Micropropation of GN15 rootstock (hybrid of almond and peach) in Temporary immersion bioreactor

ABSTRACT

The liquid medium offers a more consistent environment and eliminates the hassle of transferring explants during the subcultures, creating optimal conditions for plant micropropagation. To study the micropropagation of GN15 rootstock, in the first we analyzed the impact of various plant growth regulator combinations on node explant establishment in semi-solid MS culture. Then to compare the temporary immersion bioreactor and semi-solid culture conditions on propagation rate and plant health of GN15 rootstock, factors 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 were evaluated in three separate experiments. Rooting of microcuttings was assessed in both systems with MS medium containing 0.6 mg/l IBA. The successful establishment of explants was depended heavily on plant growth regulators, MS medium containg 0.5 mg/l BA was the best. The results of propagation under two different systems demonstrated that the temporary immersion system with 10-minute immersions every 6 hours, 0.5 mg/l BA, and 3% sucrose yielded optimal growth conditions for GN15 plantlets. However, the rooting and acclimatization tests revealed that the temporary immersion system was not suitable for rooting the GN15 rootstock under the given conditions.

Keywords: ***Humidity, Liquid medium, Temporary immersion, Ventilation, Vitrification.***

چکیده

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

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. به منظور بررسی ریزازدیادی پایه GN15، ابتدا اثر ترکیب محیط کشت‌های مختلف بر استقرار ریزنمونه گره در محیط کشت نیمه جامد MS مورد ارزیابی قرار گرفت. سپس به منظور 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 بطوری که محیط کشت MS حاوی ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BA بهترین بود. نتایج آزمایش‌های تکثیر نشان داد که بیوراکتور غوطه‌وری موقت شرایط بهتری را برای رشد و تکثیر گیاهچه‌های GN15 فراهم کرد. بهترین شرایط، دوره غوطه‌وری ۱۰ دقیقه در هر ۶ ساعت، محیط کشت حاوی ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BA و ۳ درصد ساکارز بود. همچنین بیوراکتور غوطه‌وری موقت ارزیابی شده در این تحقیق برای ریشه زایی این پایه مناسب نبود و تمام گیاهچه‌ها در این شرایط شیشه‌ای شدند و طی فرایند سازگاری از بین رفتند.

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

۱ مقدمه

روش‌های معمول ریزازدیادی شامل تکثیر شاخه‌ها در یک محیط کشت نیمه جامد است. در این سیستم‌ها عملکرد تکثیر از موفقیت نسبی برخوردار است و محققان به دنبال آن هستند تا زمان و هزینه‌های تکثیر گیاهان را به منظور تجاری سازی آنها کاهش دهند (Etienne &Berthouly, 2002). دستورالعمل تکثیر در شرایط درون شیشه‌ای بسیاری از گیاهان، درختان میوه و پایه‌های رویشی آنها توسعه یافته 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 مرتبط است. هیبرید هلو بادام GN15 با داشتن خصوصیاتی چون تحمل خاک‌های آهکی، متحمل به خشکی، شوری، کلروز و نماتد پایه مناسبی برای درختان هلو و بادام در کشور است (Felipe, 2009). شرکت‌های متعددی

در کشور این پایه را به روش کشت بافت تکثیر می‌کنند. لذا در این تحقیق به منظور کاهش هزینه‌های تولید این پایه تجاری، شرایط کشت درون شیشه‌ای آن در بیوراکتور غوطه‌وری موقت مورد ارزیابی و مقایسه‌ای با شرایط کشت بافت مرسوم آن صورت گرفت.

۲ پیشینهٔ پژوهش

محیط کشت مایع برای ریزازدیادی گیاهان، محیط ایده‌آلی است، زیرا سیستم‌های کشت مایع، محیط یکنواخت تری را برای رشد گیاهان فراهم می‌کنند و مواد غذایی بدون اینکه ظروف کشت عوض 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 (Etienne&Berthouly 2002; Adelberg, 2016; Egertsdotter *et al*., 2019).

از سیستم‌های غوطه‌وری موقت در ریزازدیادی و تکثیر شاخه، ریزغده و جنین زایی سوماتیکی استفاده شده است (Adelberg, 2016). زمان غوطه‌وری یکی از عوامل مهم در کارایی این نوع از سیستم‌ها است. عموماً غوطه‌وری موقت کیفیت مواد گیاهی تولیدی را بهبود می‌بخشد. بنابراین 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 (Etienne&Berthouly 2002; Mehrotra *et al*., 2007). زمان غوطه‌وری بسته به نوع واریته و فرایند ریزازدیادی متفاوت است. Lotfi *et al.* (2020) برای ریزازدیادی دو رقم گلابی از سیستم غوطه‌وری موقت تجاری SETIS™ با دوره غوطه‌وری یک دقیقه در هر هشت ساعت استفاده کردند. Ramírez-Mosqueda *et al.* (2019) به منظور کاهش هزینه‌های تولید و افزایش ضریب تکثیر گیاه آنتوریوم (*Anthurium andreanum*) در شرایط کشت بافت، اثر سه نوع سیستم غوطه‌وری موقت شامل TIB®، RITA® و بیوراکتور جذر و مدی با دوره غوطه‌وری یک دقیقه برای هر ۱۲ ساعت را مورد ارزیابی قرار دادند. آنها بیشترین گیاهچه تولید شده را در سیستم TIB® با ۵۰/۸۳ گیاهچه به ازای هر ریزنمونه بدست آوردند. Aka Kaçar *et al.* (2020) تکثیر گیاه *Myrtus communis* در شرایط غوطه‌وری موقت و سیستم کشت معمول (محیط کشت نیمه جامد) را مقایسه و گزارش کردند که شرایط غوطه‌وری موقت باعث رشد و تکثیر بهتر می‌شود، همچنین در این سیستم کشت هزینه‌های تولید، نیروی کار مورد نیاز و زمان لازم برای تکثیر کاهش می‌یابد.

