Archive of SID

علوم باغبانی ایران
دورۀ ۴۷، شمارۀ ۲، تابستان ۱۳۹۵ (ص ۳۷۰-۳۶۱)

بهینه‌سازی روش ریزازدیادی درون شیشه‌ای برخی پایه‌های پر رشد گلابی

معصومه منصوریار[۱]، جواد عرفانی مقدم[۲*]، حمید عبداللهی[۳] و سید علیرضا سلامی[۴]
۱ و ۲. دانشجوی سابق کارشناسی ارشد و استادیار، دانشکدۀ کشاورزی، دانشگاه ایلام
۳. دانشیار، مؤسسۀ تحقیقات اصلاح و تهیۀ نهال و بذر کرج
۴. استادیار، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، کرج
(تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۹/۲۳ - تاریخ تصویب: ۱۳۹۴/۱۱/۱۷)

چکیده

به منظور ریزازدیادی چهار پایۀ پر رشد گلابی شامل پایه‌های کنجونی، *Pyrus betulifolia*، درگزی و پایۀ Gh1 اثر چند محیط کشت پایه (MS، QL و QL تغییریافته)، سایتوکینین و اکسین بر میزان باززایی، پرآوری و ریشه‌زایی آن‌ها در شرایط درون شیشه‌ای در مؤسسۀ تحقیقات اصلاح و تهیۀ نهال و بذر کرج بررسی شد. نتایج نشان داد در بین محیط‌های کشت پایه، بیشترین میزان پرآوری برای همۀ پایه‌ها، در محیط کشت QL مشاهده شد. در بین پایه‌های گلابی، پایۀ Gh1 در هر دو محیط کشت QL و QL تغییریافته، باززایی مطلوبی را نشان داد. نتایج مربوط به پرآوری ریزنمونه‌ها در غلظت‌های ۱ و ۲ میلی‌گرم در لیتر BAP و ۰، ۱ و ۲ میلی‌گرم در لیتر 2ip نشان داد، بیشترین پرآوری در غلظت ۱ میلی‌گرم در لیتر BAP به دست آمد، اما با اضافه کردن 2ip به محیط کشت، تأثیر معناداری بر پرآوری ریزنمونه‌ها نداشت. همچنین درصد ریشه‌زایی پایه‌ها با استفاده از غلظت‌های مختلف IBA نشان داد که بیشینه ریشه‌زایی در غلظت ۱ میلی‌گرم در لیتر IBA به دست آمد. ارزیابی درصد ریشه‌زایی در دو محیط کشت حاوی آگار و پرلایت نشان داد که بیشترین ریشه‌زایی پایه‌ها به‌غیراز پایۀ *P. betulifolia*، در محیط کشت حاوی پرلایت به دست آمد. درمجموع به منظور موفقیت در ریزازدیادی پایه‌های یادشده در شرایط درون شیشه‌ای استفاده از محیط کشت QL حاوی BAP (۱ میلی‌گرم در لیتر) برای پرآوری مطلوب و تیمار ۱ میلی‌گرم در لیتر IBA در شرایط پرلیت برای ریشه‌زایی مطلوب، قابل توصیه است.

واژه‌های کلیدی: اکسین، پرآوری، ریشه‌زایی، سایتوکینین، گلابی.

مقدمه

گلابی (*Pyrus* spp.) یکی از گیاهان مهم از خانوادۀ وردسانان[۱] از نظر تولید میوه پس از سیب است که در آسیا از ۳۰۰۰ سال پیش کشت و کار شده است و به لحاظ اندازه، شکل، بافت و طعم، تنوع زیادی در آن وجود دارد (Bell *et al.*, 1996; Janick, 2002). کشور ایران از مراکز اصلی تنوع جنس گلابی بوده و تنوع شایان‌توجهی از گونه‌ها، رقم‌ها و ژنوتیپ‌ها در مناطق جنگلی، کوهستانی و دشت‌ها قابل‌مشاهده است. وجود تنوع ژنتیک بالا در جنس گلابی نشان‌دهندۀ وجود اقلیم مناسب برای پرورش این محصول در قسمت گسترده‌ای از کشور است، لیکن به دلیل وجود مشکلات چندی مانند نبود معرفی رقم‌های تجاری مناسب، وجود نداشتن پایه‌های مناسب، معرفی نکردن

* تلفن: ۰۸۴۱-۲۲۲۷۰۲۹
E-mail: J.erfani@ilam.ac.ir
1. Rosaceae

www.SID.ir

Archive of SID

سامانهٔ کشت متراکم باغ‌ها، حساسیت به انواع تنش‌های زنده مانند پسیل گلابی، بیماری‌های ریشه و طوقه، بیماری آتشک و همچنین حساسیت به برخی تنش‌های غیرزنده مانند تابستان‌های گرم سطح زیر کشت آن در مقایسه با درخت سیب محدود باقی مانده است (Sabeti, 1994).

