

## بررسی اثر تنظیم‌کننده‌های رشد (BAP و IBA) بر باززایی، پرآوری و ریشه‌زایی گیاه گلابی نطنز با روش کشت در شیشه

عباس صفرنژاد<sup>۱</sup>، سیده بی‌بی لیلا علمداری<sup>۲</sup>، هادی درودی<sup>۲</sup> و مرضیه دلیر<sup>۲</sup>

<sup>۱</sup> مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی خراسان رضوی یا شعبه مشهد، پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی ایران، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج

کشاورزی، مشهد، ایران

<sup>۲</sup> بخش تحقیقات کشت بافت، شعبه مشهد، پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی ایران، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، مشهد، ایران

### چکیده

گلابی یکی از مهمترین درختان میوه مناطق معتدل و سردسیر محسوب می‌شود که به سبب طعم مناسب و ارزش اقتصادی بالای آن، سال‌های متمادی است که در ایران پرورش می‌یابد. هدف از انجام پژوهش حاضر، تعیین محیط بهینه برای تکثیر سریع گیاه گلابی سالم از طریق کشت بافت است. ابتدا نمونه‌های گلابی از باغ آستان قدس رضوی، جمع‌آوری و از جوانه‌های انتهایی و جانبی برای ریزنمونه استفاده شد. بهترین تیمار برای استریل‌سازی جوانه‌ها محلول ۰/۱ درصد کلرید جیوه به مدت سه دقیقه و اتانول ۷۰ درصد به مدت یک دقیقه شناخته شد. آزمایش بر اساس طرح کاملاً تصادفی در سه تکرار انجام شد. نتایج نشان داد بهترین محیط برای باززایی (Regeneration)، محیط MS (Murashige and Skoog) همراه با سه میلی‌گرم در لیتر BAP (6- Benzylaminopurine) و ۰/۰۱ میلی‌گرم در لیتر IBA (Indole-3-Butyric Acid) است. بهترین محیط برای پرآوری (Proliferation)، محیط MS همراه با پنج میلی‌گرم در لیتر BAP و ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر IBA است. بیشترین طول شاخه در محیط، سه میلی‌گرم در لیتر BAP و ۰/۰۱ میلی‌گرم در لیتر IBA تشخیص داده شد. نتایج تحلیل واریانس نشان داد که تفاوت معنی‌داری بین تیمارهای ریشه‌زایی وجود نداشت. گیاهچه‌های ریشه‌دار شده برای سازگاری به جیفی پات و سپس به خاک منتقل شدند.

**واژه‌های کلیدی:** کشت بافت، گلابی، هورمون‌های گیاهی.

### مقدمه

( $2n=2x=34$ ) متعلق است (Jakson, 2003). بیش از ۲۲

گونه از *Pyrus* وجود دارد که ۱۶ گونه آن از آسیا منشأ

گرفته است (Nee et al., 2002). گلابی یکی از

گلابی *Pyrus* sp. به خانواده Rosaceae و

زیرخانواده *Pomoidea* با ۱۷ جفت کروموزوم

\* نگارنده مسؤول: نشانی پست الکترونیک: sebre14@abrii.ac.ir، شماره تماس: ۰۵۱۳۸۵۹۰۳۰۰

Copyright©2016, University of Isfahan. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0>), which permits others to download this work and share it with others as long as they credit it, but they cannot change it in any way or use it commercially.

نیز کیفیت مطلوبی ندارند. به کارگیری سایر روش‌های ازدیاد غیر جنسی که به تولید درختان خودریشه منجر می‌شود، می‌تواند راه حل مناسبی برای مشکلات ذکر شده باشد. استفاده از ریزازدیادی (Micropropagation) در تکثیر و تولید گیاهان، سال‌هاست که توجه پژوهشگران را به خود جلب کرده است. این شاید به آن دلیل است که کاربرد شیوه‌های سنتی در تکثیر گیاهان به ویژه گیاهان کلونی، علاوه بر طولانی بودن، می‌تواند گسترش بیماری‌ها را موجب شود. بنابراین برای تولید گیاهان سالم، یکدست و یکنواخت در مدت زمان اندک، استفاده از روش‌های کشت بافت لازم است (Baghery and Safari, 2004). روش کشت درون شیشه جاذبه تجاری بالایی دارد؛ زیرا امکان رشد سریع گیاهان و تولید گیاهان با کیفیت بالا را فراهم می‌کند و ابزار مناسبی برای رسیدن به اهدافی است که در شرایط کشت در محیط طبیعی، دستیابی به آن‌ها دشوار است (Lambardi and Rugini, 2003). تکثیر گلابی به روش‌های مختلف امکان‌پذیر است، ولی معرفی عملی‌ترین و اقتصادی‌ترین روش تکثیر آن مستلزم شناخت همه روش‌های ازدیاد از جمله تکثیر درون شیشه‌ای است. ارقام مختلف گلابی به سبب قابلیت بالای هتروزیگوسی از طریق بذر به خوبی قابل تکثیر نیستند (Shibli *et al.*, 1997). کارهای بسیاری در رابطه با کشت بافت گلابی در دنیا انجام شده است. تکثیر درون شیشه‌ای، این امکان را فراهم می‌کند که در طول سال برای استفاده در دسترس باشند و همچنین ژرم پلاسم گلابی تکثیر شده در محیط استریل به سبب نداشتن عوامل بیماری‌زا با اطمینان کامل از سدهای قرنطینه

مهمترین درختان میوه مناطق معتدل و سردسیر محسوب می‌شود که به سبب طعم مناسب و ارزش اقتصادی بالای آن، سال‌های زیادی است که در ایران پرورش می‌یابد. از ارقام گلابی بومی ایران می‌توان به رقم‌های تاشکنندی، درگری، دمکج، سبری، شکری، سردودی، سه‌فصله، سیف تبریز، شاهک، شاه‌میوه، فلسطینی، قوسی، محمدعلی و نطنزی اشاره کرد (Tahzibi Hagh *et al.*, 2011).

