



<https://ijpb.ui.ac.ir/?lang=en>

Journal of Plant Biological Sciences

E-ISSN: 3041-9603

Vol. 18, Issue 2, No. 68, 2026, pp. 43- 62

Received: 22/02/2026 Accepted: 28/09/2026

(Research Paper)

Effects of culture medium, iron source (Fe-EDDHA), and bioreactor culture system on the micropropagation of the CAB 11E rootstock

Soheil Benabbas¹, Parissa Jonoubi¹, Zohreh Shirkhani ^{*1}

¹ Department of Plant Sciences, Faculty of Biological Sciences, Kharazmi University, Tehran, Iran

Abstract

CAB 11E is a rootstock for cherry and sour cherry that has recently been introduced into the country. This study aimed to optimize its micropropagation. During shoot multiplication, virus-free CAB 11E plantlets were grown in a factorial experiment arranged in a completely randomized design. The treatments comprised three basal media (MS, WPM, and DKW) and four plant growth regulator treatments: 0.5, 1, or 2 mg L⁻¹ BA, or 1 mg L⁻¹ BA combined with 0.1 mg L⁻¹ IBA. MS medium supplemented with 1 mg L⁻¹ BA and 0.1 mg L⁻¹ IBA produced the highest multiplication rate (4.4 shoots per explant) and a mean shoot length of 3.5 cm. To assess the effect of the culture system, plantlets were grown in a temporary immersion bioreactor using the optimal multiplication medium. The multiplication rate increased to 14.5 shoots per explant. For rooting, plantlets were grown on media differing in iron source, macronutrient strength, and IBA concentration. The optimal treatment, containing Fe-EDDHA, half-strength macronutrients, and 0.1 mg L⁻¹ IBA, resulted in 97% rooting. These findings indicate that optimizing medium composition and using a temporary immersion bioreactor can improve the micropropagation of CAB 11E rootstock.

Keywords: Cherry, FeEDDHA, Rootstock, Sour cherry

*Corresponding Author: z.shirkhani@khu.ac.ir



Introduction

Various species of the genus *Prunus* are among the most important fruit-bearing plants worldwide. In modern horticulture, cherry and sour cherry cultivars are typically grafted onto rootstocks. A key challenge in cherry orchards is excessive vegetative growth on commonly used seedling rootstocks, mainly derived from *Prunus avium*. To produce compact, uniform, and high-yielding trees, the use of dwarf or semi-dwarf rootstocks is necessary. One newly introduced rootstock, CAB 11E, is semi-dwarf, tolerant to heavy soils, and resistant to *Phytophthora*, although it is sensitive to drought.

Conventional propagation methods, including cuttings and seed culture, are time-consuming, labor-intensive, and may result in genetic variability. Micropropagation, based on plant tissue culture, offers an efficient alternative, providing uniform, virus-free plants and large-scale production from limited mother plants. Traditional in vitro culture, while effective, remains costly and labor-intensive, leading to the adoption of bioreactor systems for mechanized, high-efficiency propagation.

Considering the increasing demand for virus-free rootstocks and the limited availability of suitable materials, the introduction and propagation of CAB 11E is essential. Since this rootstock is recently developed, data on its micropropagation are limited, highlighting the need to investigate optimal culture conditions and the efficiency of bioreactor versus conventional in vitro systems.

Materials and Methods

Sterilized explants were transferred to the establishment medium, MS supplemented with 1 mg L⁻¹ BA. For shoot multiplication, regenerated explants were cultured on three basal media (MS, DKW, and WPM) with four hormonal treatments: BA at 0.5, 1, and 2 mg L⁻¹, and a combination of 1 mg L⁻¹ BA with 0.1 mg L⁻¹ IBA. Cultures were maintained for 20 days at 22 ± 2°C under a 16-hour photoperiod. Shoot length and the number of shoots were recorded at the end of this stage.

In the bioreactor experiment, 30 plantlets were cultured in PLANTFORM temporary immersion bioreactors using the optimal MS medium from the previous stage, without agar. After 20 days, shoot growth parameters were evaluated.

For rooting, elongated shoots were cultured on MS and VS (Van der Salm) media, with full or half-strength macronutrients and IBA at 0.5, 1, or 1.5 mg L⁻¹. In the VS medium, FeSO₄ was replaced with the stronger Fe-EDDHA chelate. After 20 days, root lengths reached 5–10 mm, and plantlets were transferred to a substrate containing 35% peat moss, 35% perlite, and 30% cocopeat, with pH 5.5, good drainage, and low electrical conductivity.

Results and Discussion

The highest proliferation (4.4 shoots per explant) and shoot elongation (3.57 cm) were observed in MS medium supplemented with 1 mg L⁻¹ BA and 0.1 mg L⁻¹ IBA. Among basal media, MS outperformed DKW and WPM in promoting shoot multiplication.

Comparing culture systems, bioreactor cultivation significantly increased shoot proliferation, 3.55 times higher than conventional glass culture, although shoot length remained similar. Temporary immersion in

PLANTFORM bioreactors likely enhanced lateral shoot growth through improved aeration and periodic nutrient exposure, consistent with previous reports on other woody plants. Plantlets from bioreactors also acclimatized faster (15 days) compared to conventional cultures (20 days), with 100% survival in both systems.

Rooting percentage was significantly influenced by culture medium and iron source rather than minor changes in IBA concentration. VS medium, in which FeSO_4 was replaced by the more stable Fe-EDDHA chelate, combined with half-strength macronutrients and 1 mg L^{-1} IBA, resulted in the highest rooting rate (97%). The superior rooting in VS is attributed to better iron availability and reduced osmotic stress, emphasizing the importance of mineral nutrition over small hormonal variations.

Overall, the study demonstrates that MS medium with optimized BA and IBA promotes efficient shoot proliferation, temporary immersion bioreactors significantly enhance multiplication rates, and VS medium with Fe-EDDHA ensures high rooting success. These findings provide a practical framework for large-scale clonal propagation of the newly introduced CAB 11E cherry rootstock, ensuring uniform, healthy, and virus-free plantlets.

Conclusion

Overall, this study demonstrates that successful micropropagation of the CAB 11E rootstock depends on the simultaneous optimization of culture medium composition and growth regulator balance. The results highlight the crucial role of selecting an appropriate basal medium and iron source, combined with an efficient propagation system, in achieving high multiplication rates and uniform, high-quality plantlets. Notably, using a bioreactor enhances proliferation efficiency and shortens acclimatization time. The optimized protocol provides a reliable and scalable approach for commercial micropropagation of CAB 11E, enabling rapid production of virus-free, high-quality planting material for cherry and sour cherry orchards.

بررسی تأثیر محیط کشت، منبع آهن (Fe-EDHHA) و کاربرد سامانه کشت

بیوراکتوری در ریزازدیادی پایه رویشی CAB 11E

سهیل بن عباس^۱، پریسا جنوبی^۱، زهره شیرخانی^{۱*}

^۱ گروه علوم گیاهی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه خوارزمی، تهران، ایران

چکیده

پایه رویشی CAB 11E یکی از پایه‌های گیلان و آلبالو است که به تازگی وارد کشور شده است. هدف این پژوهش بهینه‌سازی مراحل ریزازدیادی این پایه بود. در مرحله شاخه‌زایی، گیاهچه‌های عاری از ویروس CAB 11E در قالب آزمایش فاکتوریل بر پایه طرح کامل تصادفی با سه محیط کشت پایه MS، WPM و DKW و نیز چهار ترکیب هورمونی شامل ۰/۵، ۱ و ۲ میلی گرم بر لیتر BA و ترکیب ۱ میلی گرم بر لیتر IBA و ۰/۱ میلی گرم بر لیتر IBA کشت داده شدند. نتایج نشان دادند محیط کشت MS حاوی ۱ میلی گرم بر لیتر BA و ۰/۱ میلی گرم بر لیتر IBA با ضریب شاخه‌زایی ۴/۴ و میانگین رشد طولی ۳/۵۷ سانتی متر، بهترین تیمار این مرحله بود. در مرحله بعد، به منظور بررسی اثر بیوراکتور بر شاخه‌زایی، گیاهچه‌ها در بهترین محیط کشت مرحله قبل، به صورت کشت مایع در بیوراکتور پرورش داده شدند. نتایج این مرحله نشان داد که میانگین ضریب شاخه‌زایی در سیستم بیوراکتور به ۱۴/۵ افزایش یافت. برای ریشه‌زایی، گیاهچه‌ها در محیط کشت پایه MS با منابع مختلف آهن، غلظت کامل و نصف عناصر درشت مغذی و غلظت‌های متفاوت IBA کشت شدند. استفاده از محیط کشت MS حاوی کلات آهن (III) تیلن دی آمین-N,N'-بیس(۲-هیدروکسی فنیل استیک اسید) (Fe-EDDHA)، نصف غلظت عناصر درشت مغذی و ۰/۱ میلی گرم بر لیتر IBA منجر به ریشه‌زایی ۹۷ درصدی گیاهچه‌ها شد. این نتایج نشان می‌دهد که استفاده از سیستم بیوراکتور در کنار بهینه‌سازی ترکیب محیط کشت و منبع آهن، می‌تواند روشی کارآمد برای ریزازدیادی پایه CAB 11E باشد.