یک پروتکل دو مرحله‌ای شامل کشت اولیه در محیط کشت نیمه جامد و تکثیر در سیستم غوطه‌وری موقت RITA® توسط Aguilar *et al.* (2019) برای تکثیر درخت *Tectona grandis* مورد استفاده قرار گرفت. در سیستم غوطه‌وری موقت آنها از دوره یک دقیقه غوطه‌وری در هر دو روز و محیط کشت MS حاوی ۰/۰۵ میلی‌گرم در لیتر BA استفاده کردند. دوره زمانی کوتاهتر یعنی یک دقیقه در هر روز و مقادیر بالاتر سیتوکینین باعث شیشه‌ای شدن گیاهچه‌های تکثیر شده شد. Benelli & Carlo (2018) مقایسه‌ای بین تکثیر درخت زیتون در روش معمول کشت بافت در محیط کشت نیمه جامد با سیستم غوطه‌وری موقت (Plantform™) در دوره غوطه‌وری ۸ دقیقه در هر ۱۶ ساعت انجام دادند. آنها گزارش کردند غوطه‌وری موقت شرایط بهتری را برای رشد فراهم کرد به طوری که در دوره ۲۸ روزه سرعت رشد نسبی گیاهچه‌ها نسبت به محیط کشت نیمه جامد ۱/۶ برابر بود. Uma *et al.* (2021) سیستم غوطه‌وری موقت را یک سیستم مقرون به صرفه تولید گیاهچه‌های موز معرفی کردند. آنها از یک سیستم غوطه‌وری موقت با حجم ظرف کشت ۲۵۰ میلی لیتری استفاده کردند و دوره غوطه‌وری ۲ دقیقه در هر ۶ ساعت برای تکثیر و ریشه زایی موز مناسب بود. آنها در این سیستم کشت بعد از ششمین واکشت ۱۴۹۶ عدد گیاه تولید کردند و گیاهان تولید شده از نظر وضعیت فیزیولوژیکی مناسب بودند. آنها ضریب تکثیر در سیستم غوطه‌وری موقت را ۲/۷ برابر بیشتر از سیستم های معمول کشت در محیط کشت نیمه جامد گزارش کردند.

برای بهینه کردن شرایط تکثیر گیاه *Bletilla striata* در وضعیت غوطه‌وری موقت Zhang *et al.* (2018) اثر دوره‌های تناوب غوطه‌وری، غلظت ساکارز و تعداد نمونه اولیه را بررسی کردند. آنها دوره غوطه‌وری سه دقیقه در هر دو ساعت را برای تولید پروتوکورم

ها و سه دقیقه در هر ۶ ساعت را برای نمو آنها توصیه کردند. همچنین آنها در بررسی اثر سطوح مختلف ساکارز (۲۰، ۳۰، ۴۰ و ۵۰ گرم در لیتر) گزارش کردند که افزایش ساکارز تا ۴۰ گرم در لیتر اثر قابل توجهی بر تولید پروتوکورم و نمو گیاهچه‌ها داشت. Rosales *et al.* (2018) برای کشت درون شیشه‌ای *Stevia rebaudiana* در مقیاس وسیع، سه نوع سیستم تعلیق موقت تجاری (RITA، BIT و SETIS) را مورد ارزیابی قرار دادند. آنها گزارش کردند که برای تکثیر این گیاه در سیستم غوطه‌وری موقت میزان ۳۰ گرم در لیتر ساکارز مناسب بود و با افزایش آن به ۴۰ گرم در لیتر تعداد گیاهچه تولیدی به شدت کاهش یافت. Abahmane *et al.* (2020) گزارش کرد تکثیر درخت نخل خرما (*Phoenix dactylifera* L.) در شرایط غوطه‌وری موقت 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. Ramírez-Mosqueda *et al.* (2016) برای تکثیر گیاه *Stevia rebaudiana* سطوح مختلف BA (صفر، ۱، ۲ و ۳ میلی‌گرم در لیتر) را در دو سیستم شامل محیط کشت نیمه جامد و سیستم غوطه‌وری موقت مورد بررسی قرار دادند. آنها گزارش کردند که در محیط کشت نیمه جامد بیشترین تعداد شاخه در سطوح ۱ و ۲ میلی‌گرم در لیتر BA بدست آمد و با افزایش سطح این تنظیم کننده رشد به ۳ میلی گرم در لیتر تعداد شاخه تولیدی کاهش یافت. این درحالی است که سیستم غوطه‌وری موقت تعداد شاخه بیشتری نسبت به محیط کشت نیمه جامد تولید کرد و بیشترین شاخه در محیط کشت حاوی ۱ میلی‌گرم در لیتر BA بدست آمد و با افزایش میزان این تنظیم کننده رشد تا ۳ میلی‌گرم در لیتر تعداد شاخه تولیدی بطور قابل توجهی کاهش یافت. باقری و همکاران (۱۳۹۲) از سیستم غوطه‌وری موقت برای تکثیر پایه هیبرید هلو- بادام (GF677) استفاده کردند. آنها دو نوع بیوراکتور تک پارچه و دو پارچه را در مقایسه با کشت معمول مورد ارزیابی قرار دادند و گزارش کردند که بیوراکتورها در مقایسه با محیط کشت نیمه جامد شرایط بهتری برای رشد و تکثیر گیاهان فراهم نمود.

لذا با توجه به مزایای ریزازدیادی گیاهان در سیستم های غوطه‌وری موقت، در این بررسی به منظور کاهش هزینه‌های تولید پایه رویشی تجاری GN15 به دلیل داشتن خصوصیاتی چون تحمل خاک‌های آهکی، متحمل 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 مقایسه‌ای با شرایط کشت بافت مرسوم آن انجام شد.

۳ روش‌شناسی پژوهش

به منظور ارزیابی تکثیر پایه GN15 در بیوراکتور غوطه‌وری موقت و محیط کشت نیمه جامد در فصل بهار سال ۱۴۰۱ شاخه‌های نورسته عاری از بیماری و در وضعیت رشد فعال به طول ۲۰ تا ۳۰ سانتی متر از پایه مادری پنج ساله واقع در پردیس دانشگاه فردوسی مشهد جداسازی و به آزمایشگاه کشت بافت گروه پژوهشی بیوتکنولوژی گیاهان باغبانی جهاددانشگاهی خراسان رضوی منتقل شد. برگ‌های شاخه‌ها حذف و ریزنمونه‌ها جهت ضدعفونی به مدت ۳۰ دقیقه زیر 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 ۳ مرتبه در مجموع به مدت ۱۵ دقیقه با آب مقطر استریل آبکشی شدند. ریزنمونه‌های حاوی گره به طول یک سانتی متر برش داده شد و در محیط کشت نیمه جامد MS حاوی ۱ میلی‌گرم در لیتر BA با عنوان محیط کشت A، محیط کشت MS حاوی ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BA با عنوان محیط کشت B و کشت 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 ۱ میلی‌گرم در لیتر BA به عنوان محیط کشت C، ۳ ٪ ساکارز، ۸ گرم در لیتر آگار و pH معادل ۵/۷ کشت شدند. پس از استقرار ریزنمونه‌ها از آنها به عنوان ریزنمونه اولیه برای تکثیر در شرایط بیوراکتور استفاده شد.