بر اساس آمار سازمان خوار و بار جهانی (FAO, 2011)، کشور چین با تولید ۱۵/۹ میلیون تن مقام اول، ایتالیا با تولید ۹۲۶ هزار تن، مقام دوم و آمریکا با ۸۵۰ هزار تن، مقام سوم تولید گلابی را در جهان به خود اختصاص داده‌اند. در این میان ایران با تولید ۱۴۵ هزار تن در مقام بیستم تولید این محصول در دنیا قرار دارد. یکی از مشکلات اصلی پرورش ارقام بومی ایران، مشکل دیرباروری آن‌ها روی پایه‌های بذری و ناسازگاری آن‌ها روی پایه‌های کوئینز است (Davarynejad *et al.*, 2007). طبق نظر Zhu و همکاران (۲۰۰۳)، پایه‌های کوئینز به خاک‌های قلیایی حساسیت دارند و استقرار مناسبی ندارند. از آن‌جا که بیشتر مناطق ایران که مستعد کاشت گلابی است، خاک‌های قلیایی دارد در نتیجه محدودیت بیشتری در تولید این محصول در ایران ایجاد شده است. علایم ناسازگاری‌های مشاهده شده در انواع نهال‌های پیوندی عبارتند از: ناپیوستگی پوست درخت، اختلالات کامبیومی و تجمع نشاسته در محل پیوند. این موضوع تأخیر در باردهی درخت را موجب می‌شود (Ermeil *et al.*, 1999; Davarynejad *et al.*, 2007). علاوه بر این، به علت ضعف عمومی درخت، میوه‌های حاصل

در لیتر ۲ip و یک میلی گرم در لیتر BAP برای بهبود پرآوری شاخه و تیمار کوتاه‌مدت با دومیلی گرم در لیتر IBA برای ریشه‌زایی این پایه‌ها لازم است. D'Amico و همکاران (۲۰۰۲) در ریزازدیادی (Micropropagation) چهار گونه گلابی اروپایی، سه روش کشت در محیط کشت جامد، مایع و تکنیک غوطه‌ورسازی موقت را استفاده کرده‌اند. در پژوهش حاضر، محیط‌های مایع، شیشه‌ای شدن ریزنمونه‌ها را موجب شده است. Reed و همکاران (۲۰۱۳) برای ریزازدیادی گلابی بیان کرده‌اند که ضریب رشد ساقه در محیط کشت MS با غلظت بالای از کلرید کلسیم، فسفات پتاسیم و سولفات منیزیم و ۴/۴ میکرومولار BAP افزایش پیدا کرده است و رشد شاخه‌ها بیشتر از رشد ریشه‌ها بوده است. در آزمایشی برای ریزازدیادی گلابی *Pyrus pyrifolia*، بهترین پرآوری (Proliferation) در محیط کشت MS با ۲/۲ میلی گرم در لیتر هورمون BAP و یک میلی گرم در لیتر کینتین پس از چهار هفته به دست آمده است. بهترین پاسخ ریشه‌دهی نیز در محیط کشت MS که مقدار نمک‌های آن نصف شده است و با ترکیب ۰/۲۵ میلی گرم در لیتر هورمون (IBA+NAA) به دست آمده است (Zafrul and Kaloo 2010). کشت بافت گلابی با اهداف گوناگون از جمله تکثیر انبوه گیاهان سالم و بدون بیماری و تولید انبوه گیاهان یکنواخت از نظر ژنتیکی انجام شده است. به‌ویژه در سال‌های گذشته به علت بیماری آتشک، همه باغ‌های گلابی آستان قدس رضوی یا در معرض نابودی قرار گرفته‌اند یا نابود شده‌اند. بنابراین برای توسعه و اصلاح باغ‌های گلابی، حفظ ژنوتیپ‌هایی که در سال‌های طولانی جمع‌آوری

کشاورزی کشورهای مختلف قابل تبادل هستند (Songül and Yuçel, 1998).

آزمایش‌های Previati و همکاران (۲۰۰۲) برتری محیط پایه QL (Quoirin and Lepoivre) را نسبت به محیط MS برای ریزازدیادی (Micropropagation) هیبریدهای گلابی نشان داده است. Abdollahi و همکاران (۲۰۰۶) در ریزازدیادی ارقام گلابی، محیط رشدی دربردارنده نمک‌های پایه QL تغییر یافته، غنی شده با ۰/۳ ساکاروز، یک میلی گرم در لیتر BAP، یک میلی گرم در لیتر ۲ip (N6-2-) Isopentenyladenine و ۰/۵ درصد پکتین خوشه انگور را توصیه کرده‌اند. Nosrati و همکاران (۲۰۰۹) برای بررسی ریزازدیادی چهار رقم گلابی، سه آزمایش جداگانه انجام داده‌اند. نتایج آن‌ها نشان داده‌است که محیط کشت MS/2 و MSN/2 به ترتیب بیشترین میزان پرآوری شاخه و بلندترین شاخه‌ها را تولید کرده‌اند. گونه‌های شاه‌میوه و درگزی در غلظت دو میلی گرم در لیتر و گونه‌های ویلیامز و نطنزی در غلظت سه میلی گرم در لیتر BA، بیشترین میزان پرآوری شاخه را نشان داده‌اند. غلظت یکسان IBA و NAA (Naphthalene) (Acetic Acid) ۰/۱ میلی گرم در لیتر) در ترکیب با BA نشان داده‌است که اثر IBA بر طول شاخه بیشتر از NAA بوده است. Khodae Chghani و همکاران (۲۰۱۱) برای تکثیر درون شیشه‌ای دو پایه هم‌گروه گلابی OH×F69 و OH×F333، چهار آزمایش جداگانه انجام داده‌اند. نتایج آن‌ها نشان داده‌است که برای ریزازدیادی این دو پایه گلابی و بقای مطلوب ریزشاخه‌ها، محیط رشدی دربردارنده نمک‌های پایه QL تغییر یافته غنی شده با ۰/۵ میلی گرم

که جوانه‌های انتهایی و جوانه‌های جانبی را شامل می‌شدند. شاخه‌های تهیه شده به طول ۲۰-۱۵ سانتی‌متر به آزمایشگاه منتقل، برگ‌های آن حذف و شاخه‌ها به قطعات کوچک تقسیم شدند که هر یک به طول ۱ تا ۱/۵ سانتی‌متر بودند و در هر قطعه برش خورده حداقل یک جوانه وجود داشت.

**ضد عفونی ریزنمونه‌ها:** ریزنمونه‌ها مهمترین منبع آلودگی در کشت بافت هستند. این مرحله برای حذف بیشترین میزان آلودگی باکتریایی و قارچی از ریزنمونه‌ها انجام می‌شود. قطعات شاخه‌های جوانه‌دار پس از شست‌وشو با آب جاری به قطعات کوچکتر (هر قطعه دارای یک عدد جوانه) تقسیم شد و برای استریل کردن از محلول‌های مختلف ضد عفونی استفاده شد (جدول ۱).

شده است، اهمیت ویژه‌ای دارد و استفاده از روش کشت بافت در تکثیر انبوه گیاهان سالم و بدون بیماری و حفظ ژرم پلاسما موجود، مناسب و ضروری به نظر می‌رسد. از این رو پژوهش حاضر برای دست‌یابی به روش مناسب و موفقیت‌آمیز تکثیر انبوه و بهبود میزان ریشه‌زایی این گونه ارزشمند اقتصادی انجام شد. در این پژوهش، میزان و نوع هورمون‌ها بر اساس نتایج بررسی‌های قبلی روی گونه‌های دیگر گلابی انتخاب شده است. با توجه به این که با استفاده از دو هورمون ذکر شده نتایج مناسبی حاصل شد و هزینه‌های این دو هورمون نیز نسبتاً پایین است، غلظت‌های مختلف این دو هورمون بررسی شد.