واژه‌های کلیدی: آلبالو، پایه رویشی، گیلان، Fe-EDDHA

مقدمه

گونه‌های مختلف جنس *Prunus* از مهم‌ترین گیاهان مثمر در سراسر جهان به‌شمار می‌آیند (Druart, 2013). در باغبانی نوین، ارقام مختلف گیلاس، آلبالو و آلو معمولاً بر روی پایه‌های رویشی پیوند می‌خورند (Hartmann et al., 2017). به عبارت دیگر، استفاده از پایه‌های رویشی از دو جنبه حائز اهمیت است؛ نخست آن‌که ارقام با رشد رویشی زیاد را می‌توان بر پایه‌های کوتاه‌تر پیوند زد و از این طریق، عملیات داشت، برداشت و مدیریت باغ را تسهیل کرد (Bolandi et al., 2016; De Salvador et al., 2001). دوم آن‌که این پایه‌ها، متناسب با هدف تولیدکننده، قابلیت سازگاری با شرایط اقلیمی و خاکی مختلف را داشته و می‌توانند مقاومت مناسبی در برابر آفات و بیماری‌ها از خود نشان دهند؛ از این رو، ارقام تجاری متناسب با شرایط هر منطقه بر روی آن‌ها پیوند زده می‌شوند (Sotirov & Dimitrova, 2022).

یکی از چالش‌های اصلی باغ‌های گیلاس در کشور، رشد رویشی بیش از حد درختان بر روی پایه‌های رایج است که عمدتاً از پایه‌های بذری آلبالوی تلخ تشکیل شده‌اند (Ganji, 2008). به‌منظور دستیابی به درختانی کوتاه‌قد، یکنواخت و با عملکرد بالا، استفاده از پایه‌های رویشی پاکوتاه و نیمه‌پاکوتاه امری ضروری به‌شمار می‌آید (Gyeviki, 2005).

پایه‌های رویشی گیلاس و آلبالو معمولاً از گونه‌های *Prunus avium*، *P. cerasus* و *P. mahaleb* یا از دورگه‌هایی میان این گونه‌ها و گونه‌های *P. fruticosa*، *P. pseudocerasus*، *P. incisa*، *P. canescens* و *P. serrulata* و *dawnyckensis* اصلاح و انتخاب می‌شوند (De Salvador et al., 2001). یکی از پایه‌های جدید

معرفی شده، رقم CAB 11E است که در دانشگاه بولونیا (ایتالیا) اصلاح شده است. این پایه نیمه‌پاکوتاه بوده و از ویژگی‌هایی نظیر توانایی رشد در خاک‌های سنگین و مقاومت به بیماری فیتوفتورا برخوردار است. با این وجود، این پایه نسبت به خشکی حساس بوده و از گرده‌افشانی مطلوبی برخوردار است. از مهم‌ترین مزایای پایه‌های گروه CAB، سازگاری بالای آن‌ها با ارقام تجاری مختلف گیلاس و آلبالو گزارش شده است (Sansavini & Lugli, 2009). روش‌های متداول تکثیر پایه‌های گیلاس شامل قلمه‌گیری و کشت بذری است. از سوی دیگر، این روش‌ها با محدودیت‌هایی از جمله ظرفیت محدود تکثیر، وابستگی به شرایط محیطی و دشواری دستیابی به تعداد زیاد گیاهچه‌های یکنواخت همراه هستند. افزون بر این، تکثیر توسط بذر منجر به بروز تنوع ژنتیکی در نسل جدید می‌شود که برای تولید پایه‌های یکنواخت مطلوب نیست. در مقابل، ریزازدیادی به‌عنوان روشی کارآمد و پیشرفته برای تکثیر پایه‌های رویشی مطرح است. این روش که مبتنی بر کشت بافت گیاهی است، مزایای متعددی از جمله تولید گیاهچه‌های همسان با گیاه مادری، تضمین سلامت و اصالت نهال‌ها، امکان تولید گیاهان عاری از ویروس (در صورت سلامت گیاه مادری)، کیفیت بالای گیاهچه‌ها و تولید انبوه از تعداد محدودی گیاه مادری را فراهم می‌آورد. از این رو، ریزازدیادی به یکی از روش‌های رایج در تکثیر پایه‌های رویشی در سطح جهان تبدیل شده است (Clapa et al., 2013; Druart, 2013; Sarropoulou et al., 2013; Mahdavian et al., 2011). گزارش کردند که محیط کشت DKW حاوی ۰/۵ میلی گرم در لیتر BA بهترین محیط برای پرآوری پایه‌ی SL-64 (*Prunus mahaleb* L.) است. همچنین، نتایج آن‌ها نشان داد که مناسب‌ترین محیط برای

پرآوری و ریشه‌زایی پایه‌ی PHL-A به‌ترتیب محیط MS حاوی ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BA و محیط DKW بدون تنظیم‌کننده‌های رشد می‌باشد (Mahdavian et al., 2011). در پژوهش دیگر، جهت بررسی اثر پلی‌آمین‌ها بر ریزازدیادی پایه‌ی CAB-6P مشخص شد که بیشترین تعداد و درصد پرآوری شاخه در غلظت ۱ میلی‌گرم در لیتر اسپرمیدین و بیشترین تعداد و درصد ریشه‌زایی به‌ترتیب در غلظت‌های ۱ و ۲ میلی‌گرم در لیتر پوترسین حاصل شد (Sarropoulou et al., 2013). در بسیاری از گیاهان زراعی نشان داده شده است که جایگزینی منبع متداول آهن شامل $FeSO_4$ به همراه نمک دی‌سدیم اسید اتیلن‌دی‌آمین‌تترااستیک (Na_2EDTA) به‌طور مستقیم با کمپلکس Fe-EDDHA، موجب بهبود تغذیه آهن در گیاه می‌شود (Molassiotis et al., 2003; Trejgell et al., 1994; Van der Salm et al., 2012). در میان پژوهش‌های منتشرشده، گزارش‌های متعددی درباره تأثیر جایگزینی ترکیبات آهن با کمپلکس Fe-EDDHA بر رشد و نمو درون‌شیشه‌ای (in vitro) گیاهان مختلف از جمله پاپایا، بلوبری، تمشک، فندق، زیتون، باپتیزیا و هلو وجود دارد (Hunková et al., 2018; Nikulina et al., 2020; Nikulina et al., 2021; Isachkin, 2020). به‌طور کلی، از نظر نوع تغذیه و محل قرارگیری گیاهچه‌ها، کشت بافت به دو روش سنتی و بیوراکتوری انجام می‌شود. در روش سنتی، گیاهچه‌ها در محیط‌های نیمه‌جامد یا مایع در ظروف شیشه‌ای کشت شده و به‌طور مداوم در تماس با مواد غذایی قرار دارند (Nayyef et al., 2019). هرچند تولید گیاهان در شرایط درون‌شیشه‌ای نسبت به روش‌های سنتی تکثیر کارآمدتر است، اما این فرایند همچنان پرهزینه، زمان‌بر و نیازمند نیروی انسانی زیاد است. جهت غلبه بر این محدودیت‌ها، استفاده از

بیوراکتورهای گیاهی به‌عنوان روشی نوین برای مکانیزه کردن ریزازدیادی و کاهش هزینه‌ها مطرح شده است. نخستین گزارش استفاده از بیوراکتور در تکثیر گیاهان به سال ۱۹۸۱ و گیاه بگونیا باز می‌گردد (Takayama & Misawa, 1981). در گیاه زینتی Nerine که تکثیر طبیعی آن محدود است، استفاده از بیوراکتور موجب افزایش ۶ تا ۸ برابری رشد نسبت به محیط‌های مایع ثابت شد (Van der Salm et al., 1994). علاوه بر این، Akita et al. (1994) توسط یک بیوراکتور ۵۰۰ لیتری موفق به تولید ۶۴/۶ کیلوگرم شاخساره از ۴۶۰ گرم شاخساره اولیه گیاهچه استویا پس از یک ماه شدند (Akita et al., 1994). با توجه به افزایش نیاز کشور به پایه‌های رویشی عاری از ویروس و ناکافی بودن تولیدات موجود، توسعه و معرفی پایه‌های جدید ضروری به‌نظر می‌رسد. پایه CAB 11E یکی از پایه‌های نوین است که می‌تواند برای برخی مناطق کشور مناسب باشد. از آن‌جا که این پایه به‌تازگی در ایتالیا اصلاح شده است، اطلاعات موجود درباره‌ی ریزازدیادی آن بسیار محدود است؛ بنابراین بررسی شرایط محیط کشت و روش مناسب برای تکثیر و سازگاری آن از اهمیت زیادی برخوردار است و می‌تواند نقش مؤثری در بهبود تولید پایه‌های رویشی ایفا کند. همچنین، در این پژوهش کشت گیاهچه‌ها در بیوراکتور با روش کشت سنتی مورد مقایسه قرار گرفته است.

