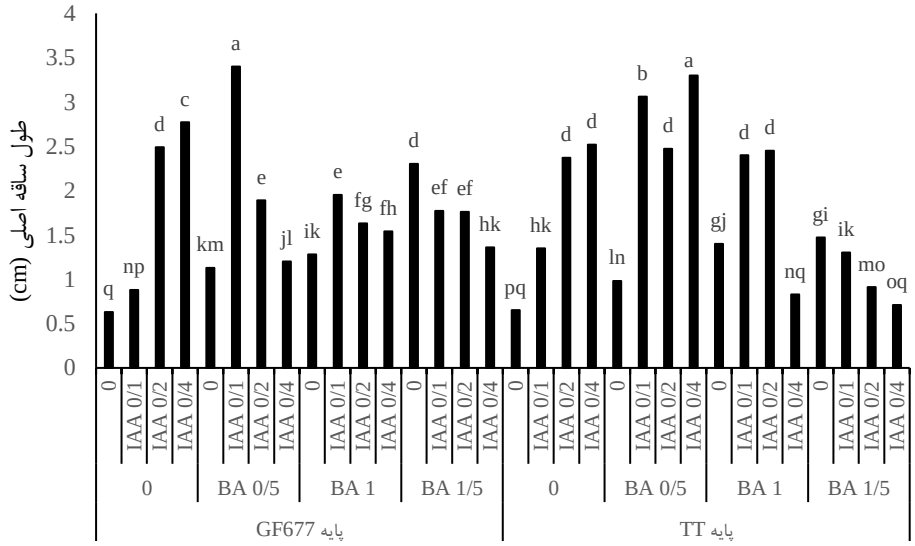
طبق نتایج نمودار ۸ تیمار حاوی یک میلی‌گرم در لیتر IAA به ترتیب با درصد ریشه‌زایی ۸۹/۹۷ درصد در GF677 و ۸۹/۹۵ درصد در TT با اختلاف معنی‌داری بیشترین درصد ریشه‌زایی را به خود اختصاص داد، این در حالی است که گیاه شاهد GF677 قرار گرفته در محیط بدون ماده تنظیم کننده رشد گیاهی با ۱/۶۶ درصد ریشه‌زایی، ضعیف‌ترین تیمار این صفت شناسایی شد.

بررسی‌ها نشان می‌دهند تأثیر مواد تنظیم‌کننده رشد گیاهی اکسین بر درصد ریشه‌زایی به نوع ماده تنظیم‌کننده رشد گیاهی و غلظت آن بستگی دارد به طوری‌که وقتی‌که غلظت هورمون درونی گیاه به تعادل برسد، پس از آن حالت بازدارنگی دارد (جورج و همکاران، ۲۰۰۸؛ کوسه و کانیل، ۲۰۱۵) در این آزمایش نیز با افزایش مقادیر مواد تنظیم

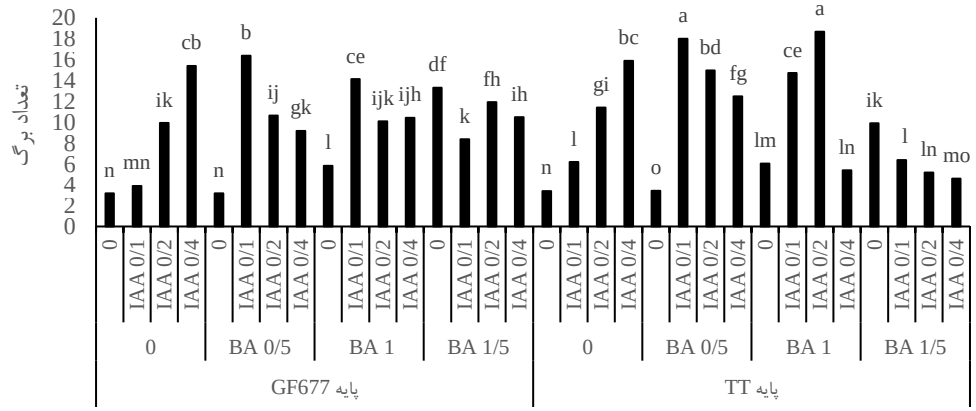
جدول ۱- تجزیه واریانس تأثیر رقم و تیمارهای هورمونی و اثرات متقابل آنها بر برخی صفات مورد ارزیابی

منابع تغییر	درجه آزادی	میانگین مربعات							
		تعداد برگ	طول ساقه اصلی	تعداد ساقه جانبی	تعداد ریشه	وزن تر کالوس	وزن خشک کالوس	وزن تر	وزن خشک
رقم	۱	۰/۰۱۱ ns	۰/۰۰۳ ns	۰/۰۱۳ ns	۰/۰۷ *	۱/۳۲ **	۰/۰۰۱ ns	۲/۵۹ **	۰/۰۳۸ **
BA	۳	۴۹/۰۹ **	۳/۰۰۸ **	۱۶۸/۱۲ **	۶/۹۵ **	۱۳/۳۱ **	۰/۲۴ **	۱۱/۰۶ **	۰/۱۶ **
IAA	۳	۲۰۶/۴۸ **	۴/۲۸ **	۱۲۴/۵۹ **	۷/۱۴ **	۱۰/۴۷ **	۰/۲ **	۲۰/۹۶ **	۰/۳۰۷ **
رقم × BA	۳	۷۵/۷۵ **	۲/۱۸ **	۷/۰۶ **	۰/۰۲ ns	۰/۴۵ **	۰/۰۰۴ **	۲/۰۵ **	۰/۰۳۰ **
رقم × IAA	۳	۲۰/۴۸ **	۰/۱۸ **	۴/۹۳ **	۰/۰۲ ns	۰/۲۵ **	۰/۰۰۵ **	۱/۲۶ **	۰/۰۲ **
BA × IAA	۹	۱۶۶/۷۵ **	۴/۲۵ **	۳۷ **	۲/۷۲ **	۲۸ ۶**	۰/۱۱ **	۸/۱۱ **	۰/۱۲ **
رقم × BA × IAA	۹	۲۰/۲۹ **	۱/۱۲ **	۶/۲۰ **	۰/۰۰۹ ns	۰/۲۹ **	۰/۰۰۴ **	۱/۳۳ **	۰/۰۱۹ **
خطا	۹۶	۱/۲۸	۰/۰۲۹	۰/۰۸	۰/۰۱۴	۰/۰۰۹	۰/۰۰۰۴	۰/۰۰۳	۰/۰۰۰۲
ضریب تغییرات(٪)	-	۱۱/۶۱	۹/۷۶	۹/۸۲	۲۹/۸۹	۱۱/۳۵	۱۷/۲۵	۶/۷۳	۱۳/۴۹