۳-۱ بهینه سازی شرایط تکثیر پایه GN15 در بیوراکتور غوطه‌وری موقت

به منظور ارزیابی عوامل مختلف بر سرعت رشد و تکثیر پایه GN15 در شرایط بیوراکتور غوطه‌وری موقت از سیستم طراحی و ساخته شده توسط آقای دکتر داریوش داودی و همکاران در پژوهشگاه بیوتکنولوژی کشاورزی ایران استفاده شد (انتصاری و همکاران،

۱۳۹۱). در سه آزمایش جداگانه، عوامل دوره تناوب غوطه‌وری، غلظت تنظیم کننده رشد محیط کشت و ساکارز در مرحله تکثیر مورد ارزیابی قرار گرفتند. برای انجام این آزمایش‌ها، در هر آزمایش ابتدا ریزنمونه‌های گره در محیط کشت نیمه جامد MS حاوی ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BA و ۳ درصد ساکارز کشت و بعد از فعال شدن جوانه‌ها، ریزنمونه‌ها به شرایط آزمایش‌های ذیل منتقل شدند.

در آزمایش اول شرایط غوطه‌وری موقت با اعمال ۳ دوره تناوب غوطه‌وری (دوره زمانی غوطه‌وری ۱۰ دقیقه در هر ۶، ۱۲ و ۲۴ ساعت) با استفاده از محیط کشت MS حاوی ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BA و ۳ درصد ساکارز در یک دوره زمانی ۵۰ روز مورد ارزیابی قرار گرفت. به منظور مقایسه عملکرد بیوراکتور غوطه‌وری موقت با روش معمول کشت، یک تیمار نیز همزمان در محیط کشت نیمه جامد (۸ گرم در لیتر) انجام شد. آزمایش به صورت طرح کاملا تصادفی با شش تکرار و چهار تیمار انجام شد که سه تیمار دوره‌های تناوب غوطه‌وری و یک تیمار هم محیط کشت نیمه جامد بود. در هر بیوراکتور غوطه‌وری موقت ۶ ریزنمونه (دو ریزنمونه در هر ظرف) قرار گرفت که به عنوان تکرار در نظر گرفته 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. در آزمایش دوم اثر غلظت‌های مختلف تنظیم کننده‌های رشد شامل صفر، ۰/۵ و ۱ میلی‌گرم در لیتر BA در 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. آزمایش به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملا تصادفی با دو فاکتور غلظت‌های مختلف BA و نوع کشت (بیوراکتور غوطه‌وری موقت و محیط کشت نیمه جامد) در شش تکرار انجام شد. تعداد ریزنمونه در هر ظرف بیوراکتور و محیط کشت نیمه جامد و تعداد تکرار آن مشابه آزمایش قبل است. در آزمایش سوم اثر سه غلظت ۳، ۴ و ۵ درصد ساکارز در بیوراکتور غوطه‌وری موقت با دوره غوطه‌وری ۱۰ دقیقه در هر ۲۴ ساعت و محیط کشت نیمه جامد در یک دوره ۵۰ روز 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) در شش تکرار انجام شد. تعداد ریزنمونه در هر ظرف بیوراکتور و محیط کشت نیمه جامد و تعداد تکرار آن مشابه آزمایش قبل است.

در همه آزمایش ها، 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 تک تک برگ ها از طریق آنالیز تصویر با استفاده از نرم افزار ImagJ، 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.

جهت ارزیابی خصوصیات فیزیولوژیکی از برگ‌های وسطی گیاهچه‌های تکثیر شده استفاده شد. به منظور اندازه گیری محتوای آب (WC) برگ و محتوای نسبی آب (RWC) برگ برای هر یک از تکرارهای تیمارهای آزمایش یک برگ جدا 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 به مدت ۲۴ ساعت اندازه گیری شد. محتوای آب برگ برحسب درصد به روش (FW-DW)/DW*100 (براساس روش Ramirez-Vallejo & Kelly, 1998) و محتوای نسبی آب برگ برحسب درصد به روش (FW-DW)/(TW-DW)*100 (براساس روش Matin *et al.*, 1989) محاسبه شد.

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 سانتی متر) در آب مقطر محاسبه شد. بدین نحو 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 و 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 آن اندازه گیری شد (C_2). شاخص پایداری غشا به روش $(1-C_1/C_2)*100$ (براساس روش Sairam, 1994) محاسبه شد.

برای اندازه‌گیری میزان کلروفیل (a و b) و کاروتنوئید برای هر یک از تکرارهای تیمارهای آزمایش ۲۰۰ میلی‌گرم برگ تازه از برگ‌های جوان کاملا توسعه یافته جدا و استخراج رنگدانه‌ها با استفاده از ۱۰ میلی‌لیتر متانول ۹۶ درصد براساس روش Lichtenthaler & Buschmann, 2001 انجام شد. میزان جذب در طول موج‌های ۴۷۰، ۶۵۳ و ۶۶۶ نانومتر با استفاده از اسپکتروفتومتر مدل (Bio Quest, CE 2502, UK) قرائت شدند. در نهایت بر اساس روابط CHL a = 15.65 A 666 – 7.34 A 653 میزان کلروفیل a، CHL b = 27.05 A 653 – 11.21 A 666 میزان کلروفیل b، C X+C = 1000A 470 – 2.860 CHLa –129.2 CHL b/245 میزان کاروتنوئید و CHL t = CHL a + CHL b + C X+C میزان کلروفیل کل محاسبه گردید. اندازه‌گیری مقدار قندهای محلول براساس روش Dubois *et al.*, 1956 انجام شد. بدین منظور وزن مشخصی از برگ تازه گیاه (با کمک پانچر با سطح مقطع دایره‌ای به قطر یک سانتی متر) در هاون چینی له شده و مقدار ۵ میلی‌لیتر اتانول ۹۵٪ به آن اضافه و سانتریفوژ گردید. قسمت بالایی محلول جدا و با ۵ میلی‌لیتر اتانول ۷۰٪ مجددا استخراج عصاره روی رسوبات باقیمانده ادامه یافت. 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 به مدت ۱۰ دقیقه در حمام آب جوش قرار داده شد و پس از خنک شدن نمونه‌ها، جذب آنها در طول موج ۶۲۵ نانومتر با دستگاه اسپکتروفتومتر قرائت و با مقایسه با منحنی استاندار، غلظت آن محاسبه شد.