مواد و روش‌ها

تهیه ریزنمونه و سترون‌سازی:

سرشاخه‌های پایه رویشی گیلان و آلبالو، رقم CAB E11 در فصل بهار، از باغ مادری برادران حسینی در شهرستان نظرآباد، استان البرز ایران، جمع‌آوری شدند. ریزنمونه‌ها شامل جوانه‌های جانبی و رأسی بوده و پس از

جدول ۱- محیط‌های کشت پایه و ترکیب‌های هورمونی مورد استفاده

در مرحله پرآوری شاخساره‌های پایه رویشی CAB 11E

Table 1- Basal culture media and plant growth regulator combinations used during the shoot multiplication stage of the CAB 11E rootstock

Culture Medium	BA (mg L ⁻¹)	IBA (mg L ⁻¹)
MS	0.5	0
	1	0
	1	0.1
	2	0
WPM	0.5	0
	1	0
	1	0.1
	2	0
DKW	0.5	0
	1	0
	1	0.1
	2	00

کشت در بیوراکتور:

بیوراکتورهای مورد استفاده در این پژوهش از نوع PLANTFORM (ایرلند) بودند. بیوراکتورها پیش از استفاده با اتوکلاو در دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰ دقیقه سترون‌سازی شدند. در این مرحله از محیط کشت MS حاوی ۱ میلی‌گرم بر لیتر BA و ۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر IBA (بهترین محیط کشت استفاده شده در کشت سنتی) بدون آگار در بیوراکتورها استفاده شد. در این آزمایش، چهار بیوراکتور، هر یک حاوی ۳۰ گیاهچه (در مجموع ۱۲۰ گیاهچه)، و چهار شیشه کشت سنتی، هر یک حاوی ۳ گیاهچه (در مجموع ۱۲ گیاهچه)، مورد استفاده قرار گرفتند؛ شرایط اتاق رشد مشابه شرایط کشت سنتی حفظ گردید. گیاهچه‌ها روزانه دو بار و هر بار به مدت ۱۵ دقیقه تغذیه شده و هوادهی هر دو ساعت یک‌بار به مدت ۱۵ دقیقه انجام گرفت. پس از گذشت ۲۰ روز، گیاهچه‌ها برداشت شده و صفات رشدی مشابه مرحله قبل مورد ارزیابی و اندازه‌گیری قرار گرفتند (شکل ۱).

شست‌وشوی اولیه با آب جاری، پیش‌سترون‌سازی آن‌ها با مایع ظرف‌شویی انجام گرفت. سپس ریزنمونه‌ها به ترتیب با اتانول ۷۰ درصد به مدت ۱۵ تا ۳۰ ثانیه و هیپوکلریت سدیم ۱/۵ درصد به مدت ۵ دقیقه سترون‌سازی شدند. پس از چند بار شست‌وشو با آب مقطر سترون، ریزنمونه‌ها به محیط کشت مرحله استقرار منتقل شدند. همه ریزنمونه‌ها در محیط کشت MS (Murashige & Skoog, 1962) حاوی ۱ میلی-گرم بر لیتر هورمون BA کشت شدند. سطوح هورمونی مورد بررسی در این پژوهش بر اساس یافته‌ها و گزارش‌های پیشین در زمینه ریزازدیادی پایه‌های جنس *Prunus* و همچنین تجربیات و نتایج حاصل از فعالیت‌های آزمایشگاهی انجام‌شده پیش از اجرای این پژوهش در شرکت، انتخاب شدند.

پرآوری شاخه‌ها:

ریزنمونه‌های حاصل از رشد جوانه‌ها به محیط‌های کشت پایه MS، DKW (Driver et al., 1984) و WPM (Lloyd & Brent, 1980) حاوی ۴ ترکیب هورمونی منتقل شدند (جدول ۱). در این مرحله، برای هر تیمار ۵ شیشه کشت مورد استفاده قرار گرفت و در هر شیشه ۳ گیاهچه کشت شد؛ بنابراین، در مجموع ۱۵ گیاهچه برای هر تیمار مورد استفاده قرار گرفت. همچنین گیاهچه‌ها به مدت ۲۰ روز در دمای 22 ± 2 درجه سانتی‌گراد با طول روز ۱۶ ساعت نگهداری شدند. در پایان این مرحله، طول شاخساره‌ها و تعداد شاخساره اندازه‌گیری شد. ضریب شاخه‌زایی به‌صورت میانگین تعداد شاخساره‌های جدید تولیدشده از هر ریزنمونه اولیه محاسبه شد؛ به‌طوری‌که شاخساره اولیه مورد استفاده به‌عنوان ریزنمونه در محاسبه لحاظ نشد و تنها شاخساره‌های جدید تشکیل‌شده طی دوره کشت شمارش شدند.

اثر محیط کشت و ترکیب هورمونی بر طول شاخساره و ضریب شاخه‌زایی و همچنین اثر محیط کشت و IBA بر ریشه‌زایی، به صورت آزمایش‌های فاکتوریل در قالب طرح کامل تصادفی انجام شدند. همچنین در آزمایش مربوط به مقایسه سیستم‌های کشت، اثر سیستم کشت شامل دو سطح بیوراکتور و کشت سنتی بر طول شاخساره و ضریب شاخه‌زایی، در قالب طرح کامل تصادفی بررسی شد. در تحلیل‌های آماری، شیشه کشت یا بیوراکتور به عنوان واحد آزمایشی در نظر گرفته شد و میانگین صفات اندازه‌گیری شده در گیاهچه‌های موجود در هر واحد به عنوان یک مشاهده مستقل وارد تجزیه واریانس شد. داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار R تجزیه و تحلیل شدند و مقایسه میانگین‌ها توسط آزمون چنددامنه‌ای دانکن انجام گرفت. همچنین نمودارها توسط نرم‌افزار GraphPad Prism، نسخه ۸، رسم شدند.

نتایج

نتایج حاصل از تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که اثر متقابل محیط کشت و هورمون بر طول شاخساره و ضریب شاخه‌زایی در سطح ۱ درصد ($P \leq 0.01$) معنی‌دار بود (جدول ۲). بیشترین ضریب شاخه‌زایی مربوط به محیط کشت MS3 با ۱ میلی‌گرم بر لیتر BA و ۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر IBA بود که میانگین ضریب شاخه‌زایی ۴/۴ را نشان داد (شکل a). همچنین، گیاهچه‌های این تیمار با میانگین طول شاخساره ۳/۵۷ سانتی‌متر، بیشترین رشد طولی را به خود اختصاص دادند. با وجود این، بر اساس نتایج آزمون دانکن، اختلاف معنی‌داری بین این تیمار و محیط کشت MS1 با میانگین طول شاخساره ۳/۴۳ سانتی‌متر مشاهده نشد (شکل b). به طور کلی، در مقایسه عملکرد محیط‌های پایه مختلف، محیط پایه MS کارایی بالاتری نسبت به محیط‌های DKW و WPM نشان داد.



شکل ۱- کشت گیاهچه‌های پایه رویشی CAB 11E در سامانه بیوراکتور PLANTFORM

Figure 1- Cultivation of CAB 11E rootstock plantlets in the PLANTFORM bioreactor system

ریشه‌زایی:

در این پژوهش محیط کشت VS (Van der Salm) که به عنوان یک نسخه اصلاح شده از محیط MS شناخته می‌شود و در آن FeSO_4 با کلات آهن قوی‌تر Fe-EDDHA جایگزین شده است، مورد استفاده قرار گرفت. ریشه‌زایی ساقه‌های طویل شده حاصل از مرحله پرآوری، در محیط‌های کشت پایه MS و VS (Van der Salm et al., 1994) با غلظت کامل و نصف غلظت عناصر درشت‌مغذی انجام شد. هر یک از این محیط‌ها حاوی سه غلظت ۰/۵، ۱ و ۱/۵ میلی‌گرم بر لیتر هورمون IBA بودند. همچنین برای هر تیمار ۵ شیشه و در هر شیشه ۷ گیاهچه کشت شد. پس از ۲۰ روز، طول ریشه‌های تشکیل شده به ۵ تا ۱۰ میلی‌متر رسید و گیاهچه‌ها برای مرحله سازگاری آماده شدند. از سوی دیگر، جهت سازگاری، گیاهچه‌ها به بستری شامل ۳۵ درصد پیت‌ماس، ۳۵ درصد پرلیت و ۳۰ درصد کوکوپیت منتقل شدند. pH این بستر ۵/۵ بوده، از زهکشی مناسب و هدایت الکتریکی (EC) بسیار پائینی برخوردار بود.

