The University of Tehran Press

Iranian Journal of Horticultural Science

Online ISNN: 2008-482X

Homepage: http:// ijhs.ut.ac.ir/

Micropropation of GN15 Rootstock (Hybrid of Almond and Peach) in Temporary Immersion Bioreactor

Ahmad Sharifi[1]✉, Mahdiyeh Kharrazi [2], Azadeh Khadem[3]

1. Corresponding Author, Horticultural Plants Biotechnology Department, Research Institute for Industrial Biotechnology, Academic Centre for Education, Culture and Research (ACECR)- Khorasan Razavi Branch, Mashhad, Iran. E-mail: a-sharifi@jdm.ac.ir
2. Horticultural Plants Biotechnology Department, Research Institute for Industrial Biotechnology, Academic Centre for Education, Culture and Research (ACECR)- Khorasan Razavi Branch, Mashhad, Iran. E-mail: ma_kharrazi@jdm.ac.ir
3. Horticultural Plants Biotechnology Department, Research Institute for Industrial Biotechnology, Academic Centre for Education, Culture and Research (ACECR)- Khorasan Razavi Branch, Mashhad, Iran. E-mail: azadeh.khadem@jdm.ac.ir

Article Info

Article type:

Research Article

Article history:

Received: 22 November 2023

Received in revised form: 30 June 2024

Accepted: 13 August 2024

Published online: Winter 2024

Keywords:

Humidity,

Liquid medium,

Temporary immersion,

Ventilation,

Vitrification.

ABSTRACT

The liquid medium creates optimal conditions for plant micropropagation by providing a more consistent environment and eliminating the hassle of explant transferring during the subcultures. This study was focused on the improving of GN15 rootstock micropropagation. At the first, the impact of various plant growth regulator combinations on node explant establishment in semi-solid MS medium was investigated to select the best establishment medium. Then the comparision between two culture system including temporary immersion bioreactor system and conventional semi-solid was performed to evaluate propagation rate and plant health of GN15 rootstock. To investigate the effects of immersion times (10 minutes every 6, 12, and 24 h), plant growth regulator concentrations (0, 0.5, and 1 mg/l BA) and sucrose concentrations (3, 4, and 5 %) in MS medium three separate experiments were designed. Rooting of microcuttings was assessed in both systems with MS medium containing 0.6 mg/l IBA. The resulted revealed that successful establishment of explants was heavily dependent on plant growth regulators, MS medium containg 0.5 mg/L BA was the best. The results also demonstrated that the temporary immersion system with 10-minute immersions frequency every 6 hours, 0.5 mg/L BA, and 3% sucrose created optimal growth conditions for GN15 shoots. However, the rooting and acclimatization tests revealed that the temporary immersion system was not suitable for rooting the GN15 rootstock under the studied conditions. In overall, to maximize the benefits of the temporary immersion system in GN15 micropropagation, it is recommended to utilize a two-stage strategy. This includes carrying out the propagation in the temporary immersion system followed by rooting the microcuttings in semi-solid media.

Cite this article: Sharifi, A., Kharrazi, M. & Khadem, A. (2024). Micropropation of GN15 Rootstock (Hybrid of Almond and Peach) in Temporary Immersion Bioreactor. *Iranian Journal of Horticultural Science*, 55 (4), 577-596. DOI: https://doi.org/10.22059/ijhs.2024.367387.2129

© The Author(s).
DOI: https://doi.org/10.22059/ijhs.2024.367387.2129

Publisher: The University of Tehran Press.

Extended Abstract

Introduction

The liquid medium creates a more consistent environment, eliminates explant transfer needs during medium replacement and enhances conditions for plant micropropagation. Moreover, in this culture method, larger vessels can be utilized compared to semi-solid medium, extending transfer times and fostering economical micropropagation. This study focused on the micropropagation of GN15 rootstock, a hybrid of almond and peach, recognized as the optimal rootstock for calcareous soils in Iran, conducted in temporary immersion bioreactor and semi-solid culture setups.

Materials and methods

At the first, the impact of various plant growth regulator combinations on node explant establishment in semi-solid MS medium was investigated to select the best establishment medium. Then the comparison between two culture systems including temporary immersion bioreactor system and conventional semi-solid was done to evaluate propagation indices and plant health of GN15 rootstock. To investigate the effects of immersion times (10 minutes every 6, 12, and 24 h), plant growth regulator concentrations (0, 0.5, and 1 mg/l BA) and sucrose concentrations (3, 4, and 5 %) in MS medium, three separate experiments were designed. Rooting of microcuttings was assessed in both systems with MS medium containing 0.6 mg/l IBA. The plantlets were then transferred to the pots filled with a mixture of cocopeat and vermiculite in a 1:1 ratio for acclimatization.

Results and Discussion

The successful establishment of explants in the medium was strongly influenced by the plant growth regulators, with the highest percentage of plantlet establishment observed in the medium containing 1 mg/L BA. This medium also exhibited a high vitrification percentage, although the other media showed lower establishment percentages, no vitrification was observed. Results from propagation experiments in both systems revealed that the temporary immersion system offered superior conditions for the growth and propagation of GN15 plantlets. In the survey of immersion duration, 10-minute immersions every 6 hours resulted in the highest number of shoots, although they showed symptoms of vitrification. As the duration between immersion cycles increased, the number of propagated plantlets decreased. Increasing the concentration of BA led to enhanced shoot proliferation and plantlet growth in both systems, especially in the temporary immersion system. However, higher BA concentrations resulted in vitrification in plantlets from the temporary immersion system. In case of sucrose, a 3% sucrose level was found to be optimal for plantlet propagation in both systems. On the other hand, at a 5% sucrose level, the quantity and quality of propagated plantlets significantly decreased. Rooting and acclimatization results for GN15 rootstock in the two systems indicated that the temporary immersion system was not suitable for rooting this rootstock, as the plantlets became vitrified and disappeared during acclimatization. The semi-solid culture system provided better conditions for rooting.

Conclusion

This study demonstrated that for the large-scale propagation of GN15 rootstock under in vitro conditions, shoot propagation using a temporary immersion system is achievable. The system utilized MS medium supplemented with 0.5 mg/L BA, 3% sucrose, and featured immersion cycles of 10 minutes every 6 hours. Additionally, the best rooting of regenerated shoots was achieved in a semi-solid medium.

نشریه علوم باغبانی ایران، دوره ۵۵، شماره ۴

انتشارات دانشگاه تهران

شاپا الکترونیکی: ۲۴۲۳-۷۹۳۰

Homepage: http://ijhs.ut.ac.ir//

بهینه سازی ریزازدیادی پایه GN15 (هیبرید هلو و بادام) در شرایط بیوراکتور غوطه‌وری موقت

احمد شریفی[۱]✉| سیده مهدیه خرازی[۲]| آزاده خادم[۳]

۱. نویسنده مسئول، گروه پژوهشی بیوتکنولوژی گیاهان باغبانی، پژوهشکده بیوتکنولوژی صنعتی، سازمان جهاد دانشگاهی خراسان رضوی، مشهد، ایران. رایانامه: a-sharifi@jdm.ac.ir

۲. گروه پژوهشی بیوتکنولوژی گیاهان باغبانی، پژوهشکده بیوتکنولوژی صنعتی، سازمان جهاد دانشگاهی خراسان رضوی، مشهد، ایران. رایانامه: ma_kharrazi@jdm.ac.ir

۳. گروه پژوهشی بیوتکنولوژی گیاهان باغبانی، پژوهشکده بیوتکنولوژی صنعتی، سازمان جهاد دانشگاهی خراسان رضوی، مشهد، ایران. رایانامه: azadeh.khadem@jdm.ac.ir

اطلاعات مقاله

نوع مقاله:

مقالهٔ پژوهشی

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۰۹/۰۱

تاریخ بازنگری: ۱۴۰۳/۰۴/۲۴

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۰۵/۲۳

تاریخ انتشار: زمستان ۱۴۰۳

کلیدواژه‌ها:

تعلیق موقت، تهویه، رطوبت نسبی، شیشه‌ای شدن، محیط کشت مایع.

چکیده

محیط کشت مایع به دلیل فراهم کردن محیط یکنواخت تر و عدم نیاز به جابجایی نمونه‌های کشت شده در هنگام تعویض محیط کشت، شرایط بهتری را برای ریزازدیادی گیاهان فراهم می‌کند. به‌منظور بررسی ریزازدیادی پایه GN15، ابتدا اثر ترکیب تنظیم کننده های مختلف بر استقرار ریزنمونه گره در محیط کشت نیمه جامد MS مورد ارزیابی قرار گرفت. سپس جهت مقایسه شرایط بیوراکتور غوطه‌وری موقت و کشت نیمه جامد بر ضریب تکثیر و سلامت گیاهان، در قالب سه آزمایش جداگانه، اثر دوره تناوب غوطه‌وری (غوطه‌وری ۱۰ دقیقه در هر ۶، ۱۲ و ۲۴ ساعت)، غلظت تنظیم کننده رشد (غلظت‌های صفر، ۰/۵ و ۱ میلی‌گرم در لیتر BA) و غلظت ساکارز (۳، ۴ و ۵ درصد) در محیط کشت پایه MS مورد ارزیابی قرار گرفت. ریشه زایی گیاهچه‌های تکثیر شده نیز در محیط کشت MS حاوی ۰/۶ میلی‌گرم در لیترIBA در دو سیستم مورد بررسی قرار گرفت. استقرار ریزنمونه‌ها در محیط کشت به شدت تحت تاثیر انتخاب تنظیم کننده‌های رشد قرار گرفت، به‌طوری که محیط کشت MS حاوی ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BA بهترین نتیجه را نشان داد. نتایج آزمایش‌های تکثیر مشخص نمود که بیوراکتور غوطه‌وری موقت شرایط بهتری را برای رشد و تکثیر شاخساره‌های GN15 فراهم می‌کند. بهترین شرایط با دوره غوطه‌وری ۱۰ دقیقه در هر شش ساعت، محیط کشت حاوی ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BA و سه درصد ساکارز به‌دست آمد. همچنین بیوراکتور غوطه‌وری موقت ارزیابی شده در این تحقیق برای ریشه زایی این پایه مناسب نبود و تمام گیاهچه‌ها در این شرایط شیشه‌ای شده و طی فرایند سازگاری از بین رفتند.

استناد: شریفی، احمد؛ خرازی، سیده مهدیه و خادم، آزاده (۱۴۰۳). بهینه سازی ریزازدیادی پایه (GN15هیبرید هلو و بادام) در شرایط بیوراکتور غوطه‌وری موقت. *نشریه علوم باغبانی ایران*، ۵۵ (۴)، ۵۹۶-۵۷۷. DOI: https://doi.org/10.22059/ijhs.2024.367387.2129

ناشر: مؤسسه انتشارات دانشگاه تهران.

© نویسندگان.