۳–۲ ریشه زایی و سازگاری گیاهچه‌های تکثیر شده

به منظور ارزیابی ریشه‌زایی گیاهچه‌های تکثیر شده در شرایط کشت غوطه‌وری موقت و محیط کشت نیمه جامد، گیاهچه‌های تکثیر شده در هر دو شرایط به صورت تک بوته تقسیم شده و در شرایط قبل (بیوراکتور غوطه‌وری موقت و کشت نیمه جامد) به محیط کشت نصف غلظت نمک‌های MS حاوی ۰/۶ میلی‌گرم بر لیتر IBA و ۳ درصد ساکارز منتقل شدند. از چهار ظرف کشت بیوراکتور غوطه‌وری موقت هر کدام حاوی چهار ریزنمونه در هر ظرف کشت حاوی محیط کشت مایع با دوره زمانی غوطه‌وری ۱۰ دقیقه در هر ۲۴ ساعت استفاده گردید. در محیط کشت نیمه جامد نیز در هر ظرف کشت دو ریزنمونه قرار گرفت که ۸ ظرف مجزا به عنوان تکرار برای آن در نظر گرفته شد. ۵۰ روز پس از کشت نمونه‌ها در شرایط جدید خصوصیات ارتفاع گیاهچه، درصد ریشه‌زایی، تعداد ریشه تولیدی، طول ریشه تولیدی و تعداد گیاهچه تکثیر 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 و به منظور حفظ رطوبت در مراحل اولیه درب ظروف بسته شدند و با گذشت زمان هوادهی افزایش یافت. ظروف در اتاقک رشد در دمای ۲۲ تا ۲۴ درجه سانتی گراد در روز و ۱۸ درجه سانتی‌گراد 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 ریشه و طول ریشه در هر گیاهچه سازگار شده همانند قبل مورد ارزیابی قرار گرفت.

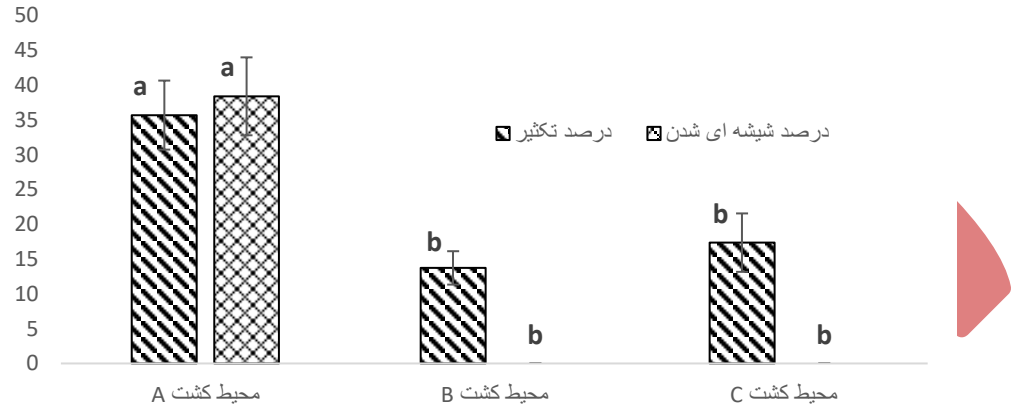
۳–۳ تجزیه و تحلیل آماری

آزمایش های تکثیر گیاهچه در قالب طرح کاملا تصادفی با ۵ تکرار و آزمایش ریشه زایی 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 ۵ درصد انجام و نمودارها نیز با استفاده از برنامه Excel رسم گردید.

۴ یافته‌های پژوهش

۴–۱ استقرار اولیه ریزنمونه در شرایط کشت بافت

نتایج تجزیه واریانس داده‌های آزمایش استقرار ریزنمونه کشت شده نشان داد که اختلاف معنی‌داری بین تیمارها از لحاظ درصد فعال شدن جوانه‌ها و همچنین شیشه‌ای شدن آنها وجود داشت. براساس داده‌های مقایسه میانگین بیشترین درصد فعال شدن جوانه‌ها و درصد شیشه‌ای شدن در محیط کشت A مشاهده شد. بین محیط کشت B و C از نظر درصد فعال شدن جوانه تفاوت معنی‌داری وجود نداشت و در این دو محیط کشت هیچ نمونه‌ای شیشه‌ای نشد (شکل ۴-۱).



شکل ٤-١. درصد تکثیر و شیشه‌ای شدن ریزنمونه‌های GN15 در محیط کشت‌های مختلف

۴-۲ 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 (MSI) و محتوای نسبی آب (RWC) برگ معنی‌دار و بر تعداد گیاهچه تکثیر شده، مقدار کاروتنوئید و محتوای آب (WC) برگ غیر معنی‌دار بود.

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 علی‌رغم رشد بهتر گیاهچه‌ها در دوره تناوب ۶ ساعت بیشترین درصد شیشه‌ای شدن نیز در این دوره تناوب مشاهده شد (جدول ۴-۱ و شکل ۴-۲). مطالعه خصوصیات فیزیولوژیکی نیز نشان داد که براساس نتایج مقایسه میانگین داده‌ها اختلاف معنی‌داری بین تیمارها در صفات RWC و MSI وجود داشت. بطوری که در تمام تیمارهای غوطه‌وری موقت این دو پارامتر بیشتر از شاهد بود و بین دوره‌های تناوب اختلاف معنی‌داری وجود نداشت. از نظر آب از دست رفته برگها نیز کمترین مقدار مربوط به تیمار شاهد بود (جدول ۴-۱). 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 کرفیل a و b اختلاف معنی‌داری بین تیمارها دیده می‌شود ولی روندها چندان منطقی نیستند (جدول ۴-۱).