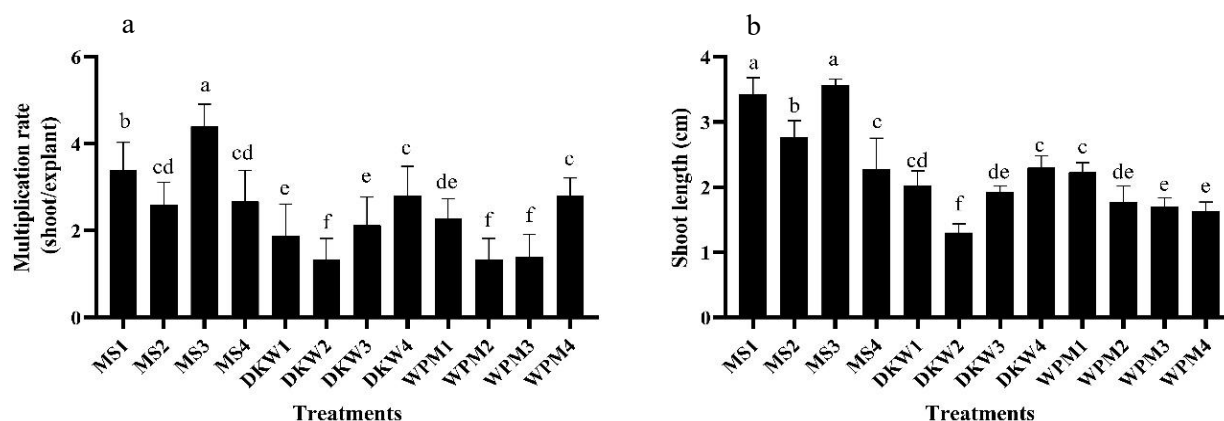
بررسی‌های آماری:

داده‌های حاصل از آزمایش‌ها توسط تجزیه واریانس مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. آزمایش‌های مربوط به بررسی

جدول ۲- نتایج تجزیه واریانس اثر محیط کشت و ترکیب هورمونی بر طول شاخساره و ضریب شاخه زایی

Table 2- Analysis of variance for the effects of culture medium and hormone composition on shoot length and shoot proliferation rate

Source of variation	df	Shoot length			Multiplication rate		
		Mean Square	F-value	P-value	Mean Square	F-value	P-value
Culture medium	2	8.77	175.39	8.55×10^{-23}	10.89	32.84	<0.001
Hormone	3	1.24	24.96	7.06×10^{-10}	3.08	9.29	<0.001
Culture medium $\times$ Hormone	6	0.92	18.54	5.17×10^{-11}	2.40	7.25	<0.001
Error	48	0.05	-	-	0.33	-	-
Total	59	-	-	-	-	-	-



شکل ۲- ضریب شاخه‌زایی (a) و طول شاخساره (b) گیاهچه‌های پایه رویشی CAB 11E در محیط‌های پرآوری MS، WPM و DKW حاوی غلظت‌های مختلف BA و IBA. در هر محیط پایه، کدهای ۱ تا ۴ به ترتیب مربوط به ۰.۵، ۱، ۲ میلی گرم بر لیتر BA همراه با ۰، ۰.۱، ۰.۵ و ۱ میلی گرم بر لیتر IBA هستند. نوارهای خطا، انحراف معیار (SD) و حروف متفاوت، تفاوت آماری معنی دار بین تیمارها بر اساس آزمون دانکن در سطح احتمال ۱ درصد ($P \leq 0.01$) را نشان می‌دهند.

Figure 2- Shoot multiplication rate (a) and shoot length (b) of CAB 11E rootstock plantlets cultured on MS, WPM, and DKW multiplication media containing different concentrations of BA and IBA. Within each basal medium, codes 1–4 correspond to 0.5, 1, 1, and 2 mg L⁻¹ BA combined with 0, 0, 0.1, and 0 mg L⁻¹ IBA, respectively. Error bars represent standard deviation (SD), and different letters indicate statistically significant differences among treatments according to Duncan's multiple range test at $P \leq 0.01$.

نتایج تجزیه واریانس همچنین بیانگر آن بود که نوع

سیستم کشت (بیوراکتور در مقایسه با کشت سنتی) اثر

معنی داری بر ضریب شاخه‌زایی داشت ($P \leq 0.01$)

درحالی که اثر آن بر طول شاخساره معنی دار نبود (جدول

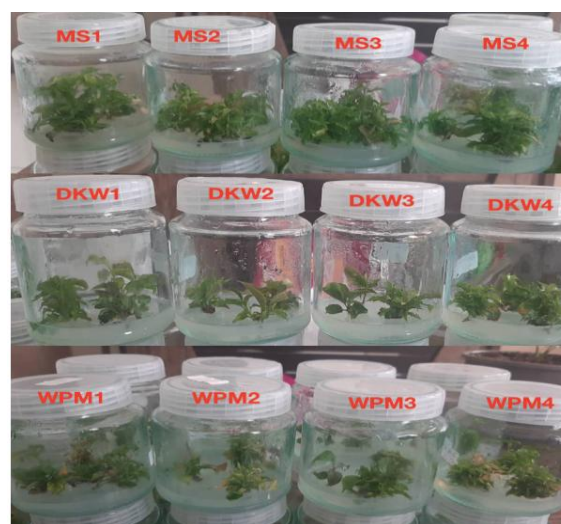
۳). میانگین ضریب شاخه‌زایی (تعداد شاخساره به ازای

هر ریزنمونه) در کشت بیوراکتوری ۱۴/۵۰ و در کشت

سنتی ۴/۰۸ بود. بر این اساس، ضریب شاخه‌زایی در

بیوراکتور حدود ۳/۵۵ برابر کشت سنتی بود (شکل‌های

۴ و ۵).



شکل ۳- گیاهچه‌های پایه رویشی CAB 11E در شیشه‌های کشت تحت تیمارهای مختلف محیط کشت و ترکیبات هورمونی در مرحله پرآوری

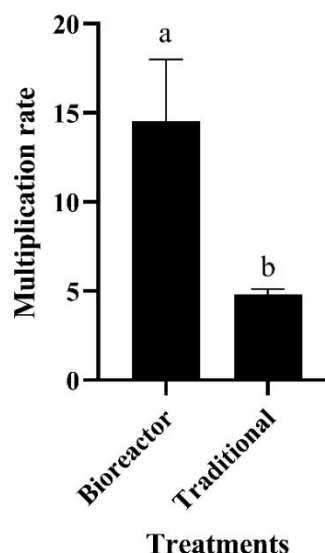
Figure 3- CAB 11E rootstock plantlets cultured in jars under different culture media and plant growth regulator combinations during the shoot multiplication stage

جدول ۳- نتایج تجزیه واریانس اثر سیستم کشت (بیوراکتور و کشت سنتی) بر طول شاخساره و ضریب شاخه‌زایی

Table 3- Analysis of variance for the effect of culture system (bioreactor and conventional culture) on shoot length and shoot proliferation rate

Source of variation	df	Shoot length			Multiplication rate		
		Mean Square	F-value	P-value	Mean Square	F-value	P-value
Culture system	1	0.003	0.07	0.81	217.01	34.90	0.001
Error	6	0.049	-	-	6.21	-	-
Total	7	-	-	-	-	-	-

درشت مغذی منتقل شدند که هر یک حاوی سه غلظت ۰/۵، ۱ و ۱/۵ میلی گرم بر لیتر هورمون IBA بودند. نتایج حاصل از تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که اثر متقابل هورمون و محیط کشت بر درصد ریشه‌زایی معنی‌دار بود ($P < 0.01$) (جدول ۴). بررسی مقایسه میانگین‌ها نشان داد که اگرچه افزایش غلظت IBA در برخی تیمارها موجب بهبود درصد ریشه‌زایی شد، اما اختلاف بین غلظت‌های مختلف هورمون چندان چشمگیر نبود. در مقابل، نوع محیط کشت و به‌ویژه منبع آهن نقش تعیین‌کننده‌تری در القای ریشه‌زایی داشت. محیط VS که در آن FeSO_4 با کلات پایدارتر-Fe-EDDHA جایگزین شده است، در تمامی سطوح هورمونی درصد ریشه‌زایی بالاتری نسبت به محیط MS نشان داد. همچنین کاهش غلظت عناصر درشت مغذی به نصف، به‌طور معنی‌داری موجب افزایش ریشه‌زایی شد که احتمالاً به علت کاهش تنش اسمزی و بهبود جذب عناصر غذایی، به‌ویژه آهن، بوده است. بیشترین درصد ریشه‌زایی (۹۷/۱ درصد) در محیط VS با نصف غلظت عناصر درشت مغذی و ۱ میلی گرم بر لیتر IBA مشاهده شد، درحالی که کمترین میزان (۳۱/۴) در محیط MS با غلظت عناصر درشت مغذی و ۰/۵ میلی گرم بر لیتر IBA به‌دست آمد (شکل‌های ۶ و ۷). به نظر می‌رسد پایداری بیشتر و فراهمی بالاتر آهن در فرم-Fe-EDDHA در محیط VS نسبت به FeSO_4 موجود در MS، می‌تواند نقش مؤثرتری در بهبود فرایند ریشه‌زایی نسبت به تغییرات جزئی در غلظت هورمون داشته است.



شکل ۴- ضریب شاخه‌زایی در سیستم‌های کشت بیوراکتور و کشت سنتی. ستون‌ها میانگین $\pm$ انحراف معیار را نشان می‌دهند. حروف متفاوت نشان‌دهنده تفاوت‌های آماری معنی‌دار بین میانگین‌ها بر اساس آزمون دانکن در سطح احتمال ۱ درصد ($P \leq 0.01$) است.

Figure 4- Shoot proliferation rate in the bioreactor and conventional culture systems. Data are presented as mean $\pm$ standard deviation (SD). Different letters indicate statistically significant differences among means according to Duncan's multiple range test at $P \leq 0.01$.