### مواد و روش‌ها

در پژوهش حاضر از ریزنمونه‌های گلابی رقم نطنز جمع‌آوری شده از باغ آستان قدس رضوی استفاده شد

جدول ۱- تیمارهای ضد عفونی به کار برده شده در آزمایش

ردیف	تیمارهای ضد عفونی
۱	کلرید جیوه ۰/۰۲ درصد (۲ دقیقه) + اتانول ۷۰ درصد (۲ دقیقه) + هیپوکلریت ۱/۵ درصد (۱۵ دقیقه)
۲	هیپوکلریت سدیم ۲ درصد (۲۰ دقیقه) + اتانول ۷۰ درصد (۳۰ ثانیه)
۳	کلرید جیوه ۰/۱ درصد (۳ دقیقه) + اتانول ۷۰ درصد (۱ دقیقه)
۴	هیپوکلریت سدیم ۳ درصد (۱۵ دقیقه)

۵۰۰۰ میکرومول فوتون بر متر مربع بر ثانیه تنظیم شد. دوره نوری اتاق رشد، ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی بود. در دو هفته اول، ریزنمونه‌های آلوده حذف شدند. نخستین باززایی پس از یک هفته ظاهر شد.

### باززایی مستقیم (Direct Regeneration):

ریزنمونه‌ها از سرشاخه‌های ضد عفونی شده به اندازه ۱ تا ۱/۵ سانتی‌متر جدا شدند و به ظروف شیشه‌ای محیط کشت باززایی مستقیم (جدول ۲) منتقل شدند و شرایط محیطی لازم برای رشد آماده شد. دمای اتاق رشد،  $25 \pm 2$  درجه سانتی‌گراد و شدت نور در حدود

جدول ۲- محتوای هورمونی مربوط به محیط کشت باززایی مستقیم

محتوای هورمونی	تیمار
MS	T1
MS+ 0.2 mg/l BAP	T2
MS+ 0.5 mg/l BAP	T3
MS+ 1 mg/l BAP	T4
MS+ 2 mg/l BAP	T5
MS+ 3 mg/l BAP	T6
MS+ 0.2 mg/l BAP+0.1 mg/l IBA	T7
MS+ 0.5 mg/l BAP+0.1 mg/l IBA	T8
MS+ 1 mg/l BAP+0.1 mg/l IBA	T9
MS+ 3 mg/l BAP+0.1 mg/l IBA	T10
MS+ 5 mg/l BAP + 0.1 mg/l IBA	T11
MS+ 3mg/l BAP+0.01 mg/l IBA	T12

**تجزیه و تحلیل آماری:** آزمایش‌های مربوط به کشت بافت در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار انجام شد. داده‌ها در نرم‌افزار Excel وارد و با نرم‌افزار آماری SAS تجزیه شدند. مقایسه میانگین‌ها با روش دانکن و در سطح احتمال ۵ درصد انجام شد.

### نتایج و بحث

**ضد عفونی ریزنمونه‌ها:** برای کاهش آلودگی و بهینه‌سازی روش استریل‌سازی از تیمارهای مختلف برای به‌دست آوردن بهترین روش ضد عفونی استفاده شد. نتایج حاصل نشان داد که تیمار سه یعنی کلرید جیوه ۰/۱ درصد (۳ دقیقه) + اتانول ۷۰ درصد (۱ دقیقه) کمترین میزان آلودگی را دارند (جدول ۴).

### پرآوری (Proliferation) مواد گیاهی: در

پایان هر ماه، شاخساره‌های جدید جدا شدند و به محیط کشت جدید منتقل شدند. به این ترتیب تعداد نمونه‌ها به صورت تصاعدی افزایش یافت. این کار تا زمانی انجام شد که شاخساره کافی برای آزمایش‌های ریزازدیادی (Micropropagation) به دست آمد.

**ریشه‌زایی:** پس از به‌دست آمدن بهترین تیمار برای شاخه‌زایی، شاخه‌هایی با طول دو تا سه سانتی‌متر برای ریشه‌زایی در محیط MS دربردارنده ۰/۵، ۱، ۲، ۳، و ۵ میلی‌گرم در لیتر IBA و محیط نصف MS دربردارنده ۲ میلی‌گرم در لیتر IBA واکشت شدند.

جدول ۳- مقادیر هورمونی مربوط به محیط ریشه‌زایی

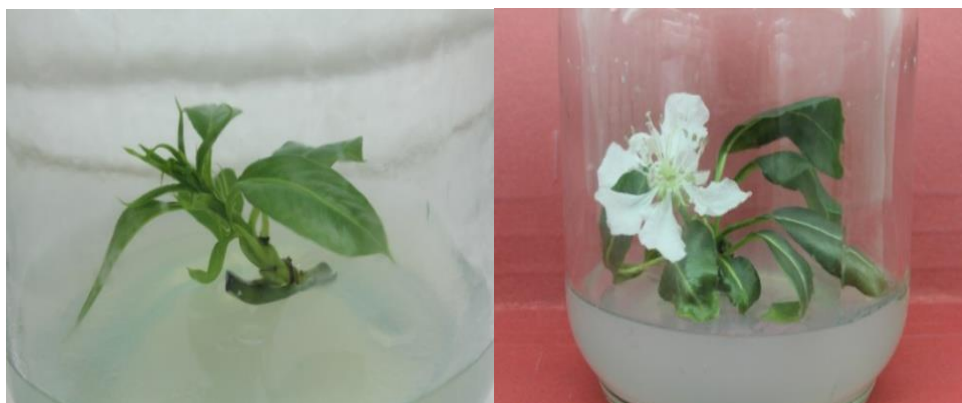
محتوای هورمونی	تیمار
MS +0.5 mg/l IBA	T1
MS+1 mg/l IBA	T2
MS+2 mg/l IBA	T3
MS+3 mg/l IBA	T4
MS+5mg/l IBA	T5
MS/2+2mg/l IBA	T6