جدول ٤-١. اثر دوره‌های تناوب غوطه‌وری بر برخی خصوصیات گیاهچه‌های تکثیر شده پایه GN15 در بیوراکتور غوطه‌وری موقت

تیمار	وزن تر (g)	وزن خشک (g)	طول ساقه (cm)	سطح برگ (cm^2)	کلروفیل a (mg/gfw)
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

تیمار	قندمحلول برگ (mg/gfw)	درصد شیشه‌ای شدن(٪)	MSI (%)	RWC (%)	کلروفیل b (mg/gfw)
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

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

شکل ٤-۲. 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

۴-۳ بهینه کردن شرایط تکثیر پایه GN15 در بیوراکتور غوطه‌وری موقت: اثر 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، MSI، RWC، محتوای کلروفیل a ، b و کاروتنوئید معنی‌دار و بر سایر خصوصیات غیر معنی‌دار بود. 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 غیر معنی‌دار بود. اثر متقابل نوع کشت و سطوح BA بر خصوصیات سطح برگ، کلروفیل a، b، کاروتنوئید و قند برگ معنی‌دار و سایر پارمترها غیر معنی‌دار بود.

از لحاظ خصوصیات فیزیولوژیکی، براساس نتایج مقایسه میانگین داده‌های نوع محیط کشت اختلاف معنی‌داری بین تیمارها مشاهده شد. بطوری که در اکثر تیمارها خصوصیات وزن تر و خشک اندام هوایی، وزن تر و خشک برگ، MSI و RWC بیوراکتور غوطه‌وری وضعیت بهتری نسبت به محیط کشت نیمه جامد داشتند (جدول ۴-۲). همچنین براساس نتایج مقایسه میانگین داده‌های غلظت تنظیم کننده رشد BA اختلاف معنی‌داری بین تیمارها مشاهده شد بطوری که در اکثر تیمارها خصوصیات وزن تر و خشک اندام هوایی، وزن تر و خشک برگ، ارتفاع و تعداد گیاهچه سطح یک میلی‌گرم در لیتر BA از همه بهتر بود (جدول ۴-۳). در بین خصوصیات بیوشیمیایی، محتوای کلروفیل a ، b و کاروتنوئید در محیط کشت نیمه جامد وضعیت بهتری نسبت به بیوراکتور غوطه‌وری داشت و محتوای قند برگ چندان تحت تاثیر تیمار قرار نگرفت (جدول ۴-۴). در مجموع گیاهچه‌های رشد یافته در بیوراکتور غوطه‌وری حاوی یک میلی‌گرم در لیتر BA از نظر رشدی وضعیت بهتری داشتند (شکل‌های ۴-۳؛ ۴-۴). اگرچه در نمونه‌هایی که رشد زیادی داشتند علائمی از شیشه‌ای شدن مشاهده شد.

جدول٤-٢. اثر نوع کشت بر برخی خصوصیات گیاهچه‌های تکثیر شده پایه GN15 در شرایط کشت بافت

نوع کشت	وزن تر اندام هوایی(g)	وزن خشک اندام هوایی(g)	وزن تر برگ(g)	وزن خشک برگ(g)	وزن تر ساقه(g)	وزن خشک ساقه(g)	MSI(%)	RWC(%)
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

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

جدول٤-٢. اثر سطوح BA بر برخی خصوصیات گیاهچه‌های تکثیر شده پایه GN15 در شرایط کشت بافت

BA (mg/l)	وزن تر اندام هوایی(g)	وزن خشک اندام هوایی(g)	وزن تر برگ (g)	وزن خشک برگ(g)	وزن تر ساقه(g)	وزن خشک ساقه(g)	ارتفاع (cm)	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

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

جدول٤-٤. اثر سطوح BA و نوع کشت بر برخی خصوصیات گیاهچه‌های تکثیر شده پایه GN15 در شرایط کشت بافت

نوع کشت	BA (mg/l)	کلروفیل a (mg/gfw)	کلروفیل b (mg/gfw)	کاروتنوئید (mg/gfw)	سطح برگ (cm^2)	قند محلول برگ (mg/gfw)
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

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

ویراستاری شده

شکل ٤-٣. گیاهچه‌های GN15 رشد یافته در تیمارهای مختلف آزمایش، از راست به چپ محیط کشت نیمه جامد حاوی صفر، ۰/۵ و ۱ میلی‌گرم در لیتر BA

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

۴-۴ بهینه کردن شرایط تکثیر پایه GN15 در بیوراکتورغوطه‌وری موقت: اثر میزان ساکارز محیط کشت

نتایج تجزیه واریانس داده‌های آزمایش نشان داد که اثر ساده ساکارز بر خصوصیات مورفولوژیکی مورد مطالعه موثر بود. بدین صورت که تعداد برگ، تعداد گیاهچه، ارتفاع و سطح برگ در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار شدند. همچنین اثر ساده نوع کشت (محیط کشت نیمه جامد و بیوراکتور غوطه‌وری موقت) بر خصوصیات مورفولوژیکی و فیزیولوژیکی مورد مطالعه موثر بودند. بدین صورت 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 MSI در سطح یک درصد و وزن تر ساقه، تعداد گیاهچه و سطح برگ در سطح پنج درصد معنی‌دار شدند. از لحاظ خصوصیات فیزیولوژیکی، براساس نتایج مقایسه میانگین داده‌های اثر نوع کشت، بیوراکتور غوطه‌وری موقت در بیشتر صفات مورد بررسی بجز میزان کلروفیل a، b و کاروتنوئید نسبت به محیط کشت نیمه جامد وضعیت بهتری داشت (جدول ۴-۵). در بررسی اثر نوع محیط کشت و میزان ساکارز مشخص شد که بیشترین تعداد برگ، تعداد گیاهچه، وزن تر ساقه و سطح برگ در گیاهچه های رشد یافته در بیوراکتور غوطه‌وری حاوی ۳ و ۴ درصد ساکارز مشاهده گردید (جدول ۴-۶).