DOI: https://doi.org/10.22059/ijhs.2024.367387.2129

مقدمه

روش‌های معمول ریزازدیادی شامل تکثیر شاخه‌ها در یک محیط کشت نیمه جامد است. در این سیستم‌ها، عملکرد تکثیر از موفقیت نسبی برخوردار بوده و سعی بر آن است تا زمان و هزینه‌های تکثیر گیاهان به منظور تجاری سازی آنها کاهش یابد (2002Etienne & Berthouly, 2002). دستورالعمل تکثیر در شرایط درون شیشه‌ای بسیاری از گیاهان از جمله درختان میوه و پایه‌های رویشی ارائه شده است. از طرف دیگر، کیفیت پایه درختان اثر قابل توجهی در رشد، باروری و مقاومت به بیماری ها در درختان دارد. باروری یک باغ مستقیماً به استفاده از پایه‌های با خصوصیات بهبود یافته، مانند پایه‌های عاری از بیماری، کارایی بهتر جذب آب و مواد غذایی، مقاومت به آفات و بیماری های خاکزاد ارتباط دارد. هیبرید هلو بادام GN15 با داشتن خصوصیاتی چون تحمل خاک‌های آهکی، خشکی، شوری، کلروز و نماتد پایه مناسبی برای درختان هلو و بادام در کشور است (Felipe, 2009). با توجه به آنکه شرکت‌های متعددی در کشور این پایه را به روش کشت بافت تکثیر می‌کنند، در این تحقیق به منظور کاهش هزینه‌های تولید این پایه تجاری، شرایط کشت درون شیشه‌ای آن در بیوراکتور غوطه‌وری موقت مورد ارزیابی و با شرایط مرسوم کشت بافت آن مقایسه شد.

پیشینهٔ پژوهش

محیط کشت مایع برای ریزازدیادی گیاهان، محیط ایده‌آلی است، زیرا سیستم‌های کشت مایع محیط یکنواخت‌تری را برای رشد گیاهان فراهم نموده و مواد غذایی بدون آنکه ظروف کشت تعویض شوند، قابل تجدید هستند. از طرف دیگر، استریل نمودن محیط کشت مایع با استفاده از فیلتر به آسانی امکان پذیر است. در مقایسه با کشت‌های نیمه جامد، در این روش می‌توان از ظروف بزرگتر استفاده نمود و از افزایش زمان انتقال بهره برد (Berthouly 2002; Adelberg, 2017; Egertsdotter Etienne &*et al*., 2019).

در سیستم‌های غوطه‌وری موقت در ریزازدیادی و تکثیر شاخه، از ریزغده و جنین زایی سوماتیکی استفاده شده است (Adelberg, 2017). زمان غوطه‌وری یکی از عوامل مهم در کارایی این نوع سیستم‌ها است. عموماً، غوطه‌وری موقت کیفیت مواد گیاهی تولیدی را بهبود می‌بخشد، لذا استفاده از این سیستم باعث افزایش بنیه شاخه و فراوانی جنین‌های سوماتیکی نرمال می‌شود. یکی از دلایل اصلی موفقیت سیستم‌های غوطه‌وری موقت ترکیب تهویه بافت‌های گیاهی و تماس موقتی بافت با محیط کشت مایع است که این دو ویژگی در روش کشت مایع رعایت نمی‌شود. در سیستم‌های غوطه‌وری موقت زمان غوطه‌وری بسیار مهم است و جذب مواد غذایی و جذب بیش از حد آب را کنترل می‌کند (Berthouly, 2002; Mehrotra Etienne &*et al*., 2007). زمان غوطه‌وری بسته به نوع واریته و فرایند ریزازدیادی متفاوت است. برای ریزازدیادی دو رقم گلابی از سیستم غوطه‌وری موقت تجاری SETIS™ با دوره غوطه‌وری یک دقیقه در هر هشت ساعت استفاده شده است (Lotfi *et al*., 2020). در بررسی اثر سه نوع سیستم غوطه‌وری موقت شامل TIB®،RITA® و بیوراکتور جذر و مدی با دوره غوطه‌وری یک دقیقه برای هر ۱۲ ساعت بر کاهش هزینه‌های تولید و افزایش ضریب تکثیر گیاه آنتوریوم[1] در شرایط کشت بافت، بیشترین تعداد گیاهچه در سیستم TIB® با ۵۰/۸۳ گیاهچه به ازای هر ریزنمونه تولید شد (Ramírez-Mosqueda *et al*., 2019). با مقایسه تکثیر گیاه مورد در شرایط غوطه‌وری موقت و[2]سیستم کشت معمول (محیط کشت نیمه جامد) گزارش شد که شرایط غوطه‌وری موقت باعث رشد و تکثیر بهتر می‌شود و هزینه‌های تولید، نیروی کار مورد نیاز و زمان لازم برای تکثیر کاهش می‌یابد (Aka Kaçar *et al*., 2020).

استفاده از یک دستورالعمل دو مرحله‌ای، شامل کشت اولیه در محیط کشت نیمه جامد و تکثیر در سیستم غوطه‌وری موقت RITA® با دوره یک دقیقه غوطه‌وری در هر دو روز و محیط کشت MS حاوی ۰/۰۵ میلی‌گرم در لیتر BA برای تکثیر درخت

1. *Anthurium andreanum*
2. *Myrtus communis*

Tectona grandis موفقیت‌آمیز بوده است، درحالی‌که دوره زمانی کوتاهتر(یک دقیقه در هر روز) و مقادیر بالاتر سیتوکینین باعث شیشه‌ای شدن گیاهچه‌های تکثیر شده گردید (Aguilar *et al.*, 2019). در مقایسه تکثیر درخت زیتون به روش معمول کشت بافت در محیط کشت نیمه جامد با سیستم غوطه‌وری موقت (Plantform™) در دوره غوطه‌وری ۸ دقیقه در هر ۱۶ ساعت نیز گزارش شده است که غوطه‌وری موقت شرایط بهتری را برای رشد فراهم می‌کند، به‌طوری که در دوره ۲۸ روزه سرعت رشد نسبی گیاهچه‌ها نسبت به محیط کشت نیمه جامد ۱/۶ برابر بود (Benelli & Carlo, 2018). تولید گیاهچه‌های موز نیز در یک سیستم غوطه‌وری موقت در ظرف کشت ۲۵۰ میلی لیتری و دوره غوطه‌وری ۲ دقیقه در هر ۶ ساعت برای تکثیر و ریشه زایی موز، یک سیستم مقرون به صرفه گزارش شده است. در این سیستم کشت بعد از ششمین واکشت ۱۴۹۶ عدد گیاه با وضعیت فیزیولوژیکی مناسب تولید شده است، به‌طوری که ضریب تکثیر در این سیستم غوطه‌وری موقت ۲/۷ برابر بیشتر از سیستم های معمول کشت در محیط کشت نیمه جامد بود (Uma *et al.*, 2021).

در بررسی شرایط بهینه برای تکثیر گیاه *Bletilla striata* در وضعیت غوطه‌وری موقت، دوره غوطه‌وری سه دقیقه در هر دو ساعت برای تولید پروتوکورم ها و سه دقیقه در هر شش ساعت برای نمو آنها توصیه شده است. همچنین، افزایش غلظت ساکارز تا ۴۰ گرم در لیتر اثر قابل توجهی بر تولید پروتوکورم و نمو گیاهچه‌ها داشته است (Zhang *et al.*, 2018) . همچنین گزارش شده است که برای کشت درون شیشه‌ای *Stevia rebaudiana* در مقیاس وسیع در سه نوع سیستم تعلیق موقت تجاری (RITA، BIT و SETIS) میزان ۳۰ گرم در لیتر ساکارز مناسب است و با افزایش آن به ۴۰ گرم در لیتر تعداد گیاهچه تولیدی به شدت کاهش می‌یابد (Rosales *et al.*, 2018). تکثیر درخت نخل خرما (*Phoenix dactylifera* L.) در شرایط غوطه‌وری موقت نیز نسبت به محیط کشت نیمه جامد باعث کاهش هزینه‌های تولید از طریق کاهش هزینه‌های نیروی کار، زمان لازم برای تکثیر و سازگاری بهتر گیاهچه‌های تکثیر شده می‌شود(Abahmane *et al.*, 2020) . مقایسه دو سیستم کشت شامل محیط کشت نیمه جامد و سیستم غوطه‌وری موقت با سطوح مختلف BA (صفر، ۱، ۲ و ۳ میلی‌گرم در لیتر) به‌منظور تکثیر گیاه *Stevia rebaudiana* نشان داده است که در محیط کشت نیمه جامد بیشترین تعداد شاخه در سطوح یک و دو میلی‌گرم در لیتر BA حاصل می‌شود و با افزایش سطح این تنظیم کننده رشد به سه میلی‌گرم در لیتر تعداد شاخه تولیدی کاهش می‌یابد. این درحالی است که در سیستم غوطه‌وری موقت تعداد شاخه بیشتری نسبت به محیط کشت نیمه جامد تولید شد و بیشترین شاخه در محیط کشت حاوی یک میلی‌گرم در لیتر BA بدست آمد. با افزایش میزان این تنظیم کننده رشد تا سه میلی‌گرم در لیتر تعداد شاخه تولیدی بطور قابل توجهی کاهش یافت (Ramírez-Mosqueda *et al.*, 2016). از سیستم غوطه‌وری موقت برای تکثیر پایه هیبرید هلو– بادام (GF677) نیز استفاده شده است. در مقایسه دو نوع بیوراکتور تک پارچه و دو پارچه با کشت معمول، بیوراکتورها در مقایسه با محیط کشت نیمه جامد شرایط بهتری برای رشد و تکثیر گیاهان این پایه فراهم نمودند (Bagheri *et al.*, 2016).

با توجه به مزایای ریزازدیادی گیاهان در سیستم های غوطه‌وری موقت، در این بررسی به‌منظور کاهش هزینه‌های تولید پایه رویشی تجاری GN15، به دلیل داشتن خصوصیاتی چون تحمل خاک‌های آهکی، مقاومت به خشکی، شوری، کلروز و نماتد، در آزمایش های مجزا شرایط کشت درون شیشه‌ای این گیاه در بیوراکتور غوطه‌وری موقت مورد ارزیابی قرار گرفت و نتایج حاصل با شرایط کشت بافت مرسوم مقایسه شد.

روش‌شناسی پژوهش

به منظور ارزیابی تکثیر پایه GN15 در بیوراکتور غوطه‌وری موقت و محیط کشت نیمه جامد، در بهار سال ۱۴۰۱ شاخه‌های نورسته به طول ۲۰ تا ۳۰ سانتی‌متر که عاری از بیماری بوده و در وضعیت رشد فعال قرار داشتند از پایه مادری پنج ساله، واقع در پردیس دانشگاه فردوسی مشهد جداسازی و به آزمایشگاه کشت بافت گروه پژوهشی بیوتکنولوژی گیاهان باغبانی جهاد دانشگاهی خراسان رضوی منتقل شدند. برگ‌های شاخه‌ها حذف و ریزنمونه‌ها جهت ضدعفونی به مدت ۳۰ دقیقه در آب جاری

شستشو داده شدند. پس از این مرحله، از اتانول ۷۰ درصد به مدت یک دقیقه و سپس محلول ۱/۵ درصد هیپوکلریت سدیم به مدت ۱۵ دقیقه برای ضدعفونی ریزنمونه‌ها استفاده شد. در نهایت، تحت شرایط استریل زیرهود لامینار سه مرتبه در مجموع به مدت ۱۵ دقیقه با آب مقطر استریل آبکشی شدند. ریزنمونه‌های گره دار به طول یک سانتی‌متر برش داده شدند و درسه محیط کشت شامل A: محیط کشت نیمه جامد MS حاوی یک میلی‌گرم در لیتر BA؛ B: محیط کشت MS حاوی ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BA؛ C: کشت اولیه ریزنمونه‌ها ابتدا در محیط کشت MS حاوی ۱ میلی‌گرم در لیتر GA_3 به مدت ۳ هفته و سپس انتقال به محیط کشت MS حاوی یک میلی‌گرم در لیتر BA؛ حاوی ۳ درصد ساکارز، ۸ گرم در لیتر آگار با pH معادل ۵/۷ کشت شدند. پس از استقرار ریزنمونه‌ها از آنها به عنوان ریزنمونه اولیه برای تکثیر در شرایط بیوراکتور استفاده شد.