جدول ۴- درصد آلودگی تیمارهای ضد عفونی

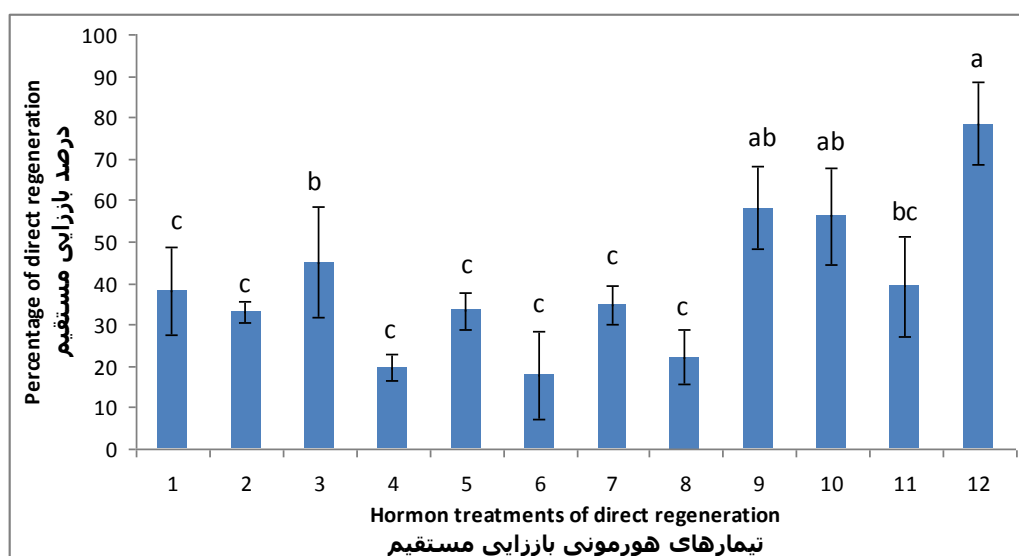
ردیف	تیمارهای ضد عفونی	درصد آلودگی
۱	کلرید جیوه ۰/۰۲ درصد (۲ دقیقه) + اتانول ۷۰ درصد (۲ دقیقه) + هیپوکلریت ۱/۵ درصد (۱۵ دقیقه)	۲۱
۲	هیپوکلریت سدیم ۲ درصد (۲۰ دقیقه) + اتانول ۷۰ درصد (۳۰ ثانیه)	۷/۵
۳	کلرید جیوه ۰/۱ درصد (۳ دقیقه) + اتانول ۷۰ درصد (۱ دقیقه)	۳/۵
۴	هیپوکلریت سدیم ۳ درصد (۱۵ دقیقه)	۵/۶

تجزیه و آریانس نشان داد که اختلاف معنی داری بین تیمارهای هورمونی باززایی وجود دارد. بهترین محیط برای باززایی محیط  $MS + 3 \text{ mg/l BAP} + 0.01 \text{ mg/l IBA}$  شناخته شد (شکل ۲).

**باززایی مستقیم (Direct Regeneration):** پس از انتقال ریزنمونه‌ها به محیط‌های مختلف هورمونی برای باززایی، جوانه‌ها شروع به رشد کردند و پس از حدود یک هفته، شاخه تشکیل شد (شکل ۱). نتایج



شکل ۱- باززایی و گل‌دهی گلابی



شکل ۲- مقایسه میانگین تیمارهای باززایی مستقیم

۱: MS, ۲: MS+ 0.2 mg/l BAP, ۳: MS+ 0.5 mg/l BAP, ۴: MS+ 1 mg/l BAP, ۵: MS+ 2 mg/l BAP, ۶: MS+ 3 mg/l BAP, ۷: MS+ 0.2 mg/l BAP+0.1 mg/l IBA, ۸: MS+ 0.5 mg/l BAP+0.1 mg/l IBA, ۹: MS+ 1 mg/l BAP+0.1 mg/l IBA, ۱۰: MS+ 3 mg/l BAP+0.1 mg/l IBA, ۱۱: MS+ 5 mg/l BAP + 0.1 mg/l IBA, ۱۲: MS+ 3mg/l BAP+0.01 mg/l IBA

داده‌ها میانگین  $\pm$  تکرار ۵ انحراف معیار، حروف یکسان، بیان‌کننده نبودن اختلاف معنی‌دار با استفاده از آزمون دانکن است.

که بهترین محیط برای باززایی، دربردارنده ۰/۰۰۰۲ میلی‌گرم در لیتر (Thidiazuron) TDZ و ۵ میلی‌گرم در لیتر BAP و ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر IBA بوده است. Karami و همکاران (۲۰۱۳) در پژوهشی روی بهینه‌سازی شرایط باززایی گیاه لویا (*Phaseolus vulgaris* L) نشان داده‌اند که در فرایند ساقه‌زایی با افزایش غلظت هورمون بنزیل آمینو پورین، درصد ساقه‌زایی تا غلظت ۲ میلی‌گرم در لیتر افزایش و پس از آن کاهش یافته است. Modarres و همکاران (۲۰۱۲) در بررسی روی گیاه نوروزک نشان داده‌اند که ترکیب BAP و IBA نتیجه مناسب‌تری در ارتباط با ساقه‌زایی به ازای هر ریزنمونه داشته است و BAP در غلظت ۲ میلی‌گرم در لیتر همراه با IBA در غلظت ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر بهترین تیمار ساقه‌زایی بوده است. نتایج Goleyjani Moghaddaam و همکاران (۲۰۱۲) در پژوهش روی بهینه‌سازی شرایط باززایی (Regeneration) و تراریختی گیاه کلزا، رقم‌های Hyola 308 و RGS003 نشان داده است که در غلظت ۳/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP، میزان باززایی رقم Hyola 308 به ۱۱۲ درصد و رقم RGS003 به ۱۲۰ درصد افزایش یافته است.

### پرآوری (Proliferation): پس از کشت جوانه‌ها

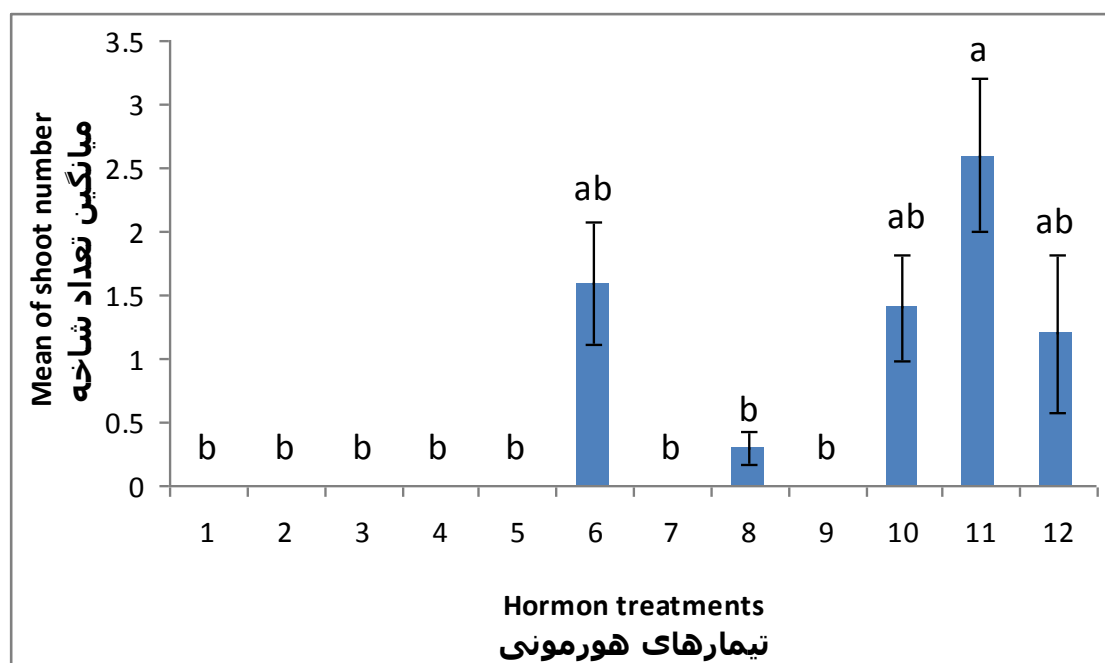
در محیط‌های دارنده غلظت‌ها و ترکیبات مختلف هورمونی، شاخه‌زایی انجام شد (شکل ۳). نتایج تجزیه واریانس نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار بین تیمارهای