جدول٤-٥. اثر نوع کشت بر برخی خصوصیات گیاهچه‌های تکثیر شده پایه GN15 در شرایط کشت بافت

نوع کشت	وزن تر اندام هوایی(g)	وزن خشک اندام هوایی(g)	وزن تر برگ(g)	وزن خشک برگ(g)	وزن خشک ساقه(g)
بیوراکتور غوطه‌وری	۱/۲۲ a	۰/۲۶ a	۰/۶۰ a	۰/۱۶ a	۰/۰۹۹ a
محیط کشت نیمه جامد	۰/۳۵ b	۰/۰۷ b	۰/۱۳ b	۰/۰۳۶ b	۰/۰۴۲ b

نوع کشت	ارتفاع (cm)	کلروفیل a (mg/gfw)	کلروفیل b (mg/gfw)	کاروتنوئید (mg/gfw)
بیوراکتور غوطه‌وری	۴/۱۳ a	۲/۱۸ b	۰/۹۱ b	۰/۵۴ b
محیط کشت نیمه جامد	۲/۵۳ b	۴/۲۶ a	۱/۶۹ a	۱/۰۶ a

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

جدول ٤-٦. اثر غلظت ساکارز و نوع کشت بر برخی خصوصیات گیاهچه‌های تکثیر شده پایه GN15 در شرایط کشت بافت

محیط کشت	تعداد برگ	تعداد گیاهچه	سطح برگ (cm^2)	وزن تر ساقه (g)	MSI (%)
نیمه جامد ۳٪	۱۲/۸۰ b	۲/۶۰ ab	۱۸/۷۱ b	۰/۳۱۸ b	۵۱/۶۶ bc
نیمه جامد ۴٪	۱۳/۴۰ b	۱/۸۰ bc	۱۲/۶۹ b	۰/۱۶۶ b	۴۵/۳۳ c

ویراستاری نشده

نیمه جامد ٪۵	۱۰/۶۰ b	۱/۸۰ bc	۹/۰۶ b	۰/۲۳۷ b	۷۰/۰۰ a
غوطه‌وری ٪۳	۲۲/۶۰a	۳/۸۰ a	۴۱/۸۳ a	۰/۷۰۶ a	۶۴/۲۸ ab
غوطه‌وری ٪۴	۲۸/۶۰ a	۳/۶۰ a	۵۰/۹۵ a	۰/۸۲۹ a	۷۱/۶۲ a
غوطه‌وری ٪۵	۷/۸۰ b	۱/۲۰ c	۱۵/۸۱ b	۰/۳۱۸ b	۶۰/۶۶ ab

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

۴-۵ ریشه‌زایی و سازگاری گیاهچه‌های تکثیر شده

نتایج تجزیه وایانس 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 گیاهچه‌های رشد یافته در محیط کشت نیمه جامد به میزان ۵۰ درصد ریشه دار شدند این درحالی است که در بیوراکتور غوطه‌وری موقت این میزان ۲۵ درصد بود. همچنین گیاهچه‌های ریشه دار شده در محیط کشت نیمه جامد موفق به تولید تعداد 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 به طور قابل توجهی در مقایسه با گیاهچه‌های رشد یافته در شرایط بیوراکتور غوطه‌وری موقت بیشتر بود (جدول ۴-۷ و شکل ۴-۵). قابل ذکر است که گیاهچه‌های رشد یافته در بیوراکتور غوطه‌وری حالت شیشه‌ای شدن نشان دادند، ترد و شکننده بودند و کالوسی شدند (شکل ۴-۵). نتایج این آزمایش نشان داد که بیوراکتور غوطه‌وری موقت برای ریشه زایی GN15 مناسب نیست و بهتر است 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 ریشه زایی گیاهچه‌ها در محیط کشت‌های نیمه جامد انجام شود.

جدول ٤-۷. اثر نوع کشت بر برخی خصوصیات ریشه زایی پایه GN15 در شرایط کشت بافت

تیمار	درصد ریشه‌زایی	تعداد ریشه	طول ریشه (Cm)
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 ٤-۵. وضعیت ریشه‌زایی در گیاهچه‌های GN15 رشد یافته در محیط‌کشت نیمه جامد (راست) و بیوراکتور غوطه‌وری موقت (چپ)، شاخص= یک سانتی متر

پنجاه روز پس از سازگاری گیاهچه‌ها در بستر ترکیبی کوکوپیت و پرلیت، رشد آنها مورد ارزیابی قرار گرفت. گیاهچه‌های حاصل از بیوراکتور غوطه‌وری موقت به علت اینکه ریشه‌های شکننده و کالوسی بودند همگی از بین رفتند همچنین گیاهچه‌های ریشه دار

شده در محیط کشت نیمه جامد با فراوانی ۸۲ درصد سازگار شدند. گیاهچه‌های سازگار شده دارای متوسط ارتفاعی برابر با ۲/۸ سانتی متر، 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.

۵ بحث

استقرار ریزنمونه‌ها در محیط کشت، به شدت تحت تاثیر انتخاب نوع محیط کشت پایه و تنظیم کننده‌های رشد، روش های آلودگی زدایی و عوامل محیطی شرایط کشت بافت قرار می‌گیرد و تمام این عوامل به شدت تحت تاثیر ژنوتیپ است (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 گرفتند. 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). درصد استقرار در دو محیط کشت دیگر پایین بود و در عین حال شیشه‌ای شدن در ریزنمونه‌ها نیز مشاهده نشد. سایتوکینین ها نقش مهی در تنظیم تقسیم سلولی و اندام‌زایی در مریستم نوک شاخه دارند (Bartrina *et al.*, 2011; Vanstraelen & Benková, 2012). این درحالی است که 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 می‌گیرد (Pua *et al.*, 1983). Geng *et al.* (2016) گزارش کردند که GA_3 تنها در سطح بهینه سایتوکینین باعث رشد شاخه در ریزقلمه‌های سیب می‌شود. گنجی مقدم و همکاران (۱۳۸۷) بشترین شاخه‌زایی *Prunus mahaleb* L. را در محیط کشت MS حاوی یک میلی‌گرم در لیتر GA_3 و یک میلی‌گرم در لیتر BA گزارش کردند. باقری و همکاران (۱۳۹۲) نیز از محیط کشت MS حاوی یک میلی‌گرم در لیتر BA و ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر GA_3 استفاده کردند.