شکل ۵- گیاهچه‌های پایه رویشی CAB 11E کشت‌شده در سامانه بیوراکتور PLANTFORM

Figure 5- CAB 11E rootstock plantlets cultured in the PLANTFORM bioreactor system

ساقه‌های طویل‌شده به‌منظور القای ریشه‌زایی به محیط‌های کشت پایه MS و VS با غلظت کامل و نصف غلظت عناصر



شکل ۷- ریشه‌دهی گیاهچه‌های پایه رویشی CAB 11E در محیط کشت VS حاوی نصف غلظت عناصر درشت مغذی و ۱ میلی گرم بر لیتر IBA (RHalfVS2)

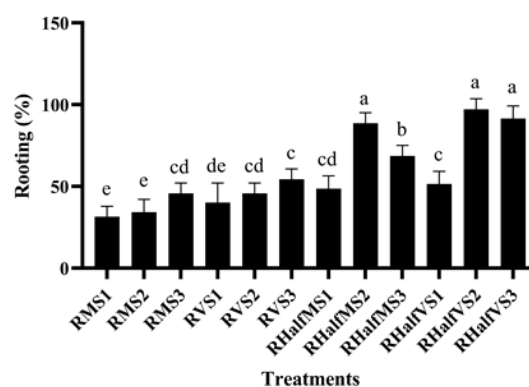
Figure 7- Rooting of CAB 11E rootstock plantlets in VS medium containing half-strength macronutrients and 1 mg L⁻¹ IBA (RHalfVS2)

بر اساس یافته‌ها، گیاهانی که مرحله شاخه زایی را در بیوراکتور و شیشه طی کرده بودند، پس از ریشه‌دار شدن به مرحله سازگاری منتقل شدند. گیاهچه‌های حاصل از بیوراکتور پس از ۱۵ روز به طور کامل سازگار شدند، درحالی که گیاهچه‌های کشت شده به روش سنتی پس از ۲۰ روز به طور کامل از پوشش سلفونی خارج شدند (شکل ۸). تنها تفاوت مشاهده شده در عملکرد گیاهچه‌های ریشه‌دار در این مرحله، مدت زمان مورد نیاز برای سازگاری بین گیاهان پرآوری شده در بیوراکتور و گیاهان حاصل از کشت سنتی بود. فرایند سازگاری بدون تلفات انجام شد و درصد بقا در هر دو تیمار ۱۰۰ درصد بود.

جدول ۴- نتایج تجزیه واریانس اثر محیط‌های کشت MS و VS با غلظت کامل و نصف غلظت عناصر درشت مغذی و غلظت IBA بر درصد ریشه‌زایی پایه رویشی CAB 11E

Table 4- Analysis of variance for the effects of MS and VS media with full- and half-strength macronutrients and IBA concentration on rooting percentage of CAB 11E rootstock

Source of variation	df	Mean Square	F-value	P-value
Culture medium	3	5800.21	103.31	<0.001
IBA	2	3499.21	62.33	<0.001
Culture medium × IBA	6	715.99	12.75	<0.001
Error	48	56.14	-	-
Total	59	-	-	-



شکل ۶- درصد ریشه‌زایی گیاهچه‌های پایه رویشی CAB 11E در محیط‌های کشت MS و VS با غلظت کامل و نصف غلظت عناصر درشت مغذی و غلظت‌های مختلف IBA. کدهای RMS1-RMS3، RVS1-RVS3، RHalfMS1-RHalfMS3 و RHalfVS1-RHalfVS3 به ترتیب نشان‌دهنده محیط‌های MS و VS با غلظت کامل و نصف غلظت عناصر درشت مغذی، همراه با ۰/۵، ۱ و ۱/۵ میلی گرم بر لیتر IBA هستند. نوارهای خطا، انحراف معیار (SD) را نشان می‌دهند و حروف متفاوت نشان‌دهنده تفاوت آماری معنی‌دار بین تیمارها بر اساس آزمون دانکن در سطح احتمال ۱ درصد ($P \leq 0.01$) هستند.

Figure 6- Rooting percentage of CAB 11E rootstock plantlets cultured on MS and VS media containing full- and half-strength macronutrients and different concentrations of IBA. The codes RMS1-RMS3, RVS1-RVS3, RHalfMS1-RHalfMS3, and RHalfVS1-RHalfVS3 represent MS and VS media with full- and half-strength macronutrients, respectively, supplemented with 0.5, 1, and 1.5 mg L⁻¹ IBA. Error bars represent standard deviation (SD), and different letters indicate statistically significant differences among treatments according to Duncan's multiple range test at $P \leq 0.01$.

کلرید جیوه و استون برای سترون سازی مواد گیاهی گزارش شده است (Boudabous et al., 2010). در این پژوهش، استفاده از اتانول و هیپوکلریت سدیم منجر به استقرار موفق ریزنمونه ها شد که با نتایج گزارش شده توسط Mastari Farahani et al. در سال (2021) همخوانی دارد. از سوی دیگر، محیط کشت MS یکی از پرکاربردترین محیط های پایه در کشت بافت گیاهی است و کارایی بالای آن در بسیاری از گونه های باغبانی به اثبات رسیده است. غلظت بالای نیتروژن و پتاسیم در این محیط، آن را به گزینه ای مناسب برای رشد و تکثیر گیاهان تبدیل کرده است (Safarnejad et al., 2016; Al-Eqabi & Al-Amery, 2025). در پژوهش حاضر نیز محیط کشت MS برای استقرار ریزنمونه ها مورد استفاده قرار گرفت. همچنین Sharma et al. (2017) در پژوهشی بر روی پایه Gisela5، بیشترین درصد استقرار (۷۵ درصد) را در محیط MS حاوی ۰/۵ میلی گرم بر لیتر BA و ۰/۵ میلی گرم بر لیتر GA3 گزارش کردند که نشان دهنده مناسب بودن این محیط برای پایه های جنس *Prunus* است. در مقابل، پژوهش (2025) Jonoubi et al. بالاترین درصد استقرار برای *P. avium* L. را محیط کشت WPM حاوی ۱ میلی گرم بر لیتر BA و ۰/۱ میلی گرم بر لیتر IBA مشاهده کردند، که نتایج آن با یافته های مطالعه حاضر متفاوت است. مرحله شاخه زایی یکی از مهم ترین مراحل در ریزازدیادی پایه های رویشی محسوب می شود که کارایی آن تحت تأثیر برهم کنش ترکیب هورمونی و ترکیب یونی محیط کشت قرار دارد و معمولاً شاخص هایی نظیر ضریب شاخه زایی و رشد طولی شاخساره برای ارزیابی آن مورد استفاده قرار می گیرند (Sharma et al., 2017). در پژوهش حاضر، اثر متقابل محیط کشت و ترکیب هورمونی بر طول شاخساره و ضریب شاخه زایی معنی دار بود و بهترین عملکرد در محیط کشت MS حاوی



شکل ۸- گیاهچه های پایه رویشی CAB 11E پس از سازگاری در

شرایط گلخانه ای

Figure 8- Acclimatized CAB 11E rootstock plantlets under greenhouse conditions

بحث

پایه های درختان میوه نقش کلیدی در پاسخ گویی به نیازهای تولید، ایجاد باغ های یکنواخت و دستیابی به عملکرد بالا ایفا می کنند. با توجه به تفرق صفات ژنتیکی در دانه رست حاصل از بذر، استفاده از پایه های رویشی به جای پایه های بذری از اهمیت ویژه ای برخوردار است (Hartmann et al., 2017). از این رو، در بسیاری از کشورها برنامه های اصلاح پایه ها متناسب با شرایط اقلیمی و اهداف تولید کنندگان، با هدف دستیابی به ژنوتیپ هایی دارای صفات مطلوب طراحی و اجرا می شوند. پایه های رویشی به علت القای زودباردهی، کنترل رشد رویشی (پاکوتاهی) و افزایش عملکرد، نسبت به پایه های بذری برتری قابل توجهی دارند (Arab & Shekafandeh, 2016). در این راستا، ریزازدیادی به عنوان کارآمدترین روش برای تکثیر انبوه، یکنواخت و سالم پایه های رویشی شناخته می شود (Sarikhani-khorami & Chehregani Rad, 2025). در پژوهش حاضر، توان ریزازدیادی پایه جدید CAB 11E مورد بررسی قرار گرفت و شرایط کشت آن بهینه سازی شد. همچنین سترون سازی موفق ریزنمونه ها از مراحل حساس ریزازدیادی به شمار می رود و انتخاب ماده ضد عفونی کننده، غلظت و مدت زمان تیمار باید متناسب با گونه گیاهی تنظیم شود. مواد مختلفی از جمله الکل، هیپوکلریت کلسیم، هیپوکلریت سدیم،

به ویژه نیتروژن کل (به صورت NH_4^+ و NO_3^-)، پتاسیم و کلسیم است که تقسیم سلولی و رشد رویشی را تقویت می کند (George et al., 2008)؛ نسبت آمونیوم به نترات در این محیط بر تنظیم pH، جذب عناصر و متابولیسم نیتروژن اثرگذار است و می تواند در افزایش کارایی شاخه زایی نقش داشته باشد. در مقابل، محیط WPM با قدرت یونی پایین تر برای گونه های چوبی طراحی شده است (Lloyd & Brent, 1980) و ممکن است از نظر تأمین نیتروژن برای رقم مورد بررسی محدود کننده تر باشد.