تنظیم‌کننده‌های گیاهی معمولاً در باززایی (Regeneration) گیاهان جایگاه مهمی دارند و در مرحله باززایی، غلظت سیتوکینین‌ها از اکسین‌ها بیشتر است. درباره گونه بررسی شده در پژوهش حاضر نیز بهترین باززایی در محیط MS + 3 mg/l BAP + 0.01 mg/l IBA شناخته شد. در این رابطه بیان شده است که بیشترین ترکیب تنظیم‌کننده رشد مورد استفاده در مرحله استقرار کشت درون شیشه‌ای گلابی، یک میلی‌گرم در لیتر BA و ۰/۰۱ میلی‌گرم در لیتر NAA یا IBA بوده است. Shibli و همکاران (۱۹۹۷) و Reed و همکاران (۲۰۱۳) برای ریزازدیادی (Micropropagation) گلابی بیان کرده‌اند که ضریب رشد ساقه در محیط کشت MS با غلظت بالای از کلرید کلسیم، فسفات پتاسیم و سولفات منیزیم و ۴/۴ میکرومولار N<sub>6</sub>-بنزیل آدنین افزایش پیدا کرده است و رشد شاخه‌ها بیشتر از رشد ریشه‌ها بوده است. با این حال، اضافه کردن شیب تیماری ۵ تا ۱۰ میلی‌لیتر نفتالن استیک اسید قبل از کشت در محیط پایه MS بدون تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی برای رشد بسیاری از ژنوتیپ‌ها مؤثر است. Safarnejad (۲۰۱۵) در بررسی روی عناب نشان داده است که بیشترین میزان باززایی (Regeneration) در محیط کشت MS دربردارنده 2 mg/l<sup>-1</sup> BAP + 0.01 mg/l<sup>-1</sup> IBA به میزان ۹۶/۶ درصد به دست آمده است. Safarnejad و Saedi Heidari (۲۰۱۵) در بررسی روی افرا کیکم گزارش کرده‌اند



شکل ۳- مرحله پرآوری گلابی

پرآوری بود. در برخی ریزنمونه‌ها تعدادی شاخه به وجود آمد. با بررسی تیمارهای هورمونی مختلف، مشخص شد که بهترین محیط برای شاخه‌زایی، محیط MS دربردارنده پنج میلی‌گرم بر لیتر BAP و ۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر IBA بود (شکل ۴).



شکل ۴- مقایسه میانگین تعداد شاخه

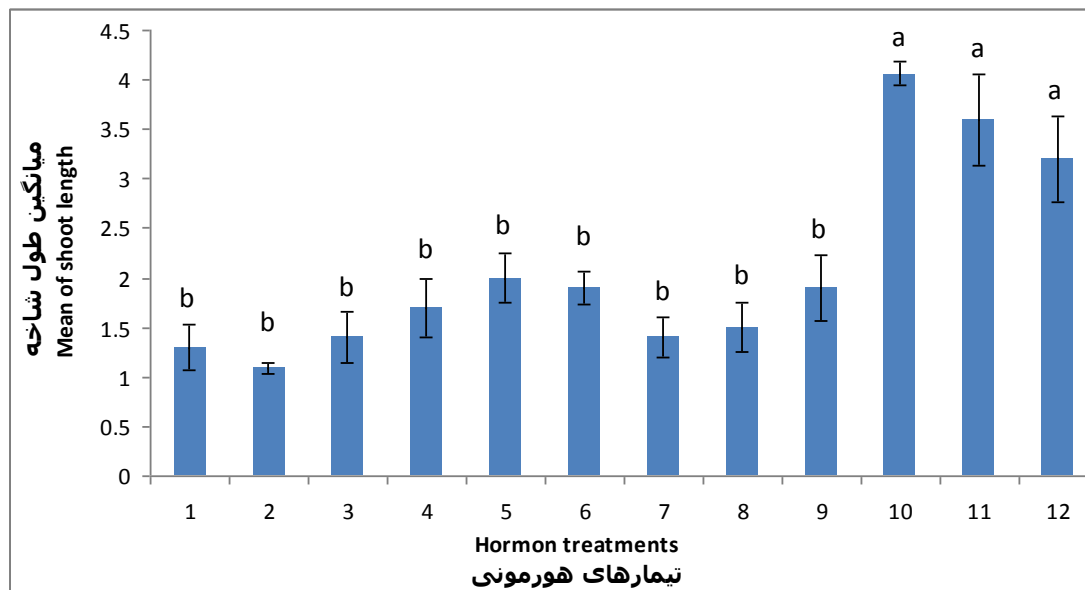
۱: MS, ۲: MS+ 0.2 mg/l BAP, ۳: MS+ 0.5 mg/l BAP, ۴: MS+ 1 mg/l BAP, ۵: MS+ 2 mg/l BAP, ۶: MS+ 3 mg/l BAP, ۷: MS+ 0.2 mg/l BAP+0.1 mg/l IBA, ۸: MS+ 0.5 mg/l BAP+0.1 mg/l IBA, ۹: MS+ 1 mg/l BAP+0.1 mg/l IBA, ۱۰: MS+ 3 mg/l BAP+0.1 mg/l IBA, ۱۱: MS+ 5 mg/l BAP + 0.1 mg/l IBA, ۱۲: MS+ 3mg/l BAP+0.01 mg/l IBA

داده‌ها میانگین ۵ تکرار  $\pm$  انحراف معیار است. حروف یکسان نشان‌دهنده نبودن اختلاف معنی‌دار با استفاده از آزمون دانکن است.

میلی‌گرم بر لیتر BAP و ۰/۰۱ میلی‌گرم بر لیتر IBA مشاهده می‌شود (شکل ۵).