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 کرد. همانند اثرات مثبت غوطه‌وری موقت بر رشد و شاخه‌زایی گیاهچه‌های GN15 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)، 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 می‌شوند. Lotfi *et al.* (2020) در خصوص ریزازدیادی دو رقم گلابی در بیوراکتور غوطه‌وری موقت SETIS گزارش کردند که با کاهش فاصله‌زمانی غوطه‌وری درصد شیشه‌ای شدن گیاهچه‌های تکثیری به شدت افزایش یافت و استفاده از meta–Topolin riboside یا meta–Methoxy topolin riboside به جای BA شیشه‌ای شدن گیاهچه‌ها را به شدت کاهش داد. آنها بیشترین تعداد شاخه را در دوره غوطه‌وری ۸ ساعت بدست آوردند و با افزایش فاصله زمانی غوطه‌وری تعداد گیاهچه تکثیری کاهش یافت. Zhu *et al.* (2005) شاخه‌زایی سیب را در دو نوع بیوراکتور غوطه‌وری موقت و پیوسته مقایسه کردند نتایج آنها نشان داد که بیوراکتور غوطه‌وری موقت شیشه‌ای شدن را کاهش می‌دهد و شاخه‌های بیشتر و با کیفیت بهتری نسبت به سیستم پیوسته تولید می‌کند.

تکثیر شاخه تحت تاثیر عوامل مختلفی چون ژنوتیپ، ترکیب محیط کشت (Ružić & Vujović, 2008; Ivanova & Staden, 2009; Yang *et al*., 2012)، عوامل محیطی شرایط کشت بافت و غیره قرار می‌گیرد. گونه‌های مختلف نیاز تغذیه‌ای متفاوتی برای رشد بهینه دارند، هر گونه کمبود یا بیش بود مواد غذایی خاص می‌تواند باعث بروز اثرات منفی و مشکلات فیزیولوژیکی مانند شیشه ای شدن شود (Ramage & Williams, 2002; Ivanova & Staden, 2009; Yang *et al*., 2012). ترکیب تنظیم کننده‌های رشد محیط کشت بویژه نوع و غلظت سایتوکینین‌ها نقش مهمی در رشد و نمو بافت‌های کشت شده دارد (Ružić & Vujović, 2008). همانند نتایج این آزمایش که استفاده از ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BA باعث تحریک شاخه‌زایی در نمونه‌های کشت شده شد. باقری و همکاران (۱۳۹۵) برای ریزازدیادی پایه GF677 در بیوراکتور غوطه‌وری موقت از محیط کشت حاوی یک میلی‌گرم در لیتر BA و ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر NAA استفاده کردند.

در بیشتر کشت‌های درختان چوبی از جوانه‌های ریزنمونه گره به عنوان مواد اولیه گیاهی استفاده می‌شود. در این شرایط جوانه فعال شده اوتوتروف 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 بطوری‌که 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 ما 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 نیست و تمام گیاهچه‌ها در این شرایط شیشه‌ای شدند و طی فرایند سازگاری از بین رفتند. این درحالی است که محیط کشت نیمه جامد شرایط بهتری را برای ریشه‌زایی فراهم کرد بطوری که ۵۰ درصد گیاهچه‌ها ریشه دار شده و ریشه‌های طبیعی داشتند. گنجی مقدم و همکاران (۱۳۸۷) نیز بیشترین ریشه‌زایی ۴۳/۲ درصد را در گیاهچه‌های *P.mahaleb* L. در محیط کشت MS حاوی ۰/۸ میلی‌گرم در لیتر IBA گزارش کردند. مهدویان و همکاران (۱۳۸۹) ریشه‌زایی ۱۰۰ درصدی *P. mahaleb* را در محیط کشت بدون هورمون گزارش کردند. همچنین Ying-Ning (2010) بیشترین میزان ریشه‌زایی ۷۹/۷ درصد را در محیط کشت نصف غلظت MS با ۰/۲ تا ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر IBA و ۲۰ تا ۴۰ میلی‌گرم در لیتر فلوروگلوسینول بدست آوردند.

۶ 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 می‌گیرد و تمام این عوامل به شدت تحت تاثیر ژنوتیپ است. 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 میلی گرم در لیتر GA_3 و سپس انتقال به محیط کشت حاوی یک میلی‌گرم در لیتر BA مورد بررسی قرار گرفتند. بهترین محیط کشت در این آزمایش به لحاظ درصد استقرار و کمترین گیاهچه شیشه‌ای شده، محیط کشت حاوی ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BA بود. در ادامه به منظور بهینه سازی شرایط تکثیر GN15 در شرایط درون شیشه‌ای، دو سیستم کشت شامل محیط کشت نیمه جامد و بیوراکتور غوطه‌وری موقت مورد ارزیابی قرار گرفت. لذا اثر دوره تناوب غوطه‌وری (۱۰ دقیقه غوطه‌وری در دوره‌های زمانی ۶، ۱۲ و ۲۴ ساعت)، غلظت تنظیم کننده رشد (۰، ۰/۵ و ۱ میلی‌گرم در لیتر BA) و میزان ساکارز محیط کشت (۳، ۴ و ۵ درصد) در قالب آزمایش های مجزا در دو سیستم کشت مورد ارزیابی قرار گرفتند. در تمام آزمایش‌های انجام شده بیوراکتور غوطه‌وری موقت شرایط بهتری برای