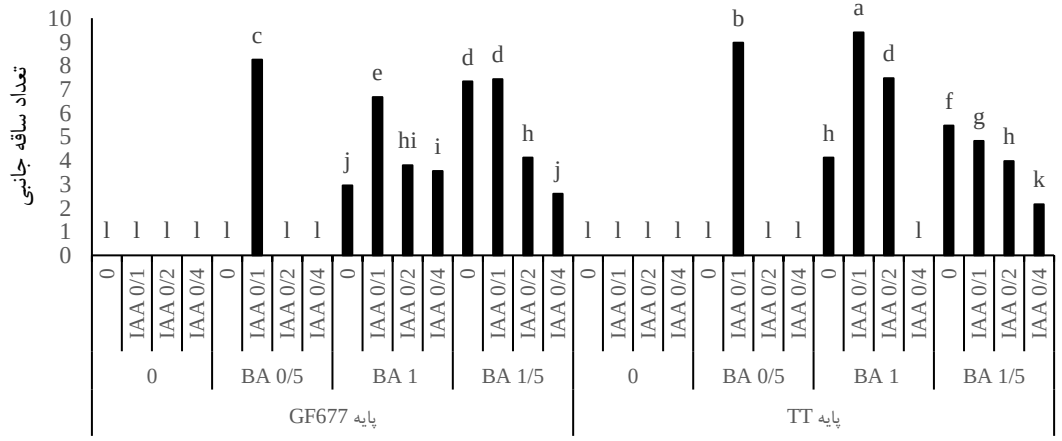
ns ، * و **: بترتیب غیرمعنی‌دار، معنی‌دار در سطح احتمال پنج و یک درصد



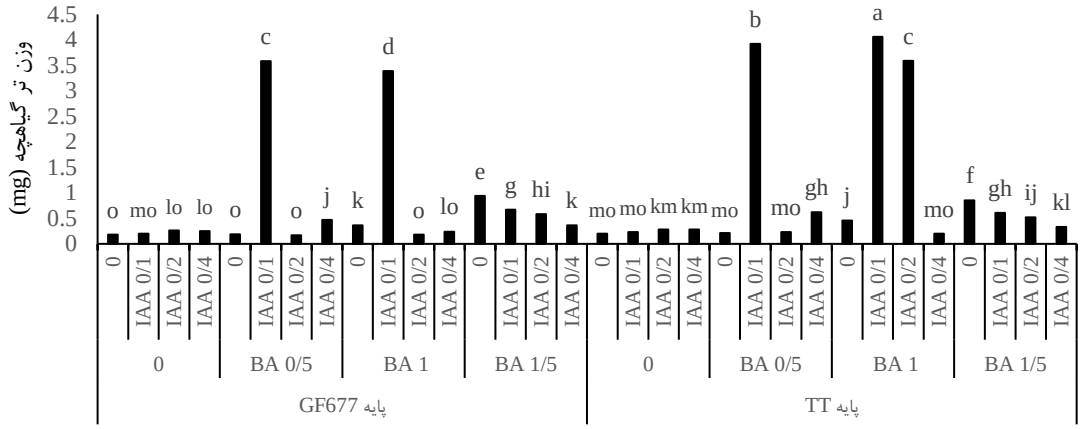
نمودار ۱- مقایسه میانگین اثرات متقابل رقم، BA و IAA بر طول ساقه اصلی. حروف غیرمشابه نشان دهنده تفاوت معنی‌دار در سطح احتمال یک درصد در بین میانگین‌ها در آزمون دانکن می‌باشد.



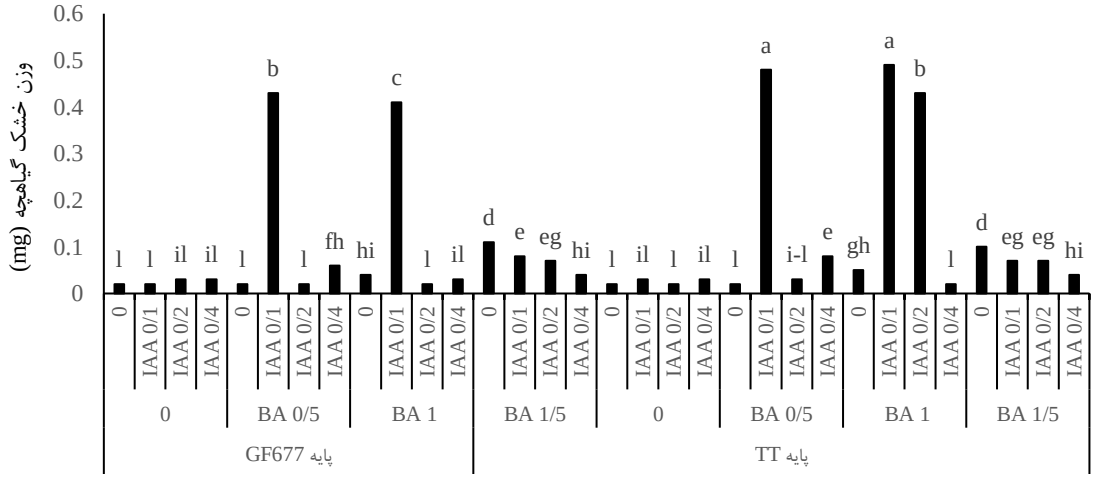
نمودار ۲- مقایسه میانگین اثرات متقابل رقم، BA و IAA بر تعداد برگ. حروف غیرمشابه نشان دهنده تفاوت معنی‌دار در سطح احتمال یک درصد در بین میانگین‌ها در آزمون دانکن می‌باشد.