همچنین پژوهش های پیشین نشان داد بالاترین میزان تکثیر شاخه و بیشترین تعداد شاخه های باززایی شده پایه رویشی GiSela 17 توسط محیط کشت MS حاوی BAP (۰/۷۵ میلی گرم در لیتر) حاصل شد. در مقابل، کمترین میزان تکثیر و تعداد شاخه در محیط کشت WPM با BAP (۰/۲۵ میلی گرم در لیتر) و IBA (۰/۰۱ میلی گرم در لیتر) ثبت شد. برای شاخه زایی گیاهچه های *P. mahaleb* آنها را در سه محیط MS، WPM، و LP (Quoirin & Lepoivre, 1977) با ترکیب هورمونی یکسان کشت کردند. در این پژوهش، ضریب شاخه زایی در محیط کشت LP ضعیفترین عملکرد را داشت و محیط های WPM و MS بدون تفاوت معنی دار، به ترتیب بالاترین ضرایب شاخه زایی را داشتند (Sota & Kongjika, 2014). یافته های این پژوهش با نتایج قبلی مطابقت دارد، که حداکثر تکثیر شاخه و تعداد شاخه در *P. dulcis* کشت شده در محیط کشت MS مشاهده شد (Kodad et al., 2021). در این پژوهش، با توجه به نتایج به دست آمده می توان گفت که در کل محیط کشت MS تأثیر مثبت معنی داری روی شاخه زایی و پرآوری گیاهچه های رقم CAB E11 داشته است. از طرف دیگر، همانند بعضی از پژوهش های پیشین، حضور همزمان BA و IBA نیز سبب بهبود عملکرد گیاهچه ها در این مرحله شده است.

۱ میلی گرم در لیتر BA و ۰/۱ میلی گرم در لیتر IBA مشاهده شد. هم افزایی مشاهده شده بین BA و IBA را می توان در چارچوب تعادل اکسین-سیتوکینین تفسیر کرد. بر اساس نظریه کلاسیک (Skoog & Miller, 1957)، نسبت اکسین به سیتوکینین یکی از عوامل تعیین کننده در جهت دهی ریخت زایی در شرایط کشت درون شیشه ای است. سیتوکینین ها با تحریک تقسیم سلولی در ناحیه مریستم رأسی و فعال سازی ژن های مرتبط با چرخه سلولی موجب افزایش جوانه زایی جانبی می شوند، در حالی که حضور مقادیر کم اکسین با حفظ سازمان مریستمی و تنظیم انتقال قطبی اکسین، رشد طولی شاخساره ها را بهبود می بخشد (Taiz et al., 2015). بنابراین، حضور همزمان BA و IBA احتمالاً با ایجاد تعادل هورمونی مطلوب، سبب افزایش ضریب شاخه زایی و رشد طولی در رقم CAB E11 شده است. یافته های این پژوهش با نتایج (Sulusoglu & Cavusoglu, 2013) در *P. laurocerasus* همخوانی دارد؛ به طوری که افزودن IBA به محیط حاوی BA موجب افزایش قابل توجه ضریب شاخه زایی و رشد طولی شاخساره شد. همچنین (Sharma et al., 2017) در پژوهشی بر روی پایه Gisela5 گزارش کردند که حضور همزمان BA، GA3 و IBA بیشترین ضریب شاخه زایی را به دنبال داشت. نقش سیتوکینین BA در تحریک تقسیم سلولی در ناحیه مریستم رأسی و اثر هم افزایی آن با اکسین ها در بهبود شاخه زایی به خوبی شناخته شده است (Al-Eqabi & Al-Amery, 2025). با توجه به یافته ها، تغییر محیط کشت پایه نیز یکی از راه های بهبود کیفیت و کمیت تولید های کشت بافتی است. در پژوهش حاضر، محیط MS نسبت به محیط های DKW و WPM عملکرد بهتری نشان داد که این تفاوت را می توان به ترکیب نمکی و قدرت یونی بالاتر محیط MS نسبت داد. محیط MS دارای غلظت بالاتری از عناصر درشت مغذی،

استفاده از بیوراکتورهای غوطه‌وری موقت PLANTFORM در ریزازدیادی گیاهان مختلف نتایج متفاوتی را نشان داده است. در برخی پژوهش‌ها، مانند بررسی (Abahmane, 2020) بر روی ارقام مجول و Boufeggous نخل خرما، تفاوت معنی‌داری در ضریب شاخه‌زایی نسبت به کشت سنتی گزارش نشد؛ از سوی دیگر، (Nayyef et al., 2019) افزایش معنی‌دار شاخه‌زایی را در رقم برخی مشاهده کردند. همچنین در ریزازدیادی سیب‌زمینی نیز، کشت در بیوراکتور PLANTFORM موجب افزایش قابل توجه ضریب شاخه‌زایی نسبت به کشت شیشه‌ای شد. همچنین طول شاخ‌ها در این سیستم نسبت به روش سنتی افزایش قابل توجهی داشت (Al-Shareefi et al., 2020).

نتایج پژوهش حاضر نشان داد که استفاده از بیوراکتور تأثیر معنی‌داری بر طول شاخساره‌ها نداشت، اما ضریب شاخه‌زایی به‌طور قابل توجهی افزایش یافت. این یافته احتمالاً ناشی از ترکیبی از عوامل عملیاتی و فیزیولوژیک سیستم غوطه‌وری موقت است. عواملی مانند هوادهی مناسب، زمان و تعداد دفعات غوطه‌وری، حجم محیط مایع و حجم محفظه کشت می‌توانند رشد جانبی شاخه‌ها را تحریک کنند. همان‌طور که (Etienne & Berthouly, 2002) اشاره کرده است، کارایی سیستم‌های غوطه‌وری موقت ناشی از تهویه مناسب بافت‌ها و تماس متناوب و کامل سطح بافت با محیط مایع است؛ ویژگی مهمی است که در سایر سیستم‌های کشت مایع به‌طور هم‌زمان وجود ندارد. تنظیم زمان و تناوب غوطه‌وری نقش مهمی در جذب مواد غذایی، کنترل هاپریدریسته و بهبود کیفیت شاخساره‌ها دارد. علاوه بر این، تهویه اجباری و تجدید کامل اتمسفر در بیوراکتور می‌تواند با کاهش رطوبت نسبی و افزایش تعرق، گیاهچه‌ها را برای شرایط برون‌شیشه‌ای آماده‌تر سازد (Teisson & Alvard, 1995).

گیاهان حاصل از سیستم‌های غوطه‌وری موقت معمولاً در مرحله سازگاری عملکرد بهتری نسبت به گیاهان تولیدشده در محیط‌های نیمه‌جامد یا مایع ایستا نشان می‌دهند (Etienne & Berthouly, 2002). این برتری می‌تواند به آمادگی فیزیولوژیک بیشتر گیاهچه‌های حاصل از سیستم غوطه‌وری موقت برای انتقال به شرایط برون‌شیشه‌ای نسبت داده شود؛ زیرا تهویه و تبادل گاز مناسب‌تر در این سامانه می‌تواند به تنظیم بهتر روابط آبی و تبادل گاز گیاهچه‌ها کمک کرده و سازگاری آن‌ها را تسهیل کند (Etienne & Berthouly, 2002). در همین راستا، (Escalona et al., 2002) بازده سازگاری ۹۰ تا ۱۰۰ درصد را برای آناناس گزارش کردند که مستقیماً از سیستم بیوراکتوری به گلخانه منتقل شده بودند. نتایج پژوهش حاضر نیز نشان‌دهنده کارایی بالای بیوراکتور PLANTFORM در بهبود ریزازدیادی و سازگاری پایه رویشی CAB 11E است. از سوی دیگر، فرآیند ریشه‌زایی یکی از مراحل کلیدی در پروتکل‌های ریزازدیادی محسوب می‌شود و نقش اساسی در استقرار موفق گیاهچه‌ها پس از انتقال به شرایط خاک دارد. ریشه‌ها را می‌توان نتیجه جریان یک‌سویه اکسین از ساقه دانست، درحالی‌که اکسین برون‌زاد به‌عنوان القاکننده تشکیل پرموردیوم‌های ریشه‌های نابجا از سلول‌های مستعد در هیپوکوتیل یا ساقه‌های تازه تشکیل‌شده عمل می‌کند (Pasternak & Steinmacher, 2024). در پژوهش حاضر، بالاترین درصد ریشه‌زایی (۹۷/۱ درصد) در محیط VS با نصف غلظت عناصر غذایی و غلظت ۱ میلی‌گرم بر لیتر IBA مشاهده شد. این نتیجه نشان می‌دهد که کاهش غلظت عناصر معدنی محیط کشت، در کنار تأمین مناسب اکسین، می‌تواند شرایط مطلوب‌تری برای القای ریشه‌زایی فراهم کند. در همین راستا، (Manzoor et al., 2025) گزارش کردند که در پایه 17 GiSela، بیشترین میزان ریشه‌زایی در محیط

مرحله سازگاری شد. در مرحله ریشه‌زایی، تیمار-Fe(III)-EDDHA بیشترین تأثیر را نشان داد و سبب افزایش معنی‌دار درصد ریشه‌زایی، تعداد شاخساره و تعداد ریشه شد (Glinushkin et al., 2023).