بهینه سازی شرایط تکثیر پایه GN15 در بیوراکتور غوطه‌وری موقت

به‌منظور ارزیابی عوامل مختلف بر سرعت رشد و تکثیر پایه GN15 در شرایط بیوراکتور غوطه‌وری موقت از سیستم ارائه شده توسط Entesar *et al.* (2012) استفاده شد. براساس نتایج آزمایش قبل، ابتدا ریزنمونه‌های گره در محیط کشت نیمه جامد MS حاوی ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BA (محیط B) و سه درصد ساکارز کشت و پس از فعال شدن جوانه‌ها از آنها برای آزمایش‌های بعدی استفاده شدند. در سه آزمایش جداگانه، عوامل دوره تناوب غوطه‌وری، غلظت تنظیم کننده رشد محیط کشت و ساکارز در مرحله تکثیر مورد ارزیابی قرار گرفتند.

درآزمایش اول، محیط کشت مورد استفاده محیط MS حاوی ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BA و ۳ درصد ساکارز بود و به صورت طرح کاملا تصادفی با چهار تیمار و شش تکرار اجرا شد. در این آزمایش اثر شرایط غوطه‌وری موقت با اعمال ۳ دوره تناوب غوطه‌وری (دوره زمانی غوطه‌وری ۱۰ دقیقه در هر ۶، ۱۲ و ۲۴ ساعت) با استفاده از در یک دوره زمانی ۵۰ روز بر خصوصیات رشدی و بیوشیمیایی شاخساره‌های حاصل مورد ارزیابی قرار گرفت. در هر بیوراکتور غوطه‌وری موقت ۶ ریزنمونه (دو ریزنمونه در هر ظرف) قرار گرفت که به عنوان تکرار در نظر گرفته شد. به‌منظور مقایسه عملکرد بیوراکتور غوطه‌وری موقت با روش معمول کشت، یک تیمار نیز همزمان در محیط کشت نیمه جامد (A) (۸ گرم در لیتر آگار) انجام شد. در محیط کشت نیمه جامد در هر ظرف کشت ۲۰۰ میلی لیتری یک ریزنمونه قرار گرفت که ۶ ظرف مجزا به عنوان تکرار برای آن در نظر گرفته شد. آزمایش دوم به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملا تصادفی با دو فاکتور غلظت‌های مختلف BA شامل صفر، ۰/۵ و ۱ میلی‌گرم در لیتر و نوع کشت (بیوراکتور غوطه‌وری موقت و محیط کشت نیمه جامد) انجام شد. اثر غلظت‌های مختلف تنظیم کننده رشد BA در سیستم بیوراکتور غوطه‌وری موقت با دوره غوطه‌وری ۱۰ دقیقه در هر ۲۴ ساعت و محیط کشت نیمه جامد در یک دوره ۵۰ روز مورد ارزیابی قرار گرفت. در آزمایش سوم، اثر غلظت‌های مختلف ساکارز شامل ۳، ۴ و ۵ درصد در محیط کشت در دو سیستم بیوراکتور غوطه‌وری موقت با دوره غوطه‌وری ۱۰ دقیقه در هر ۲۴ ساعت و محیط کشت نیمه جامد در یک دوره ۵۰ روز و در محیط کشت MS حاوی ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BA مورد ارزیابی قرار گرفت. آزمایش به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملا تصادفی با دو فاکتور غلظت‌های مختلف ساکارز و نوع کشت (بیوراکتور غوطه‌وری موقت و محیط کشت نیمه جامد) انجام شد. تعداد ریزنمونه‌ها و تکرارها در هر ظرف بیوراکتور و محیط کشت نیمه جامد در هر سه آزمایش مشابه بود.

پس از گذشت ۵۰ روز از شروع اعمال تیمارها، خصوصیات رشدی، شامل تعداد گیاهچه تکثیر شده از طریق شمارش تعداد گیاهچه رشد یافته بیش از ۵ میلی‌متر، ارتفاع گیاهچه برحسب سانتی‌متر با استفاده از خط‌کش، سطح برگ با اندازه گیری سطح تمامی برگ ها از طریق آنالیز تصویر با استفاده از نرم افزار ایمیج جی ، طول دمبرگ برحسب سانتی‌متر با استفاده از خط‌کش، تعداد ریشه از طریق شمارش تعداد ریشه رشد یافته بیش از ۵ میلی‌متر، طول ریشه برحسب سانتی‌متر با استفاده از خط‌کش اندازه‌گیری شد.

1. ImagJ

جهت ارزیابی خصوصیات فیزیولوژیکی، از برگ‌های میانی گیاهچه‌های تکثیر شده استفاده شد. به‌منظور اندازه گیری محتوای آب (WC) برگ و محتوای نسبی آب (RWC) برگ برای هر یک از تکرارهای تیمارهای آزمایش یک برگ جدا شده و بلافاصله وزن شد (FW). سپس انتهای دمبرگ‌ها به مدت ۵ ساعت در آب مقطر قرار گرفت و با حذف آب اضافی با کمک دستمال کاغذی دوباره وزن شد (TW). در نهایت، وزن خشک (DW) برگ‌ها با خشک کردن در دمای ۷۰ درجه سلسیوس به مدت ۲۴ ساعت اندازه گیری شد. محتوای آب برگ برحسب درصد با استفاده از رابطه ۱ (Ramirez-Vallejo & Kelly, 1998) و محتوای نسبی آب برگ برحسب درصد با استفاده از رابطه ۲ (Matin *et al.*, 1989) محاسبه شد.

$$WC= (FW-DW)/DW*100$$ رابطه ۱)

$$RWC= (FW-DW)/(TW-DW)*100$$ رابطه ۲)

شاخص پایداری غشا (MSI) با اندازه گیری هدایت الکتریکی عصاره نشت شده از مقدار مشخصی برگ (با کمک پانچر با سطح مقطع دایره‌ای به قطر یک سانتی‌متر) در آب مقطر محاسبه شد. بدین ترتیب که برای هر تکرار از تیمارهای آزمایش یک دیسک برگی در ده میلی‌لیتر آب مقطر به مدت ۴ ساعت در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. پس از اندازه گیری هدایت الکتریکی (C_1) با استفاده از EC متر نمونه‌ها به مدت ۱۵ دقیقه در آب درحال جوش قرار گرفتند و دوباره هدایت الکتریکی آنها اندازه گیری شد (C_2). شاخص پایداری غشا با استفاده از رابطه ۳ محاسبه شد (Sairam, 1994).

$$MSI= (1-C_1/C_2)*100$$ رابطه ۳)

برای اندازه‌گیری میزان رنگدانه های فتوسنتزی، برای هر یک از تکرارهای تیمارهای آزمایش ۲۰۰ میلی‌گرم برگ تازه و جوان کاملا توسعه یافته جدا و استخراج رنگدانه‌ها با استفاده از ۱۰ میلی‌لیتر متانول ۹۶ درصد انجام شد میزان جذب نمونه ها با استفاده از اسپکتروفتومتر میکروپلیت ریدر مدل Epoch از شرکت بیوتک آمریکا اندازه گیری شد (Lichtenthaler & Buschmann, 2001).

برای اندازه‌گیری مقدار قندهای محلول، وزن مشخصی از برگ تازه گیاه (با کمک پانچر با سطح مقطع دایره‌ای به قطر یک سانتی‌متر) در هاون چینی کوبیده و نرم شد سپس مقدار ۵ میلی‌لیتر اتانول ۹۵ درصد به آن اضافه و سانتریفوژ گردید. پس از جدا نمودن قسمت بالایی محلول، به کمک ۵ میلی‌لیتر اتانول ۷۰ درصد مجددا جداسازی عصاره روی رسوبات باقیمانده انجام شد. عصاره استخراج شده به مدت ۱۵ دقیقه در ۴۵۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد. پس از این مرحله، به ۱۰۰ میکرولیتر از عصاره تهیه شده ۳ میلی‌لیتر معرف آنترون (۱۵۰ میلی‌گرم آنترون خالص+ ۱۰۰ میلی لیتر اسید سولفوریک ۷۲ درصد) اضافه گردید. سپس، نمونه‌ها به مدت ۱۰ دقیقه در حمام آب جوش قرار داده شدند. پس از خنک شدن نمونه‌ها، جذب آنها در طول موج ۶۲۵ نانومتر با دستگاه اسپکتروفتومتر قرائت و با مقایسه با منحنی استاندار، غلظت آنها محاسبه شد (Dubois *et al.*, 1956).

ریشه زایی و سازگاری گیاهچه‌های تکثیر شده

به‌منظور ارزیابی ریشه‌زایی، شاخساره‌های تکثیر شده در شرایط کشت غوطه‌وری موقت و محیط کشت نیمه جامد به صورت تک بوته تقسیم شده و در دو سیستم بیوراکتور غوطه‌وری موقت و کشت نیمه جامد و محیط کشت نصف غلظت نمک‌های MS، حاوی ۰/۶ میلی‌گرم بر لیتر IBA و سه درصد ساکارز منتقل شدند. از چهار ظرف کشت بیوراکتور غوطه‌وری موقت، هر کدام حاوی چهار ریزنمونه و محیط کشت مایع با دوره زمانی غوطه‌وری ۱۰ دقیقه در هر ۲۴ ساعت استفاده گردید. در محیط کشت نیمه جامد نیز با هشت تکرار در هر ظرف کشت دو ریزنمونه قرار گرفت. پنجاه روز پس از کشت نمونه‌ها در شرایط جدید، خصوصیات ارتفاع و تعداد گیاهچه تکثیر شده ، درصد ریشه‌زایی، تعداد و طول ریشه تولید شده اندازه‌گیری و ثبت شدند.

سپس، گیاهچه‌های ریشه‌دار شده در هر دو روش کشت در ظروف پلی‌اتیلن، حاوی بستر کشت ورمی‌کولیت و کوکوپیت (به نسبت مساوی) منتقل شدند. به‌منظور حفظ رطوبت در مراحل اولیه درب ظروف بسته شد و با گذشت زمان هوادهی افزایش یافت. ظروف در اتاقک رشد، در دمای ۲۲ تا ۲۴ درجه سلسیوس در روز و ۱۸ درجه سلسیوس در شب و در شرایط نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی قرار گرفتند. برای تغذیه گیاهان از محلول نصف غلظت MS به صورت هفته‌ای یکبار استفاده شد. پس از پایان آزمایش (تقریبا ۶۰ روز پس از شروع سازگاری)، خصوصیات درصد گیاهچه‌های سازگار شده، سطح برگ، تعداد و طول ریشه در هر گیاهچه سازگار شده مورد ارزیابی قرار گرفت.