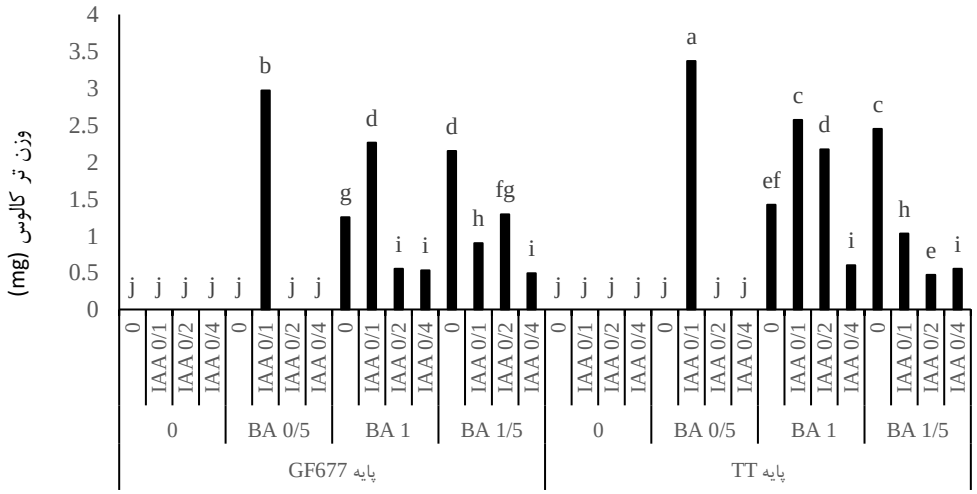
نمودار۳- مقایسه میانگین اثرات متقابل رقم، BA و IAA بر صف تعداد ساقه جانبی. حروف غیرمشابه نشان دهنده تفاوت معنی‌دار در سطح احتمال یک درصد در بین میانگین‌ها در آزمون دانکن می‌باشد.



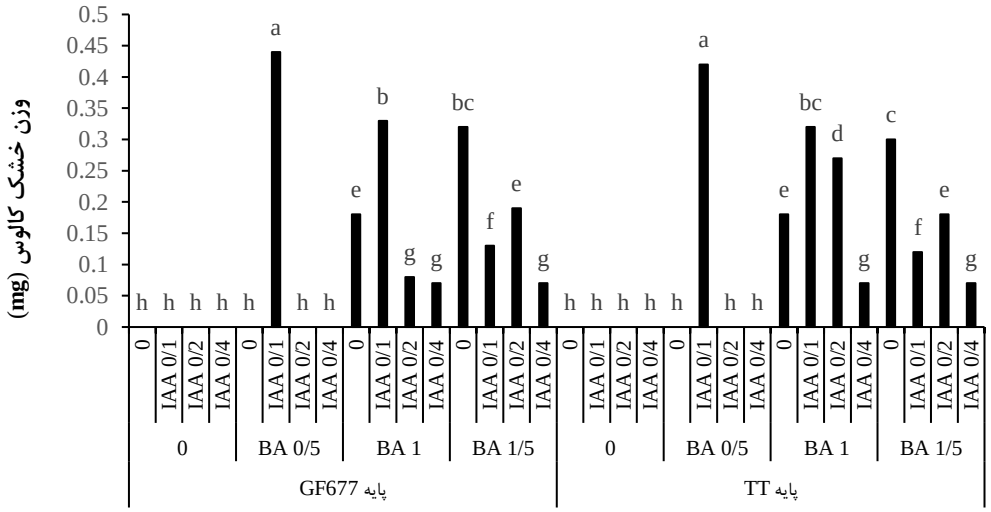
نمودار۴- مقایسه میانگین اثرات متقابل رقم، BA و IAA بر صف وزن تر گیاهچه. حروف غیرمشابه نشان دهنده تفاوت معنی‌دار در سطح احتمال یک درصد در بین میانگین‌ها در آزمون دانکن می‌باشد.



نمودار ۵- مقایسه میانگین اثرات متقابل رقم، BA و IAA بر وزن خشک گیاهچه. حروف غیرمشابه نشان دهنده تفاوت معنی‌دار در سطح احتمال یک درصد در بین میانگین‌ها در آزمون دانکن می‌باشد.



نمودار ۶- مقایسه میانگین اثرات متقابل رقم، BA و IAA بر وزن تر کالوس. حروف غیرمشابه نشان دهنده تفاوت معنی‌دار در سطح احتمال یک درصد در بین میانگین‌ها در آزمون دانکن می‌باشد.



نمودار ۷- مقایسه میانگین اثرات متقابل رقم، BA و IAA بر وزن خشک کالوس. حروف غیرمشابه نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار در سطح احتمال یک درصد در بین میانگین‌ها در آزمون دانکن می‌باشد.