در پژوهش حاضر نیز تغییر منبع آهن در محیط کشت موجب بهبود ریشه‌دهی شد. از سوی دیگر، حضور IBA تأثیر مثبتی بر ریشه‌دهی گیاهچه‌ها داشت. با این وجود، به جز سازگاری سریع‌تر گیاهچه‌های حاصل از پرآوری در بیوراکتور، تفاوت چشمگیری در میزان سازگاری گیاهچه‌ها مشاهده نشد. همچنین در این پژوهش، علی‌رغم عدم تغذیه تکمیلی گیاهان در مرحله سازگاری، به علت سبکی بستر مورد استفاده، شرایط کنترل‌شده بخش سازگاری گلخانه و نیز پایش مستمر وضعیت گیاهان، بازده سازگاری بسیار بالایی به دست آمد.

نتیجه‌گیری

به‌طور کلی، این پژوهش نشان می‌دهد که موفقیت ریزازدیادی پایه CAB 11E به بهینه‌سازی هم‌زمان ترکیب محیط کشت، تنظیم‌کننده‌های رشد و سیستم تکثیر وابسته است. در این راستا، محیط MS حاوی ۱ میلی‌گرم بر لیتر BA و ۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر IBA و در مرحله ریشه‌زایی، محیط VS با نصف غلظت عناصر درشت‌مغذی و ۱ میلی‌گرم بر لیتر IBA، به ترتیب بهترین پاسخ‌های تکثیر و ریشه‌زایی را ایجاد کردند. همچنین، استفاده از سیستم بیوراکتور با افزایش ضریب شاخه‌زایی و کاهش مدت زمان سازگاری، کارایی تکثیر را نسبت به کشت سنتی بهبود داد. بر این اساس، پروتکل بهینه ارائه‌شده در این پژوهش می‌تواند به عنوان روشی قابل اعتماد و مقیاس‌پذیر برای تولید انبوه گیاهچه‌های یکنواخت و باکیفیت پایه CAB 11E مورد استفاده قرار گیرد.

کشت $\frac{1}{2}$ MS حاوی ۳ میلی‌گرم بر لیتر IBA حاصل شد که بیانگر وابستگی پاسخ ریشه‌زایی به ژنوتیپ و غلظت اکسین است. در پژوهش دیگری بر روی پایه‌های مختلف جنس *Prunus*، برای ریشه‌زایی از محیط کشت MS با غلظت کامل و نصف مواد درشت‌مغذی و ریزمغذی استفاده شد. در نیمی از تیمارها، ۲۰۰ میلی‌گرم بر لیتر Fe-EDDHA به عنوان منبع آهن به کار رفت که همان منبع آهن محیط کشت VS در این پژوهش است. همچنین غلظت‌های مختلف IBA مورد استفاده قرار گرفت نتایج نشان داد که در تعدادی از ارقام، افزودن Fe-EDDHA تأثیر مثبت و معنی‌داری بر ریشه‌زایی داشت (Ognjanov et al., 2014). علاوه بر این، اثر منابع مختلف آهن شامل منابع آلی (Fe-EDTA و Fe-EDDHA) و منبع معدنی (FeCl_3) بر ریشه‌زایی پایه-GF 677 در شرایط درون‌شیشه‌ای بررسی شد. بیشترین ریشه‌زایی (۱۰۰ درصد) در ریزنمونه‌های تغذیه‌شده با Fe-EDDHA مشاهده شد، از سوی دیگر، در غیاب آهن یا در حضور FeCl_3 ، میزان ریشه‌زایی به‌طور قابل توجهی کاهش یافت. جالب توجه آن‌که در ریزنمونه‌های تغذیه‌شده با Fe-EDTA، علی‌رغم محتوای بالای آهن و کاهش شدید کلروفیل در پایان آزمایش، هیچ‌گونه ریشه‌زایی مشاهده نشد (Molassiotis et al., 2003). این نتایج بر نقش تعیین‌کننده نوع منبع آهن در فرآیند ریشه‌زایی و کارایی فیزیولوژیک آن در گیاهچه‌های درون‌شیشه‌ای تأکید می‌کند. در یک پژوهش مقدماتی، پنج نوع کلات آهن شامل Fe(III)-EDTA، Fe(III)-DTPA، Fe(III)-EDDHA، Fe(III)-HEDP و Fe(II)-HEDP در غلظت‌های مختلف در محیط MS بررسی شدند. نتایج نشان دادند پیچ‌امین‌الدوله آبی رقم «Lulia» نسبت به نوع کلات آهن پاسخ انتخابی دارد. اصلاح محیط غذایی با کلات‌های مؤثر موجب بهبود وضعیت فیزیولوژیک گیاه و افزایش بقای گیاهچه‌ها در

سپاسگزاری

همکاری‌های علمی و فنی این مجموعه نقش مهمی در پیشبرد و تکمیل این پژوهش داشته است. همچنین نویسندگان از معاونت پژوهش و فناوری دانشگاه خوارزمی به علت حمایت‌های علمی و پژوهشی صمیمانه قدردانی می‌کنند.

بدین‌وسیله نویسندگان مراتب قدردانی و تشکر خود را از شرکت سلول فناور دارو اعلام می‌دارند که انجام کارهای عملی این پژوهش با همکاری و فراهم‌سازی امکانات آزمایشگاهی آن شرکت امکان‌پذیر شد. حمایت‌ها و

References

- Abahmane, L. (2020). A comparative study between temporary immersion system and semisolid 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>
- Akita, M., Shigeoka, T., Koizumi, Y., & Kawamura, M. (1994). Mass propagation of shoots of *Stevia rebaudiana* using a large-scale bioreactor. *Plant Cell Reports*, 13(3), 180–183.
<https://doi.org/10.1007/BF00239888>
- Al-Eqabi, F. A., & Al-Amery, L. K. J. (2025). Micropropagation of *Prunus* sp.: Factors and hormones: A review. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 1487(1), 012070. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/1487/1/012070>
- Al-Shareefi, M. J., Abbass, J. A., & Abdulhussein, M. A. A. (2020). Effect of light sources and culture systems on microtubers production of potato (*Solanum tuberosum* L.) in vitro. *International Journal of Agricultural and Statistical Sciences*, 16(2), 679–686.
<https://connectjournals.com/03899.2020.16.679>
- Arab, M. R., & Shekafandeh, A. (2016). In vitro propagation of GF677 hybrid rootstock (*Prunus persica* × *Prunus amygdalus*) from mature cotyledons. *Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 91(3), 236–242.
<https://doi.org/10.1080/14620316.2016.1148368>
- Bolandi, A. R., Hamidi, H., & Rezagholy, A. A. (2016). Effects of culture media and growth regulators on propagation of rootstock GF677 in tissue culture conditions. *Iranian Journal of Biology*, 29(1), 1–14.
https://plant.ijbio.ir/?_action=articleInfo&article=766&lang=fa&lang=en [In Persian]
- Boudabous, M., Mars, M., Marzougui, N., & Ferchichi, A. (2010). Micropropagation of apple (*Malus domestica* L. cultivar Douce de Djerba) through in vitro culture of axillary buds. *Acta Botanica Gallica*, 157(3), 513–524.
<https://doi.org/10.1080/12538078.2010.10516227>
- Clapa, D., Fira, A., Simu, M., & Horga, V. C. (2013). In vitro propagation of Gisela 5 cherry rootstock. *Fruit Growing Research*, 29, 100–105.
<https://www.cabidigitallibrary.org/doi/full/10.5555/20143019900>
- De Salvador, F. R., Di Tommaso, G., Piccioni, C., & Bonofiglio, P. (2001). Performance of new and standard cherry rootstocks in different soils and climatic conditions. In *IV International Cherry Symposium* (Vol. 667, pp. 191–200). *Acta Horticulturae*.
<https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2005.66>