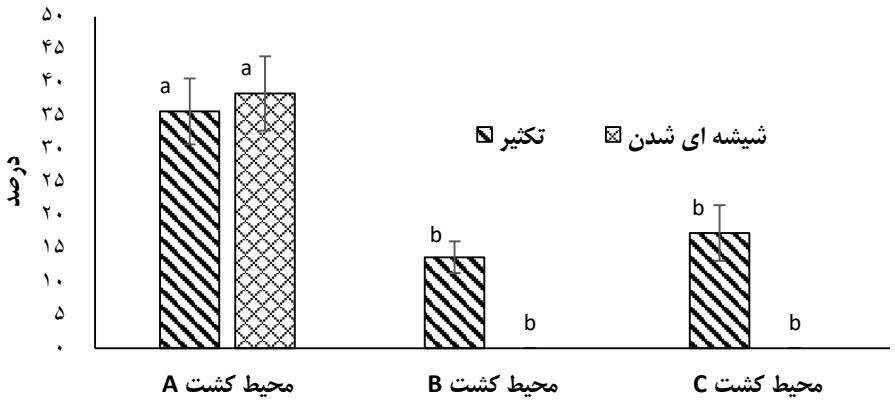
تجزیه و تحلیل آماری

آزمایش‌های تکثیر گیاهچه در قالب طرح کاملا تصادفی، با ۵ تکرار و آزمایش ریشه‌زایی در قالب طرح کاملا تصادفی با ۱۶ تکرار انجام شد. آماده سازی داده‌ها در برنامه Excel و تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار JMP-8 انجام شد. داده‌های درصدی با استفاده از فرمول $\arcsin\sqrt{x}$ نرمال شدند. مقایسه میانگین تیمارها با آزمون LSD در سطح احتمال پنج درصد انجام و نمودارها نیز با استفاده از برنامه Excel رسم شد.

یافته‌های پژوهش

استقرار اولیه ریزنمونه در شرایط کشت بافت

نتایج تجزیه واریانس داده‌های آزمایش استقرار ریزنمونه کشت شده نشان دهنده وجود اختلاف معنی‌دار بین تیمارها، از لحاظ درصد فعال شدن جوانه‌ها و همچنین شیشه‌ای شدن آنها بود. براساس داده‌های مقایسه میانگین بیشترین درصد فعال شدن جوانه‌ها و درصد شیشه‌ای شدن در محیط کشت A مشاهده شد. محیط کشت B و C از نظر درصد فعال شدن جوانه تفاوت معنی‌داری نداشتند و هیچ نمونه‌ای در آنها شیشه‌ای نشد (شکل۱).



شکل ۱. درصد تکثیر و شیشه‌ای شدن ریزنمونه‌های GN15 در محیط کشت‌های مختلف، محیط کشت A: MS حاوی یک میلی‌گرم در لیتر BA؛ محیط کشت B: MS حاوی ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BA؛ محیط کشت C: کشت اولیه ریزنمونه‌ها در محیط کشت MS حاوی ۱ میلی‌گرم در لیترGA3 به مدت ۳ هفته و سپس انتقال به محیط کشت MS حاوی یک میلی‌گرم در لیتر BA.

بهینه کردن شرایط تکثیر پایه GN15 در بیوراکتور غوطه‌وری موقت

اثر دوره تناوب غوطه‌وری

نتایج تجزیه واریانس داده‌های اثر دوره‌های تناوب بر خصوصیات مورفولوژیکی، فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی گیاهچه‌های تکثیر شده نشان داد که اثر تیمار بر وزن تر، وزن خشک، طول ساقه، سطح برگ، کلروفیل a وb، قند محلول، پایداری غشای سلولی و محتوای نسبی آب برگ معنی‌دار و بر تعداد گیاهچه تکثیر شده، مقدار کاروتنوئید و محتوای آب برگ معنی‌دار نبود.

نتایج مقایسه میانگین داده‌های خصوصیات مورفولوژیکی تیمارهای آزمایش نشان داد که گیاهچه‌های تولید شده در بیوراکتور غوطه‌وری موقت از نظر رشدی وضعیت بهتری نسبت به نمونه‌های رشد کرده در محیط کشت نیمه جامد داشتند. بیشترین وزن تر، وزن خشک و سطح برگ در دوره تناوب ۶ ساعت بدست آمد. لازم به توضیح است که با وجود رشد بهتر گیاهچه‌ها در دوره تناوب ۶ ساعت، بیشترین درصد شیشه‌ای شدن در این دوره تناوب مشاهده شد (جدول ۱ و شکل ۲). مطالعه خصوصیات فیزیولوژیکی نیز نشان داد که اختلاف معنی‌داری بین تیمارها در صفات محتوای نسبی آب برگ و پایداری غشای سلولی وجود داشت، به‌طوری که در تمام تیمارهای غوطه‌وری موقت مقادیر این دو صفت بیشتر از شاهد بودند، و بین دوره‌های تناوب اختلاف معنی‌داری وجود نداشت. از نظر آب از دست رفته برگ‌ها نیز کمترین مقدار مربوط به محیط کشت نیمه جامد (تیمار شاهد) بود (جدول ۱). همچنین، در بین خصوصیات بیوشیمیایی، محتوای قند برگ در تیمار شاهد و زمان تناوب ۶ ساعت از دو تیمار دیگر بیشتر بود که نشان دهنده وضعیت بهتر این تیمارها در جذب قند از محیط کشت به دلیل زمان تماس بیشتر می باشد. از لحاظ میزان کلروفیل a و b اختلاف معنی‌داری بین تیمارها دیده شد (جدول ۱).

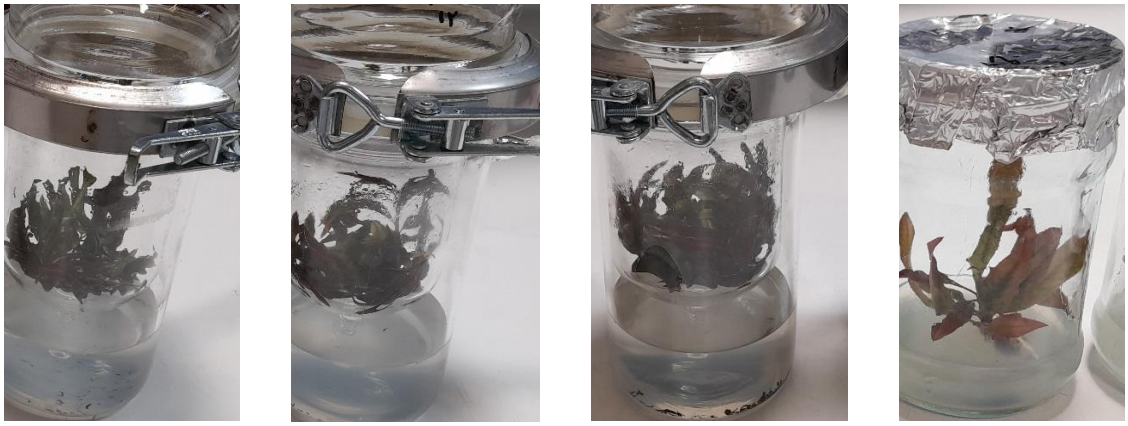
جدول ۱. اثر دوره‌های تناوب غوطه‌وری بر برخی خصوصیات گیاهچه‌های تکثیر شده پایه GN15 در بیوراکتور غوطه‌وری موقت

تیمار	وزن تر (گرم)	وزن خشک (گرم)	طول ساقه (سانتی‌متر)	سطح برگ (سانتی‌متر مربع)	کلروفیل a (میلی‌گرم بر گرم وزن تازه)
شاهد (محیط کشت نیمه جامد)	۰/۲۴۰ c	۰/۰۷۷ c	۱/۷۵ b	۱۱/۳۹ c	۱/۶۰ ab
۶ ساعت غوطه‌وری	۱/۸۷۸ a	۰/۵۱۳ a	۵/۲۲ a	۲۹/۵۴ a	۱/۹۹ a
۱۲ ساعت غوطه‌وری	۱/۳۸۱ ab	۰/۳۷۶ ab	۴/۱۵ a	۲۰/۳۳ b	۱/۳۲ b
۲۴ ساعت غوطه‌وری	۱/۰۸۷ b	۰/۳۲۲ b	۶/۰۰ a	۱۶/۷۲ bc	۲/۰۴ a

ادامه جدول ۱

تیمار	قندمحلول برگ (میلی‌گرم بر گرم وزن تازه)	شیشه‌ای شدن(درصد)	شاخص پایداری غشا (درصد)	محتوای نسبی آب (درصد)	کلروفیل b (میلی‌گرم بر گرم وزن تازه)
شاهد (محیط کشت نیمه جامد)	۸۴/۲۸ a	۰ c	۴۸/۹۱ b	۷۲/۲۴ b	۰/۶۰۶ bc
۶ ساعت غوطه‌وری	۸۲/۴۵ a	۳۳ a	۱۱۰/۰ a	۸۸/۳۱ a	۰/۷۷۵ab
۱۲ ساعت غوطه‌وری	۲۸/۹۸ b	۱۶ b	۹۶/۸۷ a	۹۶/۴۷ a	۰/۴۲۴ c
۲۴ ساعت غوطه‌وری	۳۴/۴۳ b	۰ c	۹۱/۴۲ a	۸۷/۶۱ a	۰/۹۷۱ a

مقادیر میانگین های دارای حروف مشترک در هر ستون فاقد تفاوت معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد، بر اساس آزمون حداقل اختلاف معنی‌دار (LSD) می‌باشند.



شکل ۲. گیاهچه‌های GN15 رشد یافته در تیمارهای مختلف آزمایش. از راست به چپ، محیط کشت نیمه جامد و به ترتیب دوره تناوب غوطه‌وری ۶، ۱۲ و ۲۴ ساعت

اثر نوع محیط کشت و غلظت BA

نتایج تجزیه واریانس داده‌های اثر سطوح BA و نوع کشت بر خصوصیات مورفولوژیکی، فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی گیاهچه‌های تکثیر شده نشان داد که اثر ساده نوع کشت بر وزن تر و خشک اندام هوایی، وزن تر و خشک برگ، وزن تر و خشک ساقه، محتوای نسبی آب برگ و پایداری غشای سلولی ، محتوای کلروفیل a ، b و کاروتنوئید معنی‌دار و بر سایر خصوصیات معنی‌دار نبود. همچنین، اثر ساده سطوح BA بر وزن تر و خشک اندام هوایی، وزن تر و خشک برگ، وزن تر و خشک ساقه، ارتفاع، تعداد برگ، تعداد گیاهچه و سطح برگ معنی‌دار و بر سایر خصوصیات معنی‌دار نبود. اثر متقابل نوع کشت و سطوح BA بر خصوصیات سطح برگ، کلروفیل a، b، کاروتنوئید و قند برگ معنی‌دار و بر سایر پارمترها معنی‌دار نبود.

براساس نتایج مقایسه میانگین داده‌ها، اثر نوع محیط کشت بر خصوصیات فیزیولوژیکی معنی‌دار بود، به‌طوری که در اکثر تیمارها خصوصیات وزن تر و خشک اندام هوایی، وزن تر و خشک برگ، پایداری غشای سلولی و محتوای نسبی آب برگ در بیوراکتور غوطه‌وری مقادیر بیشتری نسبت به محیط کشت نیمه جامد داشتند (جدول ۲). همچنین، اثر غلظت تنظیم کننده رشد BA بر برخی صفات معنی دار بود، به‌طوری که در اکثر تیمارها مقادیر ویژگی‌های وزن تر و خشک اندام هوایی، وزن تر و خشک برگ، ارتفاع و تعداد گیاهچه در محیط حاوی یک میلی‌گرم در لیتر BA بیشتر از سایر تیمارهای آزمایش بود (جدول ۳). در بین خصوصیات بیوشیمیایی، محتوای کلروفیل a ، b و کاروتنوئید در محیط کشت نیمه جامد حاوی BA وضعیت بهتری را نسبت به سیستم بیوراکتور غوطه‌وری نشان دادند، اما محتوای قند برگ چندان تحت تاثیر تیمار قرار نگرفت (جدول ۴). در مجموع، گیاهچه‌های رشد یافته در بیوراکتور غوطه‌وری حاوی یک میلی‌گرم در لیتر BA از نظر رشدی وضعیت بهتری داشتند (شکل‌های ۳ و ۴)، با این‌حال در نمونه‌هایی که رشد زیادی داشتند علائمی از شیشه‌ای شدن مشاهده شد.