همچنین نتایج مقایسه میانگین طول شاخه در نمونه‌ها نشان داد که بیشترین طول شاخه در محیط سه





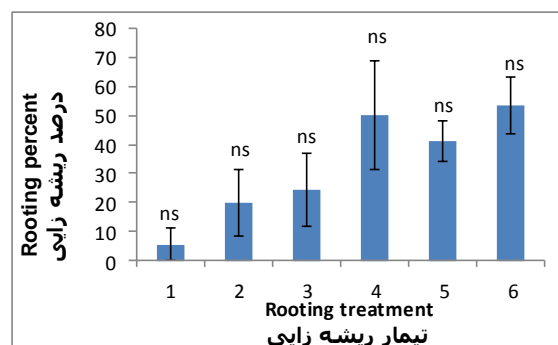
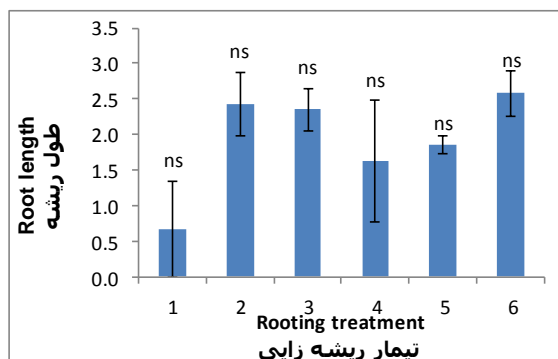
شکل ۵- مقایسه میانگین طول شاخه

۱: MS, ۲: MS+ 0.2 mg/l BAP, ۳: MS+ 0.5 mg/l BAP, ۴: MS+ 1 mg/l BAP, ۵: MS+ 2 mg/l BAP, ۶: MS+ 3 mg/l BAP, ۷: MS+ 0.2 mg/l BAP+0.1 mg/l IBA, ۸: MS+ 0.5 mg/l BAP+0.1 mg/l IBA, ۹: MS+ 1 mg/l BAP+0.1 mg/l IBA, ۱۰: MS+ 3 mg/l BAP+0.1 mg/l IBA, ۱۱: MS+ 5 mg/l BAP + 0.1 mg/l IBA, ۱۲: MS+ 3mg/l BAP+0.01 mg/l IBA

داده‌ها میانگین ۵ تکرار  $\pm$  انحراف معیار است. حروف یکسان نشان‌دهنده نبودن اختلاف معنی‌دار با استفاده از آزمون دانکن است.

روی ریزافزایی گلابی خودروی گونه *Pyrus syriaca* بیان کرده‌اند که محیط MS دارای ۰/۸ تا ۱ میلی گرم در لیتر BA مناسب شاخساره‌زایی است. در پژوهشی بیان شده است که افزایش یک میلی گرم در لیتر BA به محیط کشت برای تولید شاخساره در گلابی کافی است، اما مقدار آن بر اساس نوع گونه و رقم گلابی می‌تواند تغییر یابد (Morreti et al., 1991). Safarnejad و Moghimi (۲۰۱۴) در بررسی روی زالزالک، بهترین محیط برای پرآوری (Proliferation) محیط MS همراه با ۱ میلی گرم در لیتر BA و ۰/۵ میلی گرم در لیتر IAA (Indole-3- Acetic Acid) به دست آورده‌اند. همچنین در پژوهش دیگری اثر سایتوکینین‌های مختلف را روی رقم‌های گلابی ژاپنی متعلق به گونه *P.pyrifolia* بررسی کردند و بالاترین میزان

یکی از مهمترین مراحل کشت بافت، مرحله پرآوری (Proliferation) است که در آن به تکثیر ساقه‌های گیاهچه اقدام می‌شود. در مرحله پرآوری معمولاً نسبت سیتوکینین‌ها به اکسین‌ها بیشتر است. در پژوهش حاضر نیز از هورمون BAP جهت پرآوری استفاده شد. Shibli و همکاران (۱۹۹۷) برای پرآوری گلابی *P. syrica* بهترین رشد را روی محیط ۱/۵ تا دو میلی گرم در لیتر BAP و همکاران (۲۰۰۲) در ریزازدیادی گلابی (Rocha)، غلظت بالای BAP را موجب افزایش تعداد شاخه بیان کرده‌اند که یافته‌های حاصل از این بررسی را تأیید می‌کند. Berardi و همکاران (۱۹۹۲) گزارش کرده‌اند که غلظت بهینه BA برای تولید شاخساره *P. calleryana*، ۰/۵ میلی گرم در لیتر است. Saadat و همکاران (۲۰۱۳) در پژوهشی



شکل ۶- مقایسه میانگین تیمارهای مختلف ریشه‌زایی از جنبه صفات مختلف از طریق آزمون دانکن

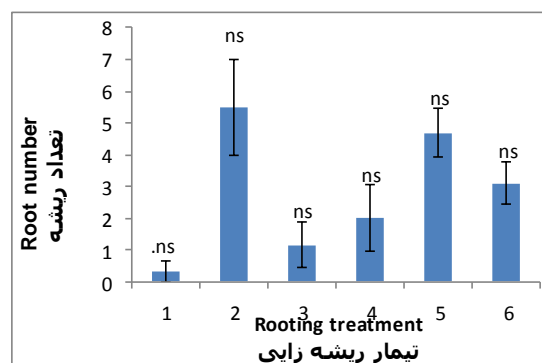
۱: MS +0.5 mg/l IBA, ۲: MS+1 mg/l IBA, ۳: MS+2 mg/l IBA, ۴: MS+3 mg/l IBA, ۵: MS+5mg/l IBA, ۶: MS/2+2mg/l IBA  
داده‌ها میانگین ۵ تکرار  $\pm$  انحراف معیار است. حروف یکسان نشان‌دهنده نبودن اختلاف معنی‌دار با استفاده از آزمون دانکن است.

نتایج بررسی میانگین طول ریشه نیز نشان داد که تیمار MS/2 + 2 mg/l IBA، طول ریشه به اندازه ۲/۶ Cm داشت. نتایج مقایسه میانگین تعداد ریشه نهال‌ها نشان داد که گیاهچه‌ها در اثر تیمار MS + 1 mg/l IBA، ۵/۷ عدد ریشه داشت. گیاهان ریشه‌دار شده پس از گذراندن مراحل مختلف سازگاری به خاک منتقل شدند (شکل ۷).

پرآوری را در غلظت ۲/۵ میلی گرم در لیتر BAP مشاهده کرده‌اند (Kadota and Niimi, 2003). Saboora و Shokri (۲۰۱۳) در بررسی روی گیاه دارویی برازمل نتیجه گرفته‌اند که بیشینه میانگین تعداد نوشاخه‌های تشکیل شده با کاربرد ۲/۵ میلی گرم در لیتر BAP به تنهایی حاصل شده بود. Karami و همکاران (۲۰۱۳) در پژوهشی روی گیاه لوییا نتیجه گرفته‌اند که در فرایند ریشه‌زایی با افزایش غلظت هورمون آلفا-نفتالین استیک اسید، ریشه‌زایی افزایش یافته است.

**ریشه‌زایی:** نتایج حاصل از تحلیل داده‌های ریشه‌زایی نشان داد که بین تیمارهای استفاده شده از نظر درصد ریشه‌زایی، طول ریشه و تعداد ریشه تفاوت معنی‌داری وجود ندارد.

مقایسه میانگین درصد ریشه‌زایی با آزمون دانکن نشان داد که درصد ریشه‌زایی در اثر تیمارهای مختلف، تفاوت معنی‌داری از خود نشان نداد (شکل ۶). درصد ریشه‌زایی مربوط به تیمار ۴ و ۶ (به ترتیب MS + 3 mg/l IBA و MS/2 + 2 mg/l IBA)، ۵۰ و ۵۳ درصد ریشه‌زایی به دست آمد.