جدول۲- تجزیه واریانس تاثیر رقم و تیمارهای هورمونی و اثرات متقابل آنها بر برخی صفات مورد ارزیابی

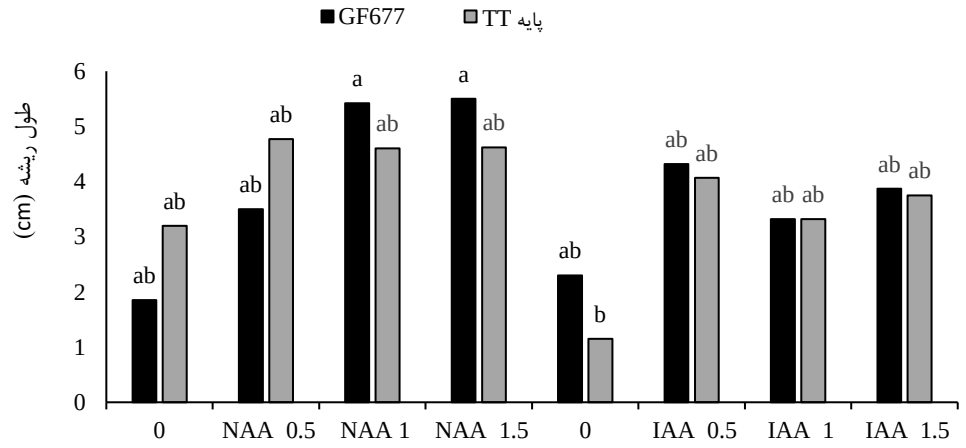
منابع تغییر	درجه آزادی	میانگین مربعات						
		درصد ریشه دهی	روز تا ظهور ریشه	تعداد ریشه	طول ریشه	وزن تر ریشه هر گیاهچه	وزن تر ریشه کل	وزن خشک ریشه
رقم	۱	۱۰۰/۲۵ ns	۰/۲۵ ns	۰/۱۶ ns	۰/۰۹ ns	۰/۰۰۰۱ ns	۰/۰۲ ns	۰/۰۰۱ ns
اکسین	۷	۸۴۴۹/۷۲ **	۷۳/۵۲ **	۲۰/۴۸ **	۱۰/۷۹ ns	۰/۰۱۸ **	۴/۷۹ **	۰/۲۴ **
رقم × اکسین	۷	۴۲/۷۳ ns	۲/۹۲ ns	۰/۲۰ ns	۱/۷۸ ns	۰/۰۰۰۵ ns	۰/۰۲ ns	۰/۰۰۱ ns
خطا	۴۸	۳۰/۵۱	۵/۰۷	۰/۵۸	۵/۲۳	۰/۰۰۱	۰/۰۲	۰/۰۰۱
ضریب تغییرات (٪)	-	۱۷/۴۵	۱۵/۸۴	۲۱/۳۵	۱۶/۴۳	۴۶/۷۹	۲۵/۰۹	۲۶/۸۴

ns ، * و **: بترتیب غیرمعنی‌دار، معنی‌دار در سطح احتمال پنج و یک درصد

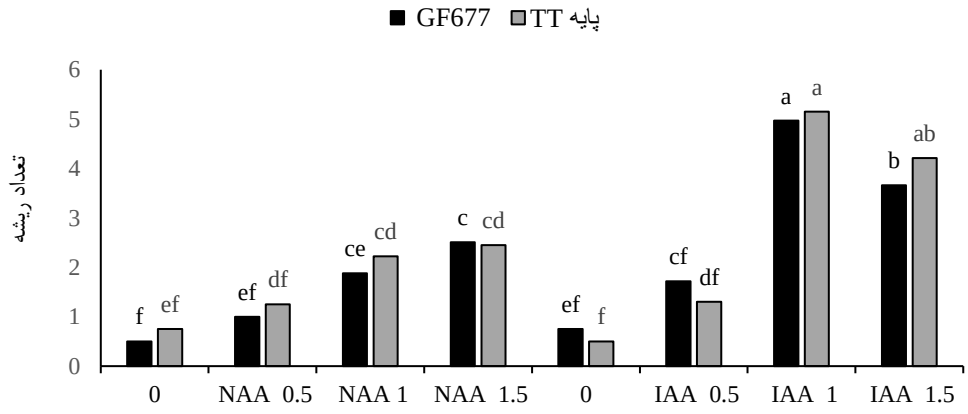
کننده رشد گیاهی مقدار درصد ریشه‌زایی کاهش پیدا کرد که با تحقیقات انجام شده کوسه و کانیل (۲۰۱۵) مشابهت داشت. از داده‌های نمودار ۹ مشخص شد که در صفت تعداد ریشه محیط حاوی یک میلی‌گرم در لیتر ماده تنظیم‌کننده رشد گیاهی IAA با میانگین ۴/۹۷ عدد در پایه GF677 و ۵/۱۵ عدد در پایه TT با اختلاف معنی‌داری بیشترین تعداد ریشه را به خود اختصاص داده‌اند و تیمارهای بدون IAA در هیبریدهای هلو و بادام GF677 و TT کمترین تعداد ریشه و ضعیف‌ترین تیمار تعیین گردیدند. دلیل این نوع تفاوت معنی‌دار را می‌توان به نوع و غلظت مورد استفاده اکسین ارتباط داد. طبق بررسی‌های مقایسه اثر اکسین‌ها بر صفات طول و تعداد ریشه نشان داد که با افزایش غلظت این مواد تنظیم‌کننده رشد گیاهی در محیط کشت، ریشه‌ها کمتر و کوتاه تر می‌شوند.