جدول۲. اثر نوع کشت بر برخی خصوصیات گیاهچه‌های تکثیر شده پایه GN15 در شرایط کشت بافت

نوع کشت	وزن تر اندام هوایی(گرم)	وزن خشک اندام هوایی(گرم)	وزن تر برگ(گرم)	وزن خشک برگ(گرم)	وزن تر ساقه(گرم)	وزن خشک ساقه(گرم)	شاخص پایداری غشا (درصد)	محتوای نسبی آب (درصد)
محیط کشت نیمه جامد	۰/۵۳ b	۰/۱۳ b	۰/۲۶ b	۰/۰۶ b	۰/۲۶ b	۰/۰۵۷ b	۴۶/۰۹ b	۶۶/۸۳ b
بیوراکتور غوطه‌وری	۲/۲۱ a	۰/۴۸a	۱/۲۳a	۰/۲۸ a	۰/۹۷ a	۰/۱۹۸ a	۷۵/۸۳ a	۸۰/۸۲ a

مقادیر میانگین های دارای حروف مشترک در هر ستون فاقد تفاوت معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد، بر اساس آزمون حداقل اختلاف معنی‌دار (LSD) می‌باشند.

جدول ۳. اثر سطوح BA بر برخی خصوصیات گیاهچه‌های تکثیر شده پایه GN15 در شرایط کشت بافت

BA (میلی گرم در لیتر)	وزن تر اندام هوایی(گرم)	وزن خشک اندام هوایی(گرم)	وزن تر برگ (گرم)	وزن خشک برگ(گرم گرم)	وزن تر ساقه(گرم گرم)	وزن خشک ساقه(گرم)	ارتفاع (سانتی‌متر)	تعداد برگ	تعداد گیاهچه
۰	۰/۶۳ b	۰/۱۸ b	۰/۴۲ b	۰/۱۲۴ b	۰/۲۱ b	۰/۰۶۰ b	۱/۹۳ b	۱۳/۶۰ b	۱/۰۰ b
۰/۵	۰/۹۴ b	۰/۲۱ b	۰/۵۴ b	۰/۱۲۶ b	۰/۴۰ b	۰/۰۷۹ b	۲/۸۰ b	۲۰/۲۵ b	۱/۵۲ b
۱	۲/۵۴ a	۰/۵۲ a	۱/۲۹a	۰/۲۸۰ a	۱/۲۵ a	۰/۲۴۳ a	۴/۳۵ a	۴۴/۵۰ a	۳/۲۰ a

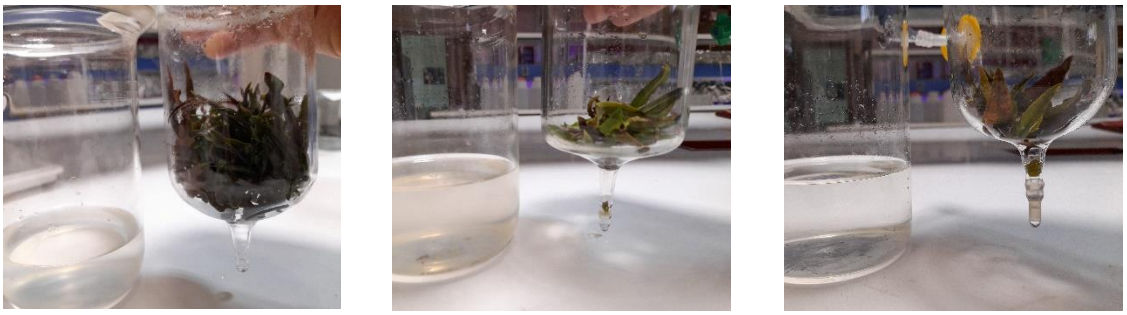
مقادیر میانگین های دارای حروف مشترک در هر ستون فاقد تفاوت معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد، بر اساس آزمون حداقل اختلاف معنی‌دار (LSD) می‌باشند.

جدول٤. اثر سطوح BA و نوع کشت بر برخی خصوصیات گیاهچه‌های تکثیر شده پایه GN15 در شرایط کشت بافت

نوع کشت	BA (میلی گرم در لیتر)	کلروفیل a (میلی‌گرم بر گرم وزن تازه)	کلروفیل b (میلی‌گرم بر گرم وزن تازه)	کاروتنوئید (میلی‌گرم بر گرم وزن تازه)	سطح برگ (سانتی‌متر مربع)	قند محلول برگ (میلی‌گرم بر گرم وزن تازه)
محیط کشت نیمه جامد	۰	۱/۲۲ b	۰/۴۸۷ b	۰/۳۸ bc	۵/۷۸ c	۱۰/۸۱ b
	۰/۵	۱/۸۳ a	۰/۶۸۴ a	۰/۵۰ ab	۲۱/۶۷ bc	۱۲/۵۹ b
	۱	۱/۹۵ a	۰/۷۵۵ a	۰/۵۲ a	۲۶/۳۶ b	۱۴/۴۶ ab
بیوراکتور غوطه‌وری	۰	۱/۲۶ b	۰/۴۶۲ b	۰/۳۸ bc	۳۳/۵۲ b	۲۱/۷۹ a
	۰/۵	۰/۸۱ b	۰/۳۰۰ b	۰/۲۴ d	۲۶/۴۲ b	۱۵/۴۴ ab
	۱	۱/۰۵ b	۰/۴۱۷ b	۰/۲۸ cd	۶۷/۶۰ a	۹/۴۴ b

مقادیر میانگین های دارای حروف مشترک در هر ستون فاقد تفاوت معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد، بر اساس آزمون حداقل اختلاف معنی‌دار (LSD) می‌باشند.

شکل ۳. گیاهچه‌های GN15 رشد یافته در محیط کشت نیمه جامد. از راست به چپ، حاوی صفر، ۰/۵ و ۱ میلی‌گرم در لیتر BA



شکل ٤. شاخساره‌های GN15 رشد یافته در بیوراکتور غوطه‌وری. از راست به چپ، حاوی صفر، ۰/۵ و ۱ میلی‌گرم در لیتر BA

اثر نوع محیط کشت و میزان ساکارز

نتایج تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که اثر ساده ساکارز بر خصوصیات مورفولوژیکی مورد مطالعه موثر بود، به‌طوری که تعداد برگ، تعداد گیاهچه، ارتفاع و سطح برگ در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار شدند. علاوه بر این، اثر ساده نوع کشت (محیط کشت نیمه جامد و بیوراکتور غوطه‌وری موقت) بر خصوصیات مورفولوژیکی و فیزیولوژیکی مورد مطالعه موثر بودند، به‌طوری که وزن تر اندام هوایی، وزن خشک اندام هوایی، وزن تر برگ، وزن خشک برگ، وزن تر ساقه، وزن خشک ساقه، ارتفاع، تعداد برگ، سطح برگ، کلروفیلa، b و کاروتنوئید در سطح یک درصد و تعداد گیاهچه در سطح پنج درصد معنی‌دار شدند. اثر متقابل میزان ساکارز و نوع کشت برای تعداد برگ و پایداری غشای سلولی در سطح یک درصد و وزن تر ساقه، تعداد گیاهچه و سطح برگ در سطح پنج درصد معنی‌دار شدند. براساس نتایج مقایسه میانگین داده‌های خصوصیات فیزیولوژیکی، شاخساره های رشدیافته در بیوراکتور غوطه‌وری موقت در بیشتر صفات مورد بررسی، بجز میزان کلروفیل a، b و کاروتنوئید نسبت به محیط کشت نیمه جامد وضعیت بهتری داشتند (جدول ۵). در بررسی اثر برهمکنش نوع محیط کشت و میزان ساکارز بیشترین تعداد برگ، تعداد گیاهچه، وزن تر ساقه و سطح برگ در گیاهچه‌های رشد یافته در بیوراکتور غوطه‌وری حاوی ۳ و ۴ درصد ساکارز مشاهده گردید (جدول۶).

جدول۵. اثر نوع کشت بر برخی خصوصیات گیاهچه‌های تکثیر شده پایه GN15 در شرایط کشت بافت

نوع کشت	وزن تر اندام هوایی(گرم)	وزن خشک اندام هوایی(گرم)	وزن تر برگ(گرم)	وزن خشک برگ(گرم)	وزن خشک ساقه(گرم)	ارتفاع (سانتی‌متر)	کلروفیل a (میلی‌گرم بر گرم وزن تازه)	کلروفیل b (میلی‌گرم بر گرم وزن تازه)	کاروتنوئید (میلی‌گرم بر گرم وزن تازه)
بیوراکتور غوطه‌وری	۱/۲۲ a	۰/۲۶ a	۰/۶۰ a	۰/۱۶ a	۰/۰۹۹ a	۴/۱۳ a	۲/۱۸ b	۰/۹۱ b	۰/۵۴ b
محیط کشت نیمه جامد	۰/۳۵ b	۰/۰۷ b	۰/۱۳ b	۰/۰۳۶ b	۰/۰۴۲ b	۲/۵۳ b	۴/۲۶ a	۱/۶۹ a	۱/۰۶ a

مقادیر میانگین های دارای حروف مشترک در هر ستون فاقد تفاوت معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد، بر اساس آزمون حداقل اختلاف معنی‌دار (LSD) می‌باشند.

جدول ٦. اثر غلظت ساکارز و نوع کشت بر برخی خصوصیات گیاهچه‌های تکثیر شده پایه GN15 در شرایط کشت بافت

محیط کشت و ساکارز	تعداد برگ	تعداد گیاهچه	سطح برگ (سانتی‌متر مربع)	وزن تر ساقه (گرم)	MSI (درصد)
نیمه جامد و ساکارز ۳٪	۱۲/۸۰ b	۲/۶۰ ab	۱۸/۷۱ b	۰/۳۱۸ b	۵۱/۶۶ bc
نیمه جامد و ساکارز ۴٪	۱۳/۴۰ b	۱/۸۰ bc	۱۲/۶۹ b	۰/۱۶۶ b	۴۵/۳۳ c
نیمه جامد و ساکارز ۵٪	۱۰/۶۰ b	۱/۸۰ bc	۹/۰۶ b	۰/۲۳۷ b	۷۰/۰۰ a
غوطه‌وری و ساکارز ۳٪	۲۲/۶۰a	۳/۸۰ a	۴۱/۸۳ a	۰/۷۰۶ a	۶۴/۲۸ ab
غوطه‌وری و ساکارز ۴٪	۲۸/۶۰ a	۳/۶۰ a	۵۰/۹۵ a	۰/۸۲۹ a	۷۱/۶۲ a
غوطه‌وری و ساکارز ۵٪	۷/۸۰ b	۱/۲۰ c	۱۵/۸۱ b	۰/۳۱۸ b	۶۰/۶۶ ab

مقادیر میانگین های دارای حروف مشترک در هر ستون فاقد تفاوت معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد، بر اساس آزمون حداقل اختلاف معنی‌دار (LSD) می‌باشند.