شکل ۷. نمونه ریشه‌دار شده و گیاهچه‌های سازگار شده گلابی

نمک‌های آن نصف شده بود، مشاهده شد که یافته‌های پژوهش حاضر را تأیید می‌کند. Zafrul and Kaloo, Darroudi و همکاران (۲۰۱۵) در بررسی روی قره‌قات نتیجه گرفته‌اند که بستر MS همراه با ۰/۵ یا ۲ میلی‌گرم در لیتر IBA برای القای ریشه‌زایی مطلوب‌تر بوده است. Poordad و همکاران (۲۰۱۴) در پژوهشی روی سماق گزارش کرده‌اند که بیشترین میزان ریشه‌زایی در محیط کشت MS کامل با غلظت ۱ میلی‌گرم در لیتر IBA رخ داده است. Saadat و همکاران (۲۰۱۳) بیان کرده‌اند، شاخساره‌های گلابی خودروی گونه *Pyrus syriaca* کشت شده به مدت ۲۴ ساعت در تاریکی روی محیط کشت ویژه گردوی درایور و کانی یوکی (DKW) با نصف غلظت عناصر

در گیاهان معمولاً اکسین‌ها مسئول تحریک ریشه‌زایی هستند. یکی از متداول‌ترین اکسین‌های استفاده شده در کشت، بافت گیاهی IBA است. در مرحله ریشه‌زایی عمدتاً نسبت اکسین‌ها به سیتوکینین‌ها بیشتر است. در بررسی حاضر برای ریشه‌زایی از هورمون IBA استفاده شد و غلظت‌های ۲ و ۳ میلی‌گرم در لیتر، نتایج مناسب‌تری در برداشتند. در پژوهشی، تیمار کوتاه‌مدت با ۲ میلی‌گرم در لیتر IBA برای ریشه‌زایی پایه‌های گلابی توصیه شده است که با نتایج این پژوهش مطابقت دارد (Khodae Chghani *et al.*, 2011). همچنین در آزمایشی برای ریزازدیادی (Micropropagation) گلابی (*Pyrus pyrifolia*) بهترین پاسخ ریشه‌دهی در محیط کشت MS که مقدار

می‌کند و تیمار  $MS/2 + 2 \text{ mg/l IBA}$  دارای ریشه‌های قطورتر، متراکم‌تر و طویل‌تر است، بنابراین تیمار  $MS/2 + 2 \text{ mg/l IBA}$  برای القای ریشه‌زایی مناسب‌تر به نظر می‌رسد.

### نتیجه‌گیری کلی

با توجه به نتایج می‌توان گفت که غلظت‌های ۱ تا ۳ میلی‌گرم در لیتر هورمون BAP همراه با ۰/۱ تا ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر هورمون IBA، میزان باززایی (Regeneration) مطلوبتری نسبت به محیط‌های فاقد اکسین دارد. با افزایش غلظت سیتوکینین استفاده‌شده، میزان ضریب تکثیر بهبود می‌یابد و با توجه به طول ساقه گیاهچه‌ها و ضریب تکثیر آن، غلظت پنج میلی‌گرم در لیتر برای تکثیر گیاهچه‌ها مناسب‌تر است.

ماکرو و با ۷۵ میلی‌گرم در لیتر IBA پس از انتقال به گلدان‌های جیفی، ۱۰۰ درصد ریشه‌دار شده‌اند. Shibli و همکاران (۱۹۹۷) ۷۲ درصد ریشه‌زایی را با استفاده از محیط کشت MS دارای ۳ میلی‌گرم در لیتر IBA در *Pyrus syriaca* نشان داده‌اند. Modarres و همکاران (۲۰۱۲) در بررسی روی گیاه نوزادک بیان کرده‌اند که برای ریشه‌زایی ساقه‌ها، وجود اکسین ضروری است. IBA در غلظت ۱ میلی‌گرم در لیتر، بهترین تیمار ریشه‌زایی بوده است.

با توجه به نتایج به‌دست آمده، تیمار ۴ و ۶ ( $MS + 3$ ) و  $mg/l \text{ IBA}$  و  $MS/2 + 2 \text{ mg/l IBA}$  به ترتیب ۵۰ و ۵۳ درصد ریشه‌زایی داشتند، ولی چون تیمار  $MS + 3$   $mg/l \text{ IBA}$  علاوه بر ریشه‌زایی، القای کالوس فراوان را نیز موجب می‌شود، از سوی دیگر کالوس، آلودگی بستر پس از انتقال به شرایط خارج از شیشه را ایجاد

### منابع

- Abdollahi, H., Muleo, R. and Rugini, E. (2006) Optimization of regeneration and maintenance of morphogenic callus in pear (*Pyrus communis* L.) by simple and double regeneration techniques. *Scientia Horticulturae* 108: 352-358.
- Baghery, A. and Safari, M. (2004) Plant Tissue Culture. Mashhad Ferdowsi University Publication, Mashhad (in Persian).
- Berardi, G., Infante, R. and Neri, D. (1992) Micropropagation of *Pyrus calleryana* Dcn. from seedlings. *Scientia Horticulturae* 53: 157-165.
- D'Amico, C., Frattarelli, A. and Giorgioni, M. (2002) Micropropagation of pear through temporary immersion. *Acta Horticulturae* 596: 425- 429.
- Darroudi, H., Akbarinia, M., Safarnejad, A., Hosseini, S. M. and Hajian Shahri, M. (2015) Micropropagation of *Ribes khorasanicum* species by tissue culture. *Iranian Journal of Rangelands Forests Plant Breeding and Genetic Research* 23 (1): 65-76 (in Persian).
- Davarynejad, GH., Hassanpour, H., Azizi, M. and Sgahriaree, F. (2007) Investigation on the possibility of reducing graft incompatibility in some Iranian pear cultivars on Quince A by inter stocks. *Agriculture Sciences and Technology Journal* 21(1): 45-55.
- Ermel, F. F., Kervella, J., Catesson, A. M. and Poessel, J. L. (1999) Localized graft incompatibility in pear/quince (*Pyrus communis*/*Cydonia oblonga*) combinations: multivariate analysis of histological data from 5-month-old grafts. *Tree Physiology* 19: 645-654.