نتایج مقایسه میانگین (نمودار ۱۰) نشان داد که تیمارهای حاوی یک و ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA در گیاه GF677 با ۵/۴۲ و ۵/۵ سانتی‌متر و تیمار حاوی ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA در گیاه TT با ۴/۷۷ سانتی‌متر از بیشترین مقدار طول ریشه برخوردار می‌باشند. در حالی که گیاهچه‌های شاهد و گیاه هدف در تیمارهای بدون NAA با ۱/۸۵ و ۱/۱۵ سانتی‌متر از ضعیف‌ترین طول ریشه برخوردار بودند. تورب و همکاران (۲۰۰۸) در تحقیقات خود بهترین دلیل این تفاوت‌ها را در محتوای تنظیم کننده‌های رشد درونی هر ژنوتیب دانستند که بهترین دلیل برای تفاوت در واکنش گونه‌های مختلف در محیط کشت می‌باشند.

طبق نتایج مطالعه حاضر (نمودار ۱۱) می‌توان گفت، تیمار حاوی یک میلی‌گرم در لیتر IAA در گیاه شاهد GF677 و گیاه TT به ترتیب با ۰/۱۵ و ۰/۱۶ میلی‌گرم از بیشترین وزن‌تر ریشه برخوردار بودند و گیاهان شاهد و هدف در تیمارهای بدون ماده تنظیم‌کننده رشد گیاهی به ترتیب با ۰/۰۳ (غلظت صفر IAA) و ۰/۰۲ (غلظت صفر NAA) از



نمودار ۸- تأثیر متقابل پایه‌های هیبرید هلو و بادام و اکسین بر درصد ریشه‌زایی. حروف غیرمشابه نشان دهنده تفاوت معنی‌دار در سطح احتمال یک درصد در بین میانگین‌ها در آزمون دانکن می‌باشد.



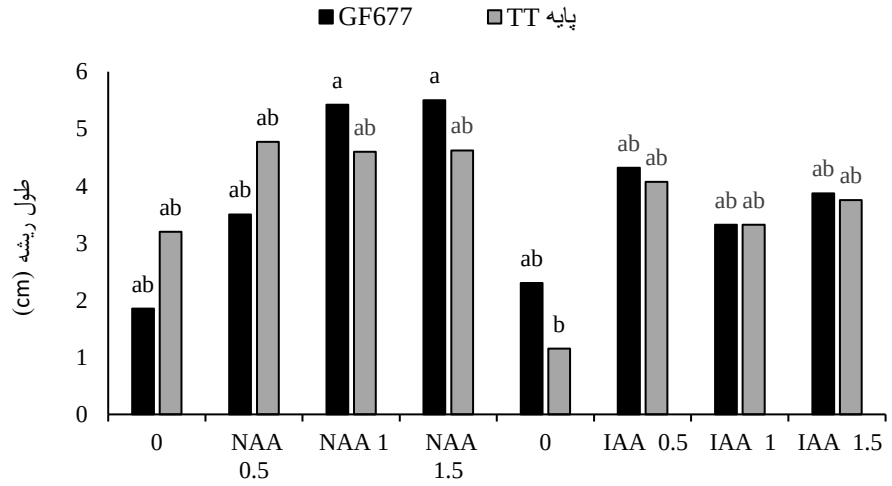
نمودار ۹- **تأثیر متقابل پایه های هیبرید هلو و بادام و اکسین بر تعداد ریشه.** حروف غیرمشابه نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار در سطح احتمال یک درصد در بین میانگین‌ها در آزمون دانکن می‌باشد.

ضعیف‌ترین نتایج برخوردار بودند. مطالعات گریگیادوو[1] و همکاران (۲۰۰۲) نشان داده است که ترکیب اکسین‌های مختلف سبب واکنش بهتر در زیتون که دارای مشکل ریشه-زایی بوده‌اند شده است. نتایج نمودار ۱۲ نشان می‌دهد کمترین روز تا ظهور ریشه (ده روز) در تیمارهای حاوی یک میلی‌گرم هورمون IAA در هیبرید GF677 و TT مشاهده گردید و بیشترین روز تا ظهور ریشه (۱۸/۷۵ روز) در تیمارهای بدون ماده تنظیم کننده رشد گیاهی به عنوان ضعیف‌ترین تیمارها مشاهده و ثبت گردید.

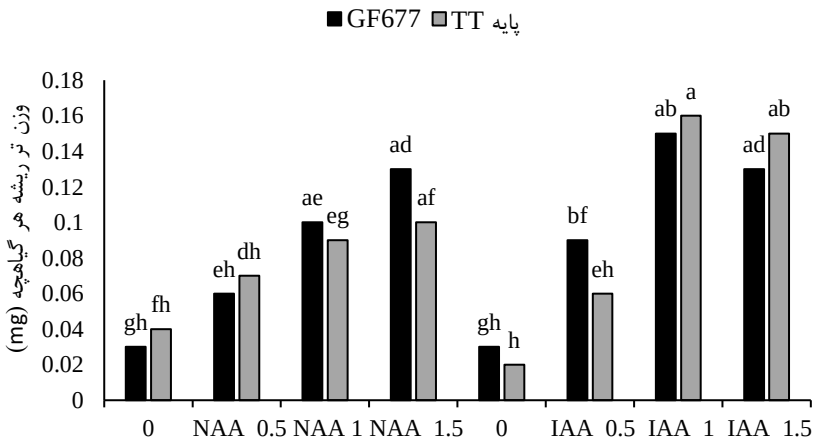
بررسی‌ها نشان داده است که این مواد تنظیم‌کننده رشد گیاهی فقط در مراحل اولیه برای ظهور ریشه‌چه‌های تازه تشکیل شده مورد نیاز می‌باشند که در سیب هم گزارش شده است (دوبرانشکا و تکسرا، ۲۰۱۰).