ریشه‌زایی شاخساره‌ها و سازگاری گیاهچه‌های تکثیر شده

نتایج تجزیه واریانس داده‌های آزمایش نشان داد که درصد، تعداد و طول ریشه تحت تاثیر تیمارهای مختلف آزمایش قرار گرفت و در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار شدند. سایر خصوصیات، شامل ارتفاع گیاه، تعداد برگ و تعداد گیاهچه تکثیر شده تحت تاثیر تیمارهای آزمایش قرار نگرفت. نتایج آزمایش ریشه‌زایی نشان داد که شاخساره‌های رشد یافته در محیط کشت نیمه جامد به میزان ۵۰ درصد ریشه دار شدند، درحالی که در بیوراکتور غوطه‌وری موقت این میزان ۲۵ درصد بود. همچنین، گیاهچه‌های ریشه دار شده در محیط کشت نیمه جامد موفق به تولید ریشه بیشتری در مقایسه با گیاهچه‌های رشد یافته در بیوراکتور غوطه‌وری شدند. علاوه بر این، نتایج نشان داد که طول ریشه تولید شده در گیاهچه‌های رشد یافته در محیط کشت نیمه جامد به‌طور قابل توجهی در مقایسه با گیاهچه‌های رشد یافته در شرایط بیوراکتور غوطه‌وری موقت بیشتر بود (جدول ۷ و شکل ۵). قابل ذکر است که گیاهچه‌های رشد یافته در بیوراکتور غوطه‌وری علاوه بر شیشه‌ای شدن، ترد و شکننده بودند و کالوسی شدند (شکل ۴–۵). نتایج این آزمایش نشان داد که بیوراکتور غوطه‌وری موقت برای ریشه‌زایی GN15 مناسب نبوده و بهتر آن است که از روش های دو مرحله‌ای برای تکثیر این گیاه در شرایط بیوراکتور استفاده شود، بدین نحو که مرحله تکثیر در بیوراکتور غوطه‌وری موقت و مرحله ریشه‌زایی شاخساره‌ها در محیط کشت‌های نیمه جامد انجام شود.

جدول ۷. اثر نوع کشت بر برخی خصوصیات ریشه زایی پایه GN15 در شرایط کشت بافت

تیمار	درصد ریشه‌زایی	تعداد ریشه	طول ریشه (سانتی‌متر)
محیط کشت نیمه جامد	۵۰ a	۱/۳۱ a	۱/۳۹ a
بیوراکتور غوطه‌وری	۲۵ b	۰/۲۵ b	۰/۱۸ b

حروف مشابه در هر ستون بیانگر عدم تفاوت معنی‌دار بر اساس آزمون LSD در سطح احتمال پنج درصد می‌باشد.

شکل ۵. وضعیت ریشه‌زایی در گیاهچه‌های GN15 رشد یافته در محیط‌کشت نیمه جامد (راست) و بیوراکتور غوطه‌وری موقت (چپ). شاخص= یک سانتی‌متر

پنجاه روز پس از سازگاری گیاهچه‌ها در بستر ترکیبی کوکوپیت و پرلیت، رشد آنها مورد ارزیابی قرار گرفت. گیاهچه‌های حاصل از بیوراکتور غوطه‌وری موقت به‌علت اینکه ریشه‌های شکننده و کالوسی داشتند همگی از بین رفتند. همچنین، گیاهچه‌های ریشه‌دار شده در محیط کشت نیمه جامد با فراوانی ۸۲ درصد سازگار شدند. گیاهچه‌های سازگار شده دارای متوسط ارتفاعی برابر با ۲/۸ سانتی‌متر، متوسط وزن تر اندام هوایی ۰/۲۸۶ گرم، وزن خشک اندام هوایی ۰/۰۷۵ گرم، سطح برگ ۱۲/۸۲ سانتی‌متر مربع، وزن تر ریشه ۰/۱۸ گرم و وزن خشک ریشه ۰/۰۲۶ گرم بودند. ریشه‌های گیاهچه‌های سازگار شده به خوبی توسعه یافته بودند.

بحث

استقرار ریزنمونه‌ها در محیط کشت، به شدت تحت تاثیر انتخاب نوع محیط کشت پایه و تنظیم کننده‌های رشد، روش های آلودگی زدایی، عوامل محیطی شرایط کشت بافت و ژنوتیپ گیاه قرار می‌گیرد (Arab *et al*., 2014; Shokri, *et al*., 2013). در آزمایش حاضر در مرحله استقرار، اثر مقادیر ۰/۵ و یک میلی‌گرم در لیتر BA و همچنین کشت سه هفتگی ریزنمونه‌ها در محیط کشت حاوی یک میلی‌گرم در لیتر GA_3، و سپس انتقال به محیط کشت حاوی یک میلی‌گرم در لیتر BA مورد بررسی قرار گرفت. بیشترین درصد استقرار (۳۵/۷ درصد) در محیط کشت حاوی یک میلی‌گرم در لیتر BA مشاهده شد، اما درصد شیشه‌ای شدن ریزنمونه‌ها نیز در این محیط کشت بالا بود (۳۸/۴ درصد). اگرچه درصد استقرار در دو محیط کشت دیگر پایین بود، اما شیشه‌ای شدن در ریزنمونه‌ها مشاهده نشد. سایتوکینین ها نقش مهی در تنظیم تقسیم سلولی و اندام‌زایی در مریستم نوک شاخه دارند (Bartrina *et al*., 2011; Vanstraelen & Benková, 2012). افزودن اکسین یا GA_3 به محیط کشت می‌تواند باعث افزایش طول شاخه شود (Kane, 2005) ، اما اثر آن تحت تاثیر یک‌سری عوامل دیگر مانند غلظت سایتوکینین در محیط کشت قرار دارد (Pua & Rousselle, 1983). گزارش شده است که GA_3 تنها در سطح بهینه سایتوکینین باعث رشد شاخه در ریزقلمه‌های سیب گردید (Geng *et al*., 2016). همچنین بیشترین شاخه‌زایی *Prunus mahaleb* L. در محیط کشت MS، حاوی یک میلی‌گرم در لیتر GA_3 و یک میلی‌گرم در لیتر BA به‌دست آمده است(Bagheri *et al*., 2013). ریزازدیادی پایه GF677 (هیبرید هلو – بادام) نیز در محیط کشت MS، حاوی یک میلی‌گرم در لیتر BA و ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر GA_3 موفق بوده است(Ganji Moghadam *et al*., 2008).

در مرحله پرآوری، به منظور بهینه سازی تکثیر پایه GN15 در شرایط درون شیشه‌ای، اثر دوره غوطه‌وری، ترکیب تنظیم کننده‌های رشد و میزان ساکارز محیط کشت در بیوراکتور غوطه‌وری موقت در مقایسه با محیط کشت نیمه جامد مورد ارزیابی

قرار گرفت. در تمام آزمایش‌های انجام شده بیوراکتور غوطه‌وری موقت شرایط بهتری را برای رشد و تکثیر گیاهچه‌های GN15 فراهم نمود. همانند اثرات مثبت غوطه‌وری موقت بر رشد و شاخه‌زایی گیاهچه‌های GN15 انجام شده در این بررسی، نتایج مشابهی نیز در گیاهانی چون *Pinus radiata* (Aitken-Christie & Jones, 1987)، قهوه (Berthouly *et al.*, 1995)، سیب زمینی (Akita & Takayama, 1994)، *Citrus deliciosa* (Cabasson *et al.*, 1997)، گیاه گوشتخوار *Drosera communis* (Kunakhonnuruk *et al.*, 2019)، *Stevia rebaudiana* (Posada-Pérez *et al.*, 2017)، موز (Uma *et al.*, 2021)، *Bletilla striata* (Zhang *et al.*, 2018) و نخل خرما (Abahmane *et al.*, 2020) گزارش شده است. یکی از دلایل اصلی موفقیت سیستم‌های غوطه‌وری موقت ترکیب تهویه هوا و تماس موقتی بافت با محیط کشت مایع است که این دو ویژگی در روش کشت مایع رعایت نمی‌شود. در این روش، با انتخاب زمان مناسب دوره تعلیق برخی از عوامل محدود کننده نظیر غلظت بالای اتیلن، CO_2 و رطوبت نسبی بالا، که از عوامل محیطی بروز شیشه‌ای شدن هستند (Zapata *et al.*, 2004; Cordovilla *et al.*, 2014) کنترل می‌شود. در بررسی ریزازدیادی دو رقم گلابی در بیوراکتور غوطه‌وری موقت SETIS با کاهش فاصله‌زمانی غوطه‌وری، درصد شیشه‌ای شدن گیاهچه‌های تکثیری به‌شدت افزایش یافت و استفاده از meta–Topolin riboside یا meta–Methoxy topolin riboside به جای BA شیشه‌ای شدن گیاهچه‌ها را به‌شدت کاهش داد و بیشترین تعداد شاخه در دوره غوطه‌وری ۸ ساعت بدست آمد، در حالی‌که با افزایش فاصله زمانی غوطه‌وری تعداد گیاهچه تکثیری کاهش یافت (Lotfi *et al.*, 2020). مقایسه دو نوع بیوراکتور غوطه‌وری موقت و پیوسته برای شاخه‌زایی سیب نشان داد که بیوراکتور غوطه‌وری موقت شیشه‌ای شدن را کاهش می‌دهد و شاخه‌های بیشتر و با کیفیت بهتری نسبت به سیستم پیوسته تولید می‌کند (Zhu *et al.*, 2005).

تکثیر شاخه تحت تاثیر عوامل مختلفی چون ژنوتیپ، ترکیب محیط کشت (Ružić & Vujović, 2008; Ivanova & Staden, 2009; Yang & Liu, 2012)، عوامل محیطی شرایط کشت بافت و برخی از عوامل دیگر قرار می‌گیرد. گونه‌های مختلف نیاز تغذیه‌ای متفاوتی برای رشد بهینه دارند، هر گونه کمبود یا افزایش مواد غذایی خاص می‌تواند باعث بروز اثرات منفی و مشکلات فیزیولوژیکی مانند شیشه‌ای شدن شود (Ramage & Williams, 2002; Ivanova & Staden, 2009; Yang & Liu, 2012). ترکیب تنظیم کننده‌های رشد محیط کشت، به‌ویژه نوع و غلظت سایتوکینین‌ها نقش مهمی در رشد و نمو بافت‌های کشت شده دارد (Ružić & Vujović, 2008). همانند نتایج این آزمایش که استفاده از سایتوکینین (۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BA) باعث تحریک شاخه‌زایی در نمونه‌های کشت شده شد، ریزازدیادی پایه GF677 در بیوراکتور غوطه‌وری موقت با محیط کشت حاوی یک میلی‌گرم در لیتر BA و ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر NAA موفق بود (Bagheri *et al.*, 2016)

در اغلب کشت‌های درون شیشه‌ای درختان چوبی از جوانه‌های ریزنمونه گره به عنوان مواد اولیه گیاهی استفاده می‌شود. در این شرایط، جوانه فعال شده اتوتروف کامل نبوده و نیاز به منبع انرژی نظیر کربوهیدارت‌ها دارد (Yaseen *et al.*, 2009)، بنابراین کربوهیدرات‌ها به عنوان منبع مهم تامین انرژی در محیط کشت نقش قابل توجهی در القای اندام‌زایی و کنترل بیان ژن‌های موثر در این مسیر دارد (Li & Leung, 2000; de Paiva Neto & Otoni, 2003). ساکارز در کنار سایر منابع کربن نقش مثبتی در نمو شاخه و ریشه در گونه‌های جنس *Prunus* دارد (Cheong & An, 2015; Bahmani *et al.*, 2009). همچنین، برای رشد و نمو مناسب جوانه‌ها سطح بهینه‌ای از کربوهیدرات ضروری است، به‌طوری‌که سطوح پایین به دلیل عدم تامین انرژی کافی و سطوح بالا با ایجاد استرس‌های اسمزی در گیاهچه‌ها باعث رشد محدود آنها می‌شود (Huang & Liu, 2002; Gerdakaneh *et al.*, 2009). در نتایج حاضر نیز سطوح ۳ و ۴ درصد ساکارز برای شاخه‌زایی و رشد شاخه‌ها مناسب بود.