رشد و تکثیر گیاهچه‌های GN15 فراهم کرد. در بررسی اثر دوره تناوب غوطه‌وری ۶ ساعت بیشترین گیاهچه را تکثیر نمود اما گیاهچه های تکثیر شده علائم شیشه‌ای شدن را نشان دادند. لازم به ذکر است با افزایش دوره تناوب غوطه‌وری تعداد گیاهچه تکثیر شده نیز کاهش یافت. در آزمایش بررسی غلظت تنظیم کننده رشد مشخص شد با افزایش میزان BA در هر دو سیستم کشت میزان شاخه‌زایی و رشد گیاهچه‌ها افزایش یافت و این مقدار در بیوراکتور غوطه‌وری موقت بیشتر بود بطوری که در سطح یک میلی‌گرم در لیتر BA تعداد ۴ عدد گیاهچه در هر ریزنمونه تولید شد. با این حال در این سطح از تنظیم کننده رشد BA علائم شیشه‌ای شدن در نمونه‌های تکثیری مشاهده شد. در خصوص میزان ساکارز، در محیط کشت نیمه جامد سطح ۳ درصد ساکارز بیشترین تعداد گیاهچه را تولید نمود و با افزایش مقدار ساکارز میزان شاخه‌زایی کاهش یافت. در خصوص بیوراکتور غوطه‌وری موقت مقادیر ۳ و ۴ درصد ساکارز برای رشد و تکثیر گیاهچه‌ها مناسب بودند اما با افزایش میزان ساکارز به پنج درصد تعداد گیاهچه تکثیری و کیفیت آن به شدت کاهش یافت. 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 نیست و تمام گیاهچه‌ها در این شرایط شیشه‌ای شدند و طی فرایند سازگاری از بین رفتند. این درحالی است که محیط کشت نیمه جامد شرایط بهتری را برای ریشه‌زایی فراهم کرد بطوری که ۵۰ درصد گیاهچه‌ها ریشه دار شدند و ریشه‌های طبیعی داشتند. در مجموع جهت استفاده از مزایای بیوراکتور غوطه‌وری موقت در تکثیر GN15 به روش درون شیشه‌ای توصیه می‌شود از روش دو مرحله‌ای استفاده شود بدین نحو که مرحله تکثیر در بیوراکتور غوطه‌وری موقت و مرحله ریشه زایی گیاهچه‌ها در محیط کشت نیمه جامد انجام شود.

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

۷ تقدیر و تشکر

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

۸ منابع

انتصاری م.، داودی د.، حق نظری ع.، باقری س.، مجیدی ا. و حبشی ع.ا. (۱۳۹۱). اثر بیوراکتور تناوبی بر شاخص های ریزازدیادی و ریزغده‌زایی سیب زمینی (*Solanum tuberosum* L.). *پژوهشنامه اصلاح گیاهان زراعی*،۴ (۹)، ۵۴-۶۷.

باقری، س. امیری، م.ا. داودی، د. و انتصاری، م. (۱۳۹۲). بررسی و مقایسه ظروف کشت رایج و بیوراکتورتناوبی جهت تکثیر انبوه پایه GF677 (هیبرید هلو× بادام). *نشریه علوم باغبانی* ۲۷ (۱)، ۳۶-۴۳.

باقری، س. امیری، م.ا. داودی، د. و انتصاری، م. ۱۳۹۵ . تاثیر محیط کشت‌های مختلف در ریزازدیادی پایه GF677 (هیبرید هلو – بادام). *نشریه علوم باغبانی* ۳۰ (۴)، ۶۱۶-۶۲۳.

گنجی مقدم، ا. بلندی، ا.ر. و آناهید، ص. (۱۳۸۷). تکثیر درون شیشه‌ای چهار ژنوتیپ پاکوتاه گزینش شده محلب. *مجله پژوهش و سازندگی در منابع طبیعی*. ۷۹،۵۴-۶۱.

مهدویان، م. بوذری،ن. و عبدالهی، ح. (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.

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.

Adelberg, J. (2016). Bioreactors and "smart vessels" for large-scale propagation. In *IX International Symposium on In Vitro Culture and Horticultural Breeding 1187* (pp. 123-138).

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.
Aitken-Christie, J., & Jones, C. (1987). Towards automation: Radiata pine shoot hedges *in vitro*. *Plant cell, tissue and organ culture*, *8*, 185-196.
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).
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.
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.
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.
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.
Berthouly, M., Dufour, M., Alvard, D., Carasco, C., Alemanno, L., & Teisson, C. (1995). Coffee micropropagation in a liquid medium using the temporary immersion technique. ASIC.
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.
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.
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.
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.
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.
Etienne, H., & Berthouly, M. (2002). Temporary immersion systems in plant micropropagation. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, *69*, 215-231.
Felipe, A. J. (2009). 'Felinem','Garnem', and 'Monegro'almond× peach hybrid rootstocks. *HortScience*, *44*(1), 196-197.
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.
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.). *Am-Eurasian J Agric Environ Sci*, *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*.
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.

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.
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).
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.
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.
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.
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).
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.
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.
Ramage, C. M., & Williams, R. R. (2002). Mineral nutrition and plant morphogenesis. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, *38*, 116-124.
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.
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.
Ramirez-Vallejo, P., & Kelly, J. D. (1998). Traits related to drought resistance in common bean. *Euphytica*, *99*, 127-136.
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 horticultura*, *24*(1), 69-84.
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.
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).
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.
Vanstraelen, M., & Benková, E. (2012). Hormonal interactions in the regulation of plant development. *Annual review of cell and developmental biology*, *28*, 463-487.

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.
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. *Pak J Bot*, *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.
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.
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.
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. *Liquid culture systems for in vitro plant propagation*, 253-261.

EXTENDED ABSTRACT

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.

To study the micropropagation of GN15 rootstock, in the first we examined the impact of various plant growth regulator combinations in the semi-solid MS culture, 0.5 and 1 mg/l BA as well as culturing explants in 1 mg/l GA for three weeks and subculturing in 1 mg/l BA, on node explant establishment. Then to compare the temporary immersion bioreactor and semi-solid culture conditions on propagation rate and plant health of GN15 rootstock, factors of immersion times (10 minutes every 6, 12, and 24 hours), plant growth regulator concentrations (0, 0.5, and 1 mg/l BA) and sucrose concentrations (3, 4, and 5 %) in MS medium were evaluated in three separate experiments.The rooting of plantlets was assessed in temporary immersion bioreactor and semi-solid culture setups using MS medium containing 0.6 mg/l IBA. Following this, the rooted plantlets from the two different systems were acclimatized in a mixture of cocopeat and vermiculite in a 1:1 ratio.

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. Similarly, this medium also exhibited a high vitrification percentage, while the other media showed lower establishment percentages with no vitrification 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 plantlets, although they showed signs 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.

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.

Keywords: ***Humidity, Liquid medium, Temporary immersion, Ventilation, Vitrification.***