اطلاعات نمودار ۱۳ نشانگر این است که تیمارهای حاوی یک میلی‌گرم در لیتر IAA در گیاه شاهد GF677 با ۲/۱۵ میلی‌گرم و در گیاه TT با ۲/۲۲ میلی‌گرم با تفاوت معنی‌داری از بیشترین وزن ریشه تر نسبت به سایر تیمارها برخوردار بودند و تیمارهای بدون IAA در GF677 با ۰/۰۳ میلی‌گرم و تیمار بدون IAA در TT به ترتیب با ۰/۰۴ و ۰/۰۲ در محیط حاوی NAA و IAA با کمترین وزن تر

1. Grigoriadou



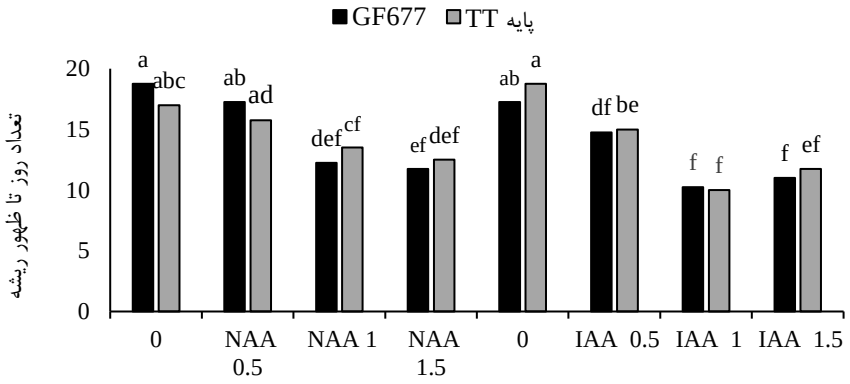
نمودار ۱۰- تأثیر متقابل پایه های هیبرید هلو و بادام و اکسین بر طول ریشه. حروف غیرمشابه نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار در سطح احتمال یک درصد در بین میانگین‌ها در آزمون دانکن می‌باشد.



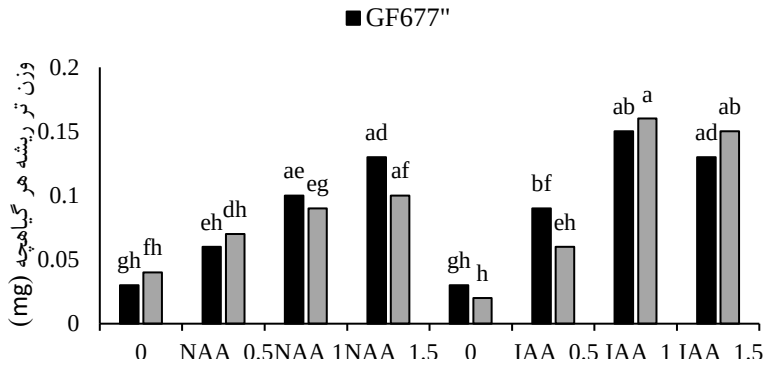
نمودار ۱۱- تأثیر متقابل پایه های هیبرید هلو و بادام و اکسین بر وزن تر ریشه هر گیاهچه. حروف غیرمشابه نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار در سطح احتمال یک درصد در بین میانگین‌ها در آزمون دانکن می‌باشد.

ریشه (۰۲/. میلی‌گرم) محاسبه و ثبت شدند.

نتایج نمودار ۱۴ نشان داد که تیمار حاوی یک میلی‌گرم در لیتر IAA در گیاه شاهد GF677 با ۰/۴۹ میلی‌گرم وزن خشک ریشه و در پایه هیبرید هلو و بادام TT با ۰/۵۰۲ میلی‌گرم با اختلاف معنی‌داری بالاترین وزن خشک ریشه را نشان دادند و ضعیف‌ترین نتایج نیز در گیاه شاهد GF677 در تیمار بدون NAA با ۰/۰۰۷ میلی‌گرم و در گیاه TT نیز در تیمار بدون NAA با ۰/۰۰۵ میلی‌گرم مشاهده گردیدند. در کل با توجه به نتایج ارائه شده در شکل‌های ۸، ۹، ۱۰، ۱۱، ۱۲، ۱۳ و ۱۴ مشاهده گردید که تیمارهای حاوی یک میلی‌گرم در لیتر IAA در هر دو گیاه GF677 و گیاه TT از بیشترین تأثیر بر صفات وزن خشک کل ریشه، وزن تر کل ریشه، وزن تر ریشه هر گیاهچه، تعداد ریشه، درصد ریشه زایی و روز تا ظهور ریشه در مقایسه سایر تیمارها برخوردار می‌باشند. در حالی که گیاهچه‌های تیمار حاوی ۱/۵ میلی گرم در لیتر NAA بیشترین طول ریشه را داشتند. جدا از این که هر دو پایه جزء ارقام متوسط ریشه‌زا هستند، به فاکتورهایی با غلظت بالای تنظیم‌کننده‌های رشد القاء کننده ریشه نیاز دارند که از این نظر تقریباً مشابه هستند. طبق بررسی‌های انجام شده تولید ریشه در گیاهان تحت تأثیر سنتز، متابولیسم، انتقال و مسیرهای انتقال علایم اکسین می‌باشد (هارتمن و همکاران، ۲۰۱۷؛ جورج و



نمودار ۱۲- تأثیر متقابل پایه‌های هیبرید هلو و بادام و اکسین بر تعداد روز تا ظهور ریشه. حروف غیرمشابه نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار در سطح احتمال یک درصد در بین میانگین‌ها در آزمون دانکن می‌باشد.