- Freire, I., Oelho, C. and Barros, M. (2002) Improved culture media for the *in vitro* establishment of pear from nodal cuttings. *Acta Horticulturae* 569: 457- 461.
- Goleyjani Moghaddaam, R., Motallebi, M., Zamani, M. R. and Rezanejad, H. (2012) Optimization of regeneration and transformation of canola Hyola 308 and RGS003 lines. *Iranian Journal of Plant Biology* 4(11): 47-60 (in Persian).
- Khodae Chghani, F., Abdollahi, H., Ershadi, A. and Asna Ashari, M. (2011) Assessment micropropagation of pear OH×F69 and OH×F333. *Seed and Plant Production Journal* 27-2(3): 297-312 (in Persian).
- Kadota, M. and Niimi, Y. (2003) Effects of cytokinin types and their concentration on shoot proliferation and hyperhydricity in *in vitro* pear cultivar shoots. *Plant Cell, Tissue Organ Culture* 72: 261-265.
- Karami, M., Bagherieh-Najjar, M. B. and Aghdasi, M. (2013) Optimization of conditions suitable for bean (*Phaseolus vulgaris* L.) regeneration. *Iranian Journal of Plant Biology* 5(15): 1-14 (in Persian).
- Lambardi, M. and Rugini, E. (2003) Micropropagation of Olive (*Olea europaea* L.), In: S. M. Jain and K. Ishii, Eds., *Micropropagation of Woody Trees and Fruits*. Kluwer Academic Publishers, The Netherlands pp 621-646.
- Jakson, J. E. (2003) *Biology of Apples and Pears*. Cambridge: Cambridge University Press Cambridge.
- Julesm, J. and James, N .M. (1996) Pears in Fruit breeding .*Tree and Tropical Fruits* 1: 441-514.
- Modarres, M., Lahouti, M., Gangeali, A. and Asili, J. (2012) Study of micropropagation of *Salvia leriifolia* Benth using shoot tip. *Iranian Journal of Plant Biology* 4(14): 89-100 (in Persian).
- Moghimi, Z. and Safarnejad, A. (2014) Assessment of micropropagation and flavonoid content of hawthorn through tissue culture. *Iranian Journal of Rangelands Forests Plant Breeding and Genetic Research* 22(2): 181-191 (in Persian).
- Moretti, C., Scozzoli, A., Passini, D. and Pagannelli, F. (1991) *In vitro* propagation of pear cultivars. *Acta Horticulturae* 300: 115-122.
- Nee, C. C., Tsai, C. H. and Anstine, D. D. (2002) Asian pears germplasm future trends and current research in the industry. *Acta Horticulture* 587: 61-69.
- Nosrati, S. Z., Zamani, Z. and Babalar, M. (2009) Micropropagation of four cultivar of pear (*Pyrus communis* L.). *Iranian Journal of Horticulture Science* 40(2): 83-91.
- Poordad, B., Safarnejad, A., Ebrahimi, M. A. and Bakhshi Khaniki, Gh. ( 2014) Investigation of effective factors on sumac *In vitro* propagation. *Iranian Journal of Rangelands Forests Plant Breeding and Genetic Research* 22(1): 25-33 (in Persian).
- Previati, A., Darei, F., Bassi, D., Tagliavini, M. and Marangoni, B. (2002) Development of protocols for *in vitro* propagation of advanced selections of *Pyrus communis* rootstocks 69BIS. *Acta Horticulturae* 596: 505-508.
- Reed, B. M., DeNoma, J., Wada, S. and Postman, J. ( 2013) Micropropagation of Pear (*Pyrus* sp.). *Methods in Molecular Biology* 11013: 3-18.
- Saadat, Y. A., Mousavi, B. and Beheshti Rooy, S. H. (2013) Micropropagation of Wild Pear (*Pyrus syriaca*). *Agricultural Biotechnology* 11(2): 1-8 (in Persian).

- Saboora, A. and Shokri, M. (2013) Effect of plant growth regulators on *in vitro* germination and micropropagation of Brazmbl (*Perovskia abrotanoides*), a medicinal plant. Iranian Journal of Plant Biology 5(18): 95-114 (in Persian).
- Saeedi Heidari, A. and Safarnejad, A. (2015) Micropropagation of *Acer monospeculanum* through tissue culture. Iranian Journal of Rangelands Forests Plant Breeding and Genetic Research 23(2): 237-246 (in Persian).
- Safarnejad, A. (2015) Effects of growth regulators on *in vitro* regeneration of *Ziziphus Jujube*. Iranian Journal of Rangelands Forests Plant Breeding and Genetic Research 23(1): 40-48 (in Persian).
- Shibli, R. A., Ajlouni, M. M., Jaradat, A., Aljanabi, S. and Shatnawi, M. (1997) Micropropagation in wild pear (*Pyrus syrica*). Scientia Horticulturae 68: 237-242.
- Songül, G. and Yucel, G. (1998) The effects of different sucrose, Agar and pH Levels on *In vitro* shoot production of Almond (*Amygdalus communis* L.). Tr. Journal of Botany 22: 363-373.
- Tahzibi Hagh, F., Abdolahi, H., Ghasemi, A. and Fathi, D. (2011) variation of vegetative traits in pear (*Pyrus communis* L.) native to Iran under weather condition of Karaj. Seed and Plant Improvement Journal 27(1): 37-55 (in Persian).
- Zafrul, H. and Kaloo, Z. A. (2010). *In vitro* micropropagation of “sand pear” *Pyrus pyrifolia* (Burm. f.) Nakai. Frontiers of Agriculture in China 4(3): 358-361.
- Zhu, L. H., Li, X. Y., Ahlman, A. and Welander, M. (2003) The rooting ability of the dwarfing pear rootstock BP 100030 (*Pyrus communis*) was significantly increased by introduction of the *rolB* gene. Plant Science 165: 829-853.



## The effect of growth regulators (BAP and IBA) on regeneration, proliferation and rooting of Natanz pears plant using *in vitro* technique

Abbas Safarnejad <sup>1\*</sup>, Seyedeh Bibi Leyla Alamdari <sup>2</sup>, Hadi Darroudi <sup>2</sup> and Marzieh Dalir <sup>2</sup>

<sup>1</sup> Faculty member of Khorasan Razavi Agricultural and Natural Resources Research Center or Mashhad Branch, Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Mashhad, Iran.

<sup>2</sup> Tissue Culture Research Department, Mashhad Branch, Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Mashhad, Iran

### Abstract

Pear (*Pyrus* sp.) is an important fruit growing in temperate and cold areas that due to suave and high economic value were cultured since ancient in Iran. The purpose of this study was to identify the best media for fast propagation of healthy plants of *Pyrus* sp. using tissue culture technique. At first, the pears samples were collected from the garden of Astan Quds Razavi and lateral and terminal buds were used as explants. For sterilization 0.1% mercuric chloride for 3 minutes, 70% ethanol for 1 minute was the best treatment. A Complete Randomized Design experiment was carried out with 3 replications. Results showed that Regeneration initiated on MS basal medium supplemented with 3 mg/l BAP + 0.01 mg/l IBA. The most multiplication was on MS medium supplemented with 0.1 mg/l IBA +3 mg/l BAP. The highest shoot length was observed in MS medium supplemented with 0.01 mg/l IBA +3 mg/l BAP. The results of ANOVA showed no significant differences between rooting treatment. The rooted plantlets transferred to Jf pot for adaptation and then transferred to soil.

**Key words:** Pear, Plant hormones, Tissue culture.

\* sebre14@abrii.ac.ir