7.28

- Driver, J. A., & Kuniyuki, A. H. (1984). In vitro propagation of Paradox walnut rootstock. *HortScience*, 19(4), 507–509. <https://doi.org/10.21273/HORTSCI.19.4.507>
- Druart, P. (2013). Micropropagation of *Prunus* species relevant to cherry fruit production. In *Protocols for micropropagation of selected economically important horticultural plants* (pp. 119–136). Humana Press. https://doi.org/10.1007/978-1-62703-074-8_9
- Escalona, M., Lorenzo, J. C., González, B., Daquinta, M., González, J. L., Desjardins, Y., & Borroto, C. G. (1999). Pineapple (*Ananas comosus* L. Merr.) micropropagation in temporary immersion systems. *Plant Cell Reports*, 18(9), 743–748. <https://doi.org/10.1007/s002990050653>
- Etienne, H., & Berthouly, M. (2002). Temporary immersion systems in plant micropropagation. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 69(3), 215–231. <https://doi.org/10.1023/A:1015668610465>
- Ganji Moghadam, E., Bolandi, A. R., & Anahid, S. (2008). Micropropagation of four selected dwarf mahaleb (*Prunus mahaleb* L.) genotypes. *Pajouhesh-Va-Sazandegi*, 21, 54–61. <https://sid.ir/paper/19290/en> [In Persian]
- George, E. F., Hall, M. A., & De Klerk, G. J. (2008). *Plant propagation by tissue culture*. Springer. <https://doi.org/10.1007/978-1-4020-5005-3>
- Gyeviki, M. (2005). The effect of three rootstocks on yield and fruiting of sweet cherry. *Acta Horticulturae*, 667, 562–568. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2005.66.7.34>
- Glinushkin, A., Akimova, S., Nikulina, E., Tsirulnikova, N., Kirkach, V., Kalinitchenko, V., Radzhabov, A., Radkevich, E., Marchenko, L., & Solovyov, A. (2023). Preliminary study: micropropagation using five types of chelated iron and the subsequent acclimation of blue honeysuckle (*Lonicera caerulea* var. *kamtschatica* Sevest.). *Forests*, 14, 821. <https://doi.org/10.3390/f14040821>
- Hartmann, H. T., Kester, D. E., Davies, F. T., & Geneve, R. L. (2017). *Plant Propagation: Principles and Practices* (9th ed.). Pearson.
- Hunková, J.; Libiaková, G.; Fejér, J.; Vujović, T.; & Gajdošová, A. (2018). Testing of different iron sources and concentrations on shoot multiplication of blackberry (*Rubus fruticosus* L.). *Genetika*, 50, 351–356. <https://doi.org/10.2298/GENSR1801351H>
- Isachkin, A. V., & Kryuchkova, V. A. (2020). Fundamentals of scientific research in horticulture: a textbook for universities. *St. Petersburg: Lan*.
- Jonoubi, P., Bouzari, N., Shirkhani, Z., & Maleki, M. (2025). The effect of different basic culture media micropropagation, meristem cultivation on cherry (*Prunus avium* L.) and its micrografting of virus-free scions. *Journal of Plant Research (Iranian Journal of Biology)*, 38(4), 373–388. <https://doi.org/10.22034/jpr.2024.8461.3357> [In Persian]
- Kodad, S., Melhaoui, R., Hano, C., Addi, M., Sahib, N., Elamrani, A., ... & Mihamou, A. (2021). Effect of culture media and plant growth regulators on shoot proliferation and rooting of internode explants from moroccan native Almond (*Prunus dulcis* Mill.) genotypes. *International Journal of Agronomy*, 2021(1), 9931574. <https://doi.org/10.1155/2021/9931574>
- Lloyd, G., & McCown, B. (1980). Commercially-feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of

- shoot-tip culture. *Combined Proceedings-International Plant Propagator's Society* (Vol. 30, pp. 421-427). <https://www.cabidigitallibrary.org/doi/full/10.5555/19830315515>
- Mahdavian, M., Bouzari, N., & Abdollahi, H. (2011). Effects of media and plant growth regulators on micropropagation of a dwarfing cherry rootstock (PHL-A). *Biharean Biologist*, 5(2), 86-90. <https://B2n.ir/ry8677>
- Manzoor, I., Bhat, K. M., Mir, M. A., Nair, N. M., Pandit, A. H., Kulsum, U., ... & Pasternak, T. (2025). The Optimization of In Vitro Culture Establishment and Shoot Proliferation of "GiSelA 17" (*Prunus canescens* × *Prunus avium*): A Novel Cherry Rootstock. *International Journal of Plant Biology*, 16(1), 33. <https://doi.org/10.3390/ijpb16010033>
- Mastari Farahani, H., Sharafi, Y., & Imani, A. (2021). Study of In vitro proliferation and rooting of peach and almond hybrid rootstocks. *Research in Pomology*, 6(1), 38-50. https://journal.urmia.ac.ir/article_121085.htm 1 [In Persian]
- Molassiotis, A. N., Dimassi, K., Therios, I., & Diamantidis, G. (2003). Fe-EDDHA promotes rooting of rootstock GF-677 (*Prunus amygdalus* × *P. persica*) explants in vitro. *Biologia Plantarum*, 47(1), 141-144. <https://doi.org/10.1023/A:1027309705022>
- Murashige, T., & Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15(3), 473-497. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>
- Nayyef, M. N., Abdulhussein, M. A. A., & Almusawi, A. H. A. (2019). The efficiency of plant form bioreactor as temporary immersion system in bud and multiplication shoot via direct organogenesis of date palm under led light. *Plant Archives*, 19(1), 1419-1426. <https://un.uobasrah.edu.iq/papers/12828.pdf>
- Nikulina, E., Akimova, S., Tsiurlikova, N., & Kirkach, V. (2020). Different Fe (III) and Fe (II) complexes in clonal micropropagation of Gooseberry. In *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science* (Vol. 578, No. 1, p. 012015). IOP Publishing. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/578/1/012015>
- Nikulina, E. A., Akimova, S. V., Tsiurlikova, N. V., Glinushkin, A. P., Dolgoborodov, I. O., & Kirkach, V. V. (2021). Screening of different Fe (II) and Fe (III) complexes at the stage of rhizogenesis in vitro of gooseberry plants. In *Journal of Physics: Conference Series* (Vol. 1942, No. 1, p. 012075). IOP Publishing. <https://doi.org/10.1088/1742-6596/1942/1/012075>
- Ognjanov, V., Ljubojevic, M., Barac, G., Dulic, J., Pranjic, A., & Dugalic, K. (2014). Rapid propagation of sweet and sour cherry rootstocks. *Notulae Botanicae Horticulturae Agrobotanici Cluj-Napoca*, 42(2), 488-494. <https://doi.org/10.15835/nbha4229671>
- Pasternak, T. P., & Steinmacher, D. (2024). Plant growth regulation in cell and tissue culture in vitro. *Plants*, 13(2), 327. <https://doi.org/10.3390/plants13020327>
- Quoirin, M., & Lepoivre, P. (1977). Etude de milieux adapts aux cultures in vitro de *Prunus*. *Acta Horticulturae*, 78, 437-442.
- Safarnejad, A., Alamdari, S. B. L., Darroudi, H., & Dalir, M. (2016). The effect of growth regulators (BAP and IBA) on regeneration, proliferation and rooting of Natanz pears plant using in vitro technique. *Journal of Plant*

- Biological Sciences*, 8(29), 77-90. <https://doi.org/10.22108/ijpb.2016.21037> [In Persian]
- Sarikhani-khorami, H., & Chehregani Rad, A. (2025). Investigating the micropropagation of stone fruits (*Prunus* sp.) rootstocks under the influence of culture medium, plant growth regulators and carbon nanotubes. *Journal of Plant Research (Iranian Journal of Biology)*, 38(3), 239-255. https://plant.ijbio.ir/article_2511.html [In Persian]
- Sansavini, S., & Lugli, S. (2009). New rootstocks for intensive sweet cherry plantations. In *VI International Cherry Symposium 1020* (pp. 411-434). <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2014.1020.59>
- Sarropoulou, V., Dimassi-Theriou, K., & Therios, I. (2013). In vitro rooting and biochemical parameters in the cherry rootstocks CAB-6P and Gisela 6 using L-methionine. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, 37(6), 688-698. <https://doi.org/10.3906/tar-1212-81>
- Sharma, V., Thakur, M., & Kumar, A. (2017). An efficient method for in vitro propagation of Gisela 5 (*Prunus cerasus* x *Prunus canescens*)-clonal cherry rootstock. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 6(8), 2617-2624. <https://doi.org/10.20546/ijemas.2017.606.311>
- Skoog, F., & Miller, C. O. (1957). Chemical regulation of growth and organ formation. *Symposia of the Society for Experimental Biology*, 11, 118-131.
- Sota, V., & Kongjika, E. (2014). The effect of nutrient media in micropropagation and in vitro conservation of wild population of mahaleb cherry (*Prunus mahaleb* L.). *Journal of microbiology, biotechnology and food sciences*, 3(6), 453-456. <https://office2.jmbfs.org/index.php/JMBFS/article/view/7656/1878>
- Sotirov, D., & Dimitrova, S. (2022). Influence of some rootstocks and interstocks on the growth and fruiting of cherry cultivar Summit. *Bulgarian Journal of Agricultural Science*, 28(3), 413-416. <https://www.agrojournal.org/28/03-07.pdf>
- Sulusoglu, M., & Cavusoglu, A. (2013). Micropropagation of cherry laurel (*Prunus laurocerasus* L.). *Journal of Food Agriculture and Environment*, 11, 576-579. <https://B2n.ir/yd1143>
- Takayama, S., & Misawa, M. (1981). Mass propagation of *Begonia* x *hiemalis* plantlets by shake culture. *Plant and Cell Physiology*, 22(3), 461-467. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.pcp.a076188>
- Taiz, L., Zeiger, E., Møller, I. M., & Murphy, A. (2015). *Plant physiology and development* (6th ed.). Sinauer Associates.
- Teisson, C., & Alvard, D. (1995). A new concept of plant in vitro cultivation liquid medium: Temporary immersion. In M. Terzi et al. (Eds.), *Current issues in plant molecular and cellular biology* (pp. 105-110). Kluwer Academic Publishers. https://doi.org/10.1007/978-94-011-0307-7_12
- Trejgell, A., Libront, I., & Tretyn, A. (2012). The effect of Fe-EDDHA on shoot multiplication and in vitro rooting of *Carlina onopordifolia* Besser. *Acta Physiologiae Plantarum*, 34(5), 2051-2055. <https://doi.org/10.1007/s11738-012-1000-4>
- Van der Salm, T. P., Van der Toorn, C. J., Hänisch ten Cate, C. H., Dubois, L. A., De Vries, D. P.,

& Dons, H. J. (1994). Importance of the iron chelate formula for micropropagation of *Rosa hybrida* L. 'Moneyway'. *Plant Cell, Tissue*

and Organ Culture, 37(1), 73–77.

<https://doi.org/10.1007/BF00048120>