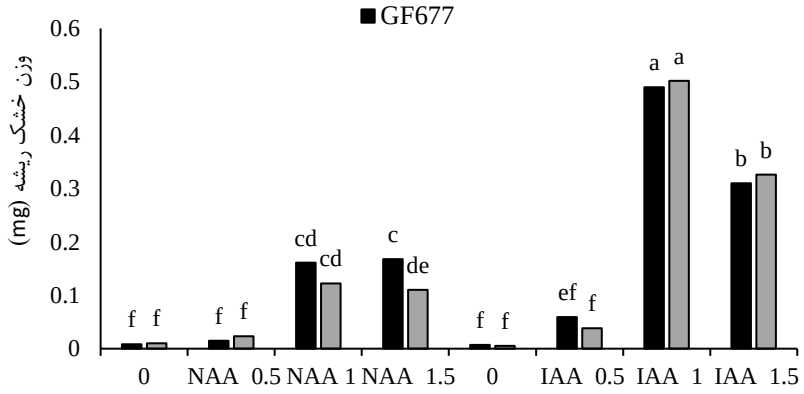


نمودار ۱۳- تأثیر متقابل پایه های هیبرید هلو و بادام و اکسین بر وزن تر ریشه هر گیاهچه. حروف غیرمشابه نشان دهنده تفاوت معنی‌دار در سطح احتمال یک درصد در بین میانگین‌ها در آزمون دانکن می‌باشد.

همکاران، ۲۰۰۸). در کشت درون شیشه‌ای درختان میوه هسته‌دار بخصوص هلو، بادام و دورگ‌های آنها مثل سایر گیاهان، ژنوتیپ گیاه، نوع ریزنمونه، اندازه ریزنمونه، منشا ریزنمونه، سن گیاه، شرایط فیزیولوژیکی گیاه مادری، نوع، غلظت و نسبت مواد تنظیم‌کننده رشد گیاهی بخصوص اکسین و سیتوکینین، نوع محیط کشت، منبع کربن، pH محیط کشت، نوع و میزان ویتامین‌ها و مواد آنتی‌اکسیدانی، دما، نور و خیلی فاکتورهای دیگر بر ریشه‌زایی و شاخه‌زایی آنها اثرات گوناگونی دارند که توسط پژوهشگران زیادی گزارش شده‌اند (هارتمن و همکاران، ۲۰۱۷). ثابت شده است که در کشت درون شیشه‌ای پایه‌های رویشی هلو، بادام و دورگ‌های آنها، نوع سیتوکینین و غلظت آن بشدت در شاخه‌زایی جوانه‌ها موثر است و توسط پژوهشگران و تولیدکنندگان باید دقیقا مورد توجه قرار گیرد. چون سیتوکینین در انگیزش، آغازش و تشکیل جوانه‌های جانبی در گره‌های روی شاخه نقش اساسی دارند. همچنین، اکسین در انگیزش، آغازش و تشکیل ریشه‌چه در ریزنمونه-های کشت شده مهمترین نقش را دارند. بنابراین، بسته به گونه و رقم گیاه و هدف از کشت ریزنمونه، باید نوع و نسبت این مواد تنظیم‌کننده رشد گیاهی در محیط کشت مورد توجه قرار گرفته و بهترین ترکیب هورمونی برای هر گونه و رقم بخصوص در ارقام جدید حاصل از برنامه‌های اصلاحی بدست آید (هارتمن و همکاران، ۲۰۱۷؛ عرب و همکاران، ۲۰۱۴).

نتیجه گیری کلی

بطور کلی نتایج بدست آمده نشان دادند که محیط پرآوری و ریشه‌زایی برای هر دو گیاه GF677 و گیاه TT تقریباً یکسان بود و در مرحله پرآوری تیمار ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر BA و ۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر IAA بهترین اثر را نشان داد.



نمودار ۱۴- تأثیر متقابل پایه‌های هیبرید هلو و بادام و اکسین بر وزن خشک ریشه. حروف غیرمشابه نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار در سطح احتمال یک درصد در بین میانگین‌ها در آزمون دانکن می‌باشد.

همچنین، در هر دو گیاه در مرحله ریشه‌زایی IAA با سطح یک میلی‌گرم در لیتر با اختلاف معنی‌داری در صفات درصد ریشه‌زایی، تعداد ریشه، روز تا ظهور ریشه، وزن تر ریشه هر گیاهچه و وزن کل تر و خشک ریشه از سایر تیمارها مؤثرتر بوده و NAA بیشترین طول ریشه را در سطح ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر تولید کرد. بطورکلی سطح یک میلی‌گرم در لیتر IAA می‌تواند غلظت مؤثری برای مرحله ریشه‌زایی پایه‌های دورگ مورد مطالعه در نظر گرفته شود.

سپاسگزاری

کارهای عملی پژوهش در آزمایشگاه کشت بافت شرکت مزارع نوین سازمان اتکا انجام پذیرفت. بنابراین، نویسندگان نهایت تقدیر و تشکر خود را از مسئولین این شرکت اعلام می‌دارند.

منابع

Ahmed, M.S., Abbasi, N.A. and Amer, M. 2003. Effects of IBA on hardwood cuttings of peach rootstocks under greenhouse conditions. Asian Journal of Plant Sciences, 2: 265-269.

Akbari Khabbaz, M., Ghamari Zare, A., Emam, M., Assareh, M.H. and Ghorbanli, M., 2007. Micropropagation of *Eucalyptus gongylocarpa*, Iran Journal of Rang Forests Plant Breeding and Genetic Researchs, 15: 142-158.