نتایج ریشه‌زایی و سازگاری گیاهچه‌های GN15 در شرایط درون شیشه‌ای در دو سیستم کشت شامل محیط کشت نیمه جامد و بیوراکتور غوطه‌وری موقت نشان داد که شرایط بیوراکتور غوطه‌وری موقت برای ریشه‌زایی GN15 مناسب نبوده، به‌طوری که تمام گیاهچه‌ها در این شرایط شیشه‌ای شده و طی فرایند سازگاری از بین رفتند. برعکس، محیط کشت نیمه جامد

شرایط بهتری را برای ریشه‌زایی فراهم نمود، به‌طوری که ۵۰ درصد گیاهچه‌ها ریشه دار شده و ریشه‌های طبیعی داشتند. نیز بیشترین ریشه‌زایی (۴۳/۲ درصد) گیاهچه‌های محلب در محیط کشت MS، حاوی ۰/۸ میلی‌گرم در لیتر IBA گزارش شده است (Gangi Moghadam *et al*., 2008)، اگرچه ریشه‌زایی ۱۰۰ درصدی این گیاه در محیط کشت بدون هورمون نیز به‌دست آمده است (Mahdavian *et al*., 2010). همچنین، بیشترین میزان ریشه‌زایی (۷۹/۷ درصد) در گیاه *Prunus salicina* در محیط کشت نصف غلظت MS، با ۰/۲ تا ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر IBA و ۲۰ تا ۴۰ میلی‌گرم در لیتر فلوروگلوسینول مشاهده شده است (Ying-Ning, 2010) .

نتیجه‌گیری و پیشنهادها

استقرار ریزنمونه‌ها در محیط کشت به شدت تحت تاثیر انتخاب نوع محیط کشت پایه و تنظیم کننده‌های رشد، روش‌های آلودگی زدایی و عوامل محیطی شرایط کشت بافت قرار داشته و تمام این عوامل به شدت تحت تاثیر ژنوتیپ می باشند. در تحقیق حاضر در میان محیط‌های کشت مورد بررسی برای استقرار ریز نمونه های پایه GN15 ،بهترین محیط کشت از نظر درصد بالای استقرار ریزنمونه‌ها و کمترین تعداد نمونه شیشه‌ای شده، محیط کشت حاوی ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BA بود. در مقایسه دو سیستم کشت محیط کشت نیمه جامد و بیوراکتور غوطه‌وری موقت جهت پرآوری پایه GN15 بیوراکتور غوطه‌وری موقت شرایط مناسب‌تری را برای رشد و تکثیر شاخساره‌های GN15 فراهم نمود. اگرچه در تمام آزمایش‌های انجام شده در این بررسی، دوره تناوب غوطه‌وری ۶ ساعت بیشترین تولید شاخساره را داشت، اما با شیشه‌ای شدن نمونه ها همراه بود.. لازم به ذکر است که با افزایش دوره تناوب غوطه‌وری تعداد گیاهچه تکثیر شده نیز کاهش یافت. با افزایش میزان BA در هر دو سیستم کشت میزان شاخه‌زایی و رشد گیاهچه‌ها افزایش یافت اما این افزایش در بیوراکتور غوطه‌وری موقت بیشتر بود، به‌طوری که در سطح یک میلی‌گرم در لیتر BA تعداد ۴ گیاهچه از هر ریزنمونه تولید شد. با این حال، در این سطح از تنظیم کننده رشد BA، علائم شیشه‌ای شدن در نمونه‌های تکثیری هم مشاهده شد. در خصوص میزان ساکارز، در محیط کشت نیمه جامد، سطح ۳ درصد ساکارز و در بیوراکتور غوطه‌وری موقت، مقادیر سه و چهار درصد ساکارز برای رشد و تکثیر شاخساره مناسب بودند، اما با افزایش میزان ساکارز پرآوری شاخساره و کیفیت آن به‌شدت کاهش یافت. نتایج ریشه‌زایی و سازگاری گیاهچه‌های GN15 در شرایط درون شیشه‌ای نشان داد که شرایط بیوراکتور غوطه‌وری موقت برای ریشه‌زایی GN15 مناسب نبوده، به‌طوری که تمام گیاهچه‌ها در این شرایط شیشه‌ای شده و طی فرایند سازگاری از بین رفتند. برعکس، محیط کشت نیمه جامد شرایط بهتری را برای ریشه‌زایی فراهم نمود، به‌طوری که ۵۰ درصد گیاهچه‌ها ریشه دار شده و ریشه‌های طبیعی داشتند. در مجموع، جهت استفاده از مزایای بیوراکتور غوطه‌وری موقت در تکثیر GN15 به روش درون شیشه‌ای توصیه می‌شود که از روش دو مرحله‌ای استفاده شود، به‌نحوی که مرحله تکثیر در بیوراکتور غوطه‌وری موقت و مرحله ریشه زایی گیاهچه‌ها در محیط کشت نیمه جامد انجام شود.

به منظور افزایش ضریب تکثیر شاخساره‌های GN15 در شرایط غوطه‌وری موقت، زمانی که از سطوح بالای سیتوکینین استفاده می‌شود پیشنهاد می‌گردد اثر نمک‌های مختلف محیط کشت به‌ویژه ترکیبات ازته و کلرید، و همچنین استفاده از تهویه خارجی به منظور کاهش میزان رطوبت محیط مورد بررسی قرار گیرد.

تقدیر و تشکر

از جهاد دانشگاهی به دلیل تامین منابع مالی انجام آزمایشات این مقاله، در قالب طرح پژوهشی با کد ۲۰-۶۰۴۱ کمال تشکر را دارد.

1. *Prunus ahaleb* L.

منابع

باقری، سکینه؛ امیری، محمد اسماعیل؛ داودی، داریوش و انتصاری، مهرناز (۱۳۹۲). بررسی و مقایسه ظروف کشت رایج و بیوراکتورتناوبی جهت تکثیر انبوه پایه GF677 (هیبرید هلو× بادام). *نشریه علوم باغبانی* ۲۷ (۱)، ۳۶-۴۳. https://doi.org/10.22067/jhorts4.v0i0.20784

باقری، سکینه؛ امیری، محمد اسماعیل؛ داودی، داریوش و انتصاری، مهرناز (۱۳۹۵). تاثیر محیط کشت‌های مختلف در ریزازدیادی پایه GF677 (هیبرید هلو – بادام). *نشریه علوم باغبانی* ۳۰ (۴)، ۶۱۶-۶۲۳. https://doi.org/10.22067/jhorts4.v0i0.32259

گنجی مقدم، ابراهیم؛ بلندی، احمد رضا و آناهید، صدیقه (۱۳۸۷). تکثیر درون شیشه‌ای چهار ژنوتیپ پاکوتاه گزینش شده محلب. *مجله پژوهش و سازندگی در منابع طبیعی*. ۵۴،۷۹-۶۱

مهدویان، مرتضی؛ بوذری، ناصر و عبدالهی، حمید (۱۳۸۹). اثر محیط کشت و تنظیم کننده رشد بر پرآوری و ریشه‌زایی پایه رویشی محلب (سنت لوسی ۶۴). *مجله به نژادی نهال و بذر* ۲۶ (۱)، ۱۵-۲۶. https://doi.org/10.22092/SPIJ.2017.110967

REFERENCES

Abahmane, L. (2020). A comparative study between temporary immersion system and semi-solid cultures on shoot multiplication and plantlets production of two Moroccan date palm (*Phoenix dactylifera* L.) varieties *in vitro*. *Notulae Scientia Biologicae*, 12(2), 277-288. https://doi.org/10.15835/nsb12210610

Adelberg, J. (2017). Bioreactors and "smart vessels" for large-scale propagation. *Acta Horticulturae, ISHS*, 1187, 123-138. https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2017.1187.15.

Aguilar, M. E., Garita, K., Kim, Y. W., Kim, J. A., & Moon, H. K. (2019). Simple protocol for the micropropagation of teak (*Tectona grandis* Linn.) in semi-solid and liquid media in RITA® bioreactors and *ex vitro* rooting. *American Journal of Plant Sciences*, 10(7), 1121-1141. https://doi.org/ 10.4236/ajps.2019.107081

Aitken-Christie, J., & Jones, C. (1987). Towards automation: Radiata pine shoot hedges *in vitro*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 8, 185-196. https://doi.org/10.1007/BF00040945

Aka Kaçar, Y., Biçen, B., Şimşek, Ö. Z. H. A. N., Dönmez, D., & Erol, M. (2020). Evaluation and comparison of a new type of temporary immersion system (TIS) bioreactors for myrtle (*Myrtus communis* L.). *Applied Ecology and Environmental Research*, 18(1),1611-1620. http://dx.doi.org/10.15666/aeer/1801_16111620

Akita, M., & Takayama, S. (1994). Stimulation of potato (*Solanum tuberosum* L.) tuberization by semicontinuous liquid medium surface level control. *Plant Cell Reports*, 13, 184-187. https://doi.org/10.1007/BF00239889

Arab, M. M., Yadollahi, A., Hosseini-Mazinani, M., & Bagheri, S. (2014). Effects of antimicrobial activity of silver nanoparticles on *in vitro* establishment of G× N15 (hybrid of almond× peach) rootstock. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, *12*(2), 103-110. https://doi.org/10. 1016/j.jgeb.2014.10.002

Bagheri, S., Amiri, M. E., Davoodi, D. & Entesari, M. (2013). Study and comparison Jar and periodical bioreactor for mass propagation of rootstocks GF677 (*Prunus amygdalus*×*Prunus persica*). *Journal of Horticultural Science*, 27(1), 36-43. (In Persian). https://doi.org/10.22067/jhorts4.v0i0.20784

Bagheri, S., Davoudi, D., Amiri, M. E., Bayanati, M. & Entesari, M. (2016). The effect of different culture media on micropropagation of GF677 rootstock (peach-almond hybrid). Horticultural Science, 30(4), 616-623. (In Persian). https://doi.org/10.22067/jhorts4.v0i0.32259

Bahmani, R., Karami, O., & Gholami, M. (2009). Influence of carbon sources and their concentrations on rooting and hyperhydricity of apple rootstock MM. 106. *World Applied Sciences Journal*, 6(11), 1513-1517.

Bartrina, I., Otto, E., Strnad, M., Werner, T., & Schmülling, T. (2011). Cytokinin regulates the activity of reproductive meristems, flower organ size, ovule formation, and thus seed yield in

Arabidopsis thaliana. *The Plant Cell*, 23(1), 69-80. https://doi.org/10.1105/tpc.110.079079

Benelli, C., & De Carlo, A. (2018). *In vitro* multiplication and growth improvement of *Olea europaea* L. cv. Canino with temporary immersion system (Plantform™). *3 Biotech*, 8(7), 317. https://doi.org/ 10.1007/s13205-018-1346-4

Berthouly, M., Dufour, M., Alvard, D., Carasco, C., Alemanno, L., & Teisson, C. (1995, 9-14 april). *Coffee micropropagation in a liquid medium using the temporary immersion technique*. Seizième colloque scientifique international sur le café, Kyoto, Japon.

Cabasson, C., Alvard, D., Dambier, D., Ollitrault, P., & Teisson, C. (1997). Improvement of Citrus somatic embryo development by temporary immersion. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 50, 33-37.

Cheong, E. J., & An, C. (2015). Effect of carbohydrates on *in vitro* shoot growth of various *Prunus* species. *Korean J. Plant Res*, *28*(3), 357-362. https://doi.org/ 10. 1023/A:1005896725780

Cordovilla, M. P., Bueno, M., Aparicio, C., & Urrestarazu, M. (2014). Effects of salinity and the interaction between *Thymus vulgaris* and *Lavandula angustifolia* on growth, ethylene production and essential oil contents. *Journal of Plant Nutrition*, 37(6), 875-888. https://doi.org/ 10.1080/01904167.2013.873462

de Paiva Neto, V. B., & Otoni, W. C. (2003). Carbon sources and their osmotic potential in plant tissue culture: does it matter? *Scientia Horticulturae*, *97*(3-4), 193-202. https://doi.org/10.1016/S0304-4238(02)00231-5

Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. T., & Smith, F. (1956). Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical chemistry*, 28(3), 350-356. http://dx.doi.org/10.1021/ac60111a017

Egertsdotter, U., Ahmad, I., & Clapham, D. (2019). Automation and scale up of somatic embryogenesis for commercial plant production, with emphasis on conifers. *Frontiers in Plant Science*, 10, 109. https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00109

Entesari, M., Davoodi, D., Haghnazari A., Bagheri S., Majidi E. & Habashi, A. A. (2012). Effect of alternative bioreactor on propagation and microtuberization parameters of potato (*Solanum tuberosum* L.). *Journal of Crop Breeding*. 4(9), 53-67. (In Persian). https://dor.isc.ac/dor/20.1001.1.22286128.1391.4.9.5.2

Etienne, H. & Berthouly, M. (2002). Temporary immersion systems in plant micropropagation. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 69, 215-231. https://doi.org/10.1023/A:1015668610465

Felipe, A. J. (2009). 'Felinem','Garnem', and 'Monegro' almond× peach hybrid rootstocks. *HortScience*, 44(1), 196-197. https://doi.org/10.21273/HORTSCI.44.1.196

Ganji Moghadam, A., Bolandi, A. R. & Anahid, S. (2008). Invitro propagation of four selected dwarf genotypes of Mahlab. *Research and Construction Journal in Natural Resources*, 54, 61-79. (in Persian)

Geng, F., Moran, R., Day, M., Halteman, W., & Zhang, D. (2016). Increasing *in vitro* shoot elongation and proliferation of 'G. 30' and 'G. 41' apple by chilling explants and plant growth regulators. *HortScience*, 51(7), 899-904. https://doi.org/10.21273/HORTSCI.51.7.899

Gerdakaneh, M., Mozafari, A. A., Khalighi, A., & Sioseh-Mardah, A. (2009). The effects of carbohydrate source and concentration on somatic embryogenesis of strawberry (*Fragaria× ananassa* Duch.). *American-Eurasian Journal of Agricultural & Environmental Sciences*, 6(1), 76-80.

Huang, W. L., & Liu, L. F. (2002). Carbohydrate metabolism in rice during callus induction and shoot regeneration induced by osmotic stress. *Botanical Bulletin of Academia Sinica*, *43*: 107–113.

Ivanova, M., & Van Staden, J. (2009). Nitrogen source, concentration, and NH 4+: NO 3− ratio influence shoot regeneration and hyperhydricity in tissue cultured *Aloe polyphylla*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, *99*, 167-174. https://doi.org/10.1007/s11240-009-9589-8

Kane, M.E. (2005). Shoot culture procedures (p. 154–157). In: R. Trigiano & D. Gray (eds.). Plant development and biotechnology. CRC Press, Boca Raton, FL.

Kunakhonnuruk, B., Kongbangkerd, A., & Inthima, P. (2019). Improving large-scale biomass and plumbagin production of *Drosera communis* A. St.-Hil. by temporary immersion system. *Industrial Crops and Products*, 137, 197-202. https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2019.05.039.

Li, M., & Leung, D. W. (2000). Starch accumulation is associated with adventitious root formation in hypocotyl cuttings of *Pinus radiata*. *Journal of Plant Growth Regulation*, *19*(4), 423. https://doi.org/ 10.1007/s003440000020

Lichtenthaler, H. K., & Buschmann, C. (2001). Chlorophylls and carotenoids: Measurement and characterization by UV-VIS spectroscopy. *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*, 1(1), F4-3. https://doi.org/10.1002/0471142913.faf0403s01

Lotfi, M., Bayoudh, C., Werbrouck, S., & Mars, M. (2020). Effects of meta–topolin derivatives and temporary immersion on hyperhydricity and *in vitro* shoot proliferation in *Pyrus communis*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 143, 499-505. https://doi.org/10.1007/s11240-020-01935-x

Mahdavian, M. , Bouzari, N. & Abdollahi, H. (2010). Effects of culture media and growth regulators on proliferation and rooting of a vegetative Mahlab rootstock (SL-64). *Seed and Plant Journal*, 26(1), 15-26. (In Persian). https://doi.org/10.22092/spij.2017.110967

Matin, M. A., Brown, J. H., & Ferguson, H. (1989). Leaf water potential, relative water content, and diffusive resistance as screening techniques for drought resistance in barley. *Agronomy Journal*, 81(1), 100-105. https://doi.org/10.2134/agronj1989.00021962008100010018x

Mehrotra, S., Goel, M. K., Kukreja, A. K., & Mishra, B. N. (2007). Efficiency of liquid culture systems over conventional micropropagation: A progress towards commercialization. *African Journal of Biotechnology*, 6(13),1484-1492. https://doi.org/10.5897/AJB2007.000-2211

Posada-Pérez, L., Montesinos, Y. P., Guerra, D. G., Daniels, D., & Gómez-Kosky, R. (2017). Complete germination of papaya (*Carica papaya* L. cv. Maradol Roja) somatic embryos using temporary immersion system type RITA® and phloroglucinol in semi-solid culture medium. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 53, 505-513. https://doi.org/10.1007/s11627-017-9842-5

Pua, E. C., CHONG, C., & Rousselle, G. L. (1983). *In vitro* propagation of Ottawa 3 apple rootstock. *Canadian Journal of Plant Science*, 63(1), 183-188. https://doi.org/10.4141/cjps83-018

Ramage, C. M., & Williams, R. R. (2002). Mineral nutrition and plant morphogenesis. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 38, 116-124. https://doi.org/10.1079/IVP2001269

Ramírez-Mosqueda, M. A., Cruz-Cruz, C. A., Cano-Ricárdez, A., & Bello-Bello, J. J. (2019). Assessment of different temporary immersion systems in the micropropagation of anthurium (*Anthurium andreanum*). *3 Biotech*, *9*, 1-7. https://doi.org/10.1007/s13205-019-1833-2

Ramírez-Mosqueda, M. A., Iglesias-Andreu, L. G., Ramírez-Madero, G., & Hernández-Rincón, E. U. (2016). Micropropagation of *Stevia rebaudiana* Bert. in temporary immersion systems and evaluation of genetic fidelity. *South African Journal of Botany*, 106, 238-243. https://doi.org/10.1016/j.sajb.2016.07.015

Ramirez-Vallejo, P., & Kelly, J. D. (1998). Traits related to drought resistance in common bean. *Euphytica*, 99, 127-136. https://doi.org/10.1023/A:1018353200015

Rosales, C., Brenes, J., Salas, K., Arce-Solano, S., & Abdelnour-Esquivel, A. (2018). Micropropagation of *Stevia rebaudiana* in temporary immersion systems as an alternative horticultural production method. *Revista Chapingo. Serie Horticulturae*, *24*(1), 69-84. https://doi.org/10.5154/r.rchsh.2017.08.028

Ružić, D. V., & Vujović, T. I. (2008). The effects of cytokinin types and their concentration on *in vitro* multiplication of sweet cherry cv. Lapins (*Prunus avium* L.). *Horticultural Science*, *35*(1), 12-21. https://doi.org/ 10.17221/646-HORTSCI

Sairam, R. K. (1994). Effect of moisture-stress on physiological activities of two contrasting wheat genotypes. *Indian Journal of Experimental Biology*, *32*, 594-594.

Shokri, S., Babaei, A., Ahmadian, M., Arab, M. M., & Hessami, S. (2013). The effects of different concentrations of nano-silver on elimination of bacterial contaminations and phenolic exudation of rose (*Rosa hybrida* L.) *in vitro* culture. In *VIII International Symposium on In Vitro Culture and Horticultural Breeding 1083* (pp. 391-396). https://doi.org/ 10.17660/ActaHortic.2015.1083.49

Uma, S., Karthic, R., Kalpana, S., Backiyarani, S., & Saraswathi, M. S. (2021). A novel temporary immersion bioreactor system for large scale multiplication of banana (Rasthali AAB—Silk). *Scientific Reports*, 11(1), 20371. https://doi.org/10.1038/s41598-021-99923-4

Vanstraelen, M., & Benková, E. (2012). Hormonal interactions in the regulation of plant development. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 28, 463-487. https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-101011-155741

Yang, C. G., Gao, B., & Liu, J. R. (2012). Calcium ion and protocorm differentiation for Cymbidium hybrid *Cymbidium* Lucky Gloria× Cymbidium Lovely Moon 'Crescent'. *Applied Mechanics and Materials*, 195, 475-479. https://doi.org/10.4028/www.scientific.net/AMM.195-196.475

Yaseen, M., Ahmad, T., Abbasi, N. A., & Hafiz, I. A. (2009). Assessment of apple rootstocks M 9 and M 26 for *in vitro* rooting potential using different carbon sources. *Pakistan Journal of Botany*, 41(2), 769-81.

Ying-Ning, Z. O. U. (2010). Micropropagation of Chinese Plum *(Prunus salicina* Lindl.) using mature stem segments. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, *38*(3), 214-218. https://doi.org/10.15835/nbha3834614

Zapata, P. J., Serrano, M., Pretel, M. T., Amorós, A., & Botella, M. Á. (2004). Polyamines and ethylene changes during germination of different plant species under salinity. *Plant Science*, *167*(4), 781-788. https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2004.05.014

Zhang, B., Song, L., Bekele, L. D., Shi, J., Jia, Q., Zhang, B., ... & Chen, J. (2018). Optimizing factors affecting development and propagation of *Bletilla striata* in a temporary immersion bioreactor system. *Scientia Horticulturae*, *232*, 121-126. https://doi.org/10.1016/j.scienta.2018.01.007

Zhu, L. H., Li, X. Y., & Welander, M. (2005). Optimisation of growing conditions for the apple rootstock M26 grown in RITA containers using temporary immersion principle. In A. K. Hvoslef-Eide & W. Preil, (eds) *Liquid Culture Systems for in vitro Plant Propagation* (pp. 253-261). Springer, Dordrecht. https://doi.org/10.1007/1-4020-3200-5_17 *Liquid culture systems for in vitro plant propagation*,