Antonopoulou, C., Dimassi, K., Therios, I., Chatzissavvidis, C. and Papadakis, I. 2007. The effect of Fe-EDDHA and of ascorbic acid on in *vitro* rooting of the peach rootstocks GF-677 explants. Acta Physiological Plants, 38: 23-28.

Arab, M.M., Yadollahi, A., Shojaeiyan, A., Shokri, S. and Ghojah, S.M. 2014. Effects of nutrient media different cytokinin types and their concentrations on in vitro multiplication of G × N15 (hybrid of almond × peach) vegetative rootstock. Journal of engineering and Biotechnology, 12(2): 81-87.

Arab, M.R., and Shekafandeh, A. 2016. In vitro propagation of GF677 hybrid rootstock *(Prunus persica* × *Prunus amygdalus*) from mature cotyledons. The Journal of Horticultural Science and Biotechnology, 91(3): 236–242.

Badoni, A. and Chauhan, J.S. 2010. In *vitro* sterilization protocol for micropropagation of Solanum tuberosum cv. 'Kufri Himalini'. Academia Arena, 2(4): 24-27.

Bartolini, G., Pestelli, P., Tazzari, L. and Toponi, M.A. 2000. Parameters that influence rooting and survival of peach cuttings. Journal of American Pomology Society, 54: 183-188.

Bonga, J.M. and Durzan, D.J. 1982. Tissue culture in forestry. The Hague: Martinus Nijhoff, publishers, Netherland.

Cos, J., Frutos, D., Garcia, R., Rodriguez, J. and Carrillo, A. 2004. In *vitro* rooting study of the Peach-Almond hybrid mayor Reg. Acta Horticulture, 658: 128-133.

Cos, J., Frutos, D., Sanchez, M.A., Rodriguez, J. and Carrillo, A. 2004. Determination of the optimal culture medium and growth regulator concentration for the vitro proliferation stage of the Peach-Almond hybrid Mayor. Acta Horticulture, 658: 617-621.

Darion, N., Regnard, J.J., Sepette, I. and Bigot, C. 1993. Effect of temperature and hypoxic atmosphere on preservation and further development on in *vitro* shoot of peach and peach×almond hybrid (GF677). Scientia Horticulturae, 57: 201-213.

Dimassi, K. and Theiou, A. 1995. In *vitro* rooting of rootstock GF677 (*Prunus amygdalus*× *Prunus persica*) as influenced by mineral concentration of the nutrient medium and type of culture tube sealing material. Journal of Horticultural Sciences, 70: 105-108.

Dobránszki, J. and Teixeira da Silva, J.A. 2010. Micropropagation of apple-A review. Biotechnology Advances, 28: 462-488.

Ercisli, S., Anapali, O., Esitken, A. and Sahin, U. 2002. The effects of IBA, rooting media and cutting collection time on rooting of kiwi fruit. Gartenbauwissenschaft, 67: 34-38.

Erfani, M., Miri, S.M. and Imani, A. 2017. In vitro shoot proliferation and rooting of Garnem rootstock as influenced by basal media, plant growth regulators and carbon sources. Plant Cell Biotechnology and Molecular Biology, 18: 101-109.

Fabijan D.E., Yeung E., Mukherjee I. and Reid D.M. 1981. Adventitious rooting in hypocotyls of sunflower (*Helianthus annuus*) seedlings. I. Correlative influences and developmental sequence. Physiology of Plants, 53: 578-588.

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

George, E.F., Hall, M.A. and Klerk, G.J.D. 2008. Plant Growth Regulators I: Introduction; Auxins, their Analogues and Inhibitors. In Plant propagation by tissue culture, 175-204.

Grigoriadou, K., Vasilakakis, M. and Eleftheriou, E.P. 2002. In *vitro* propagation of the Greek olive cultivar 'Chondrolia Chalkidikis'. Plant Cell Tissue and Organ Culture, 71: 47–54.

Hartman, T.H., Kester, D.A., Davies, F.T. and Geneve R.L. 2017. Plant propagation: principles and practices (9th Edition). Pearson Education, 1024 p.

Kose, S. and Canli, F.A. 2015. In *vitro* propagation and rooting of 'Garnem' (*P. persica* × *P. dulcis*) rootstock. Plant Molcular Biology and Biotechnology, 5(1): 25-30.

Pati, P.K., Rath, S.P., Sharma, M., Sood, A. and Ahuja, P.S., 2006. In vitro propagation of rose-a review. Biotechnology advances, 24(1): 94-114.

Rezaei, A. and Hosseipour, B. 2015. In *vitro* propagation and rooting of Garnem rootstock. Plant Cell Biotechnology and Molecular Biology, 16: 41-47.

Sen, M.K., Dash, B.K., Jerin, R.S. and Faruquee, H.M. 2012. Micropropagation of aping (*Achyranthes aspera* L.): an update review Phytochemistry and antimicrobial potential. Journal of Pharmacology Science, 3: 1–8.

Shabbir, A., Hameed, N., Ali, A. and Bajwa, R. 2009. Effect of different cultural conditions on micropropagation of rose (*Rosa indica* L.). Pakistan Journal of Biotechnology, 41(6): 2877-2882.

Thorpe, T., Stasolla, C., Yeung, E.C., De Klerk, G.J. and Roberts, A.E.F. 2008. Plant Propagation by Tissue Culture, Springer, pp.115–173.

Zamir, R., Shah, S.T., Ali, N., Khattak, G.S.S. and Muhammad, T. 2004. Studies on in vitro surface sterilization and antioxidants on guava shoot tips and nodal explants. Pakistan Journal of Biotechnology, 1(2): 12-16.