مهم‌ترین پایه‌های مورداستفاده برای احداث باغ‌های گلابی از دیرباز متعلق به دو جنس گلابی و درخت به بوده‌اند. پایه‌های متعلق به جنس گلابی به‌طورعمده دربرگیرندهٔ پایه‌هایی باقدرت رشد متوسط تا بسیار پر رشد بوده و پایه‌های گروه دوم یا گونهٔ به، دربردارندهٔ پایه‌های پاکوتاه تا نیمه پاکوتاه‌کننده هستند. بازدهٔ تولید میوهٔ گلابی با استفاده از پایه‌های نیمه پاکوتاه‌کننده بیشتر بوده و امروزه گرایش به استفاده از این پایه‌ها برای اصلاح ساختار باغ‌ها افزایش یافته است، اما پایه‌های پر رشد نیز به دلیل تحمل بالاتر نسبت به شماری از تنش‌های محیطی مانند خشکی، بیماری پوسیدگی طوقه و خاک‌های آهکی، همچنان موردتوجه شماری از تولیدکنندگان این محصول در استان‌های مختلف است. پایه‌های درختان میوه نقش مهمی در ایجاد مقاومت رقم پیوندشده نسبت به عامل‌های نامساعد محیطی مانند سرما، خشکی، شوری، pH بالا و آفات و بیماری‌های خاکزی دارند. امروزه اصلاح پایه‌ها همگام با اصلاح رقم‌ها، موردتوجه محققان قرارگرفته است و پرورش‌دهندگان درختان میوه در هنگام تهیهٔ نهال، توجه خاصی به انتخاب پایه‌های مناسب دارند (Jackson *et al.*, 2011). پس از شناسایی و گزینش پایهٔ مناسب، انتخاب روش‌های افزایشی مطلوب، با صرف کمترین هزینه و زمان اهمیت بسزایی دارد. به دلیل دگرگشن بودن درخت گلابی، در نهال‌های تولیدشده از بذر، تفرق به‌دست‌آمده و قلمه‌های چوب نرم و سخت در برخی رقم‌ها نیز ریشه‌زایی مطلوبی ندارند (Berardi *et al.*, 1992). در سال‌های اخیر به منظور غلبه بر مشکلات موجود در افزایش رویشی رقم‌ها و همسانه (کلون)های گلابی، استفاده از روش‌های ازدیاد درون شیشه‌ای توسعه یافته‌اند. با این‌وجود هنوز انجام تحقیقات بیشتر در انتخاب محیط کشت مناسب و به کار بردن میزان دقیقی از تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی، برای دستیابی به بیشینهٔ پرآوری در ریزنمونه‌ها ضروری است (Sedlak & Paprstein, 2008).

تأثیر انواع محیط‌های کشت بر میزان پرآوری ساقه و ریشه‌زایی برخی رقم‌های گلابی، به‌ویژه رقم‌های اروپایی متعلق به گونهٔ گلابی اروپایی[1] که ارزش تجاری دارند، بررسی شده است و در این راستا از محیط‌های کشت متفاوتی به‌ویژه MS استفاده شده است (Kadota & Niimi, 2003). گزارش‌هایی نیز مبنی بر استفاده از محیط کشت QL وجود دارد (Quoirin & Lepoivre, 1977). همچنین تأثیر مقادیر مختلف تنظیم‌کننده‌های رشد بررسی و با توجه به رقم‌ها، نتایج متفاوتی مشاهده شده است، به‌طوری‌که در گلابی رقم ویلیامز استفاده از ۰/۷۵ میلی‌گرم در لیتر BA برای تولید شاخساره مناسب گزارش شده است (Moretti *et al.*, 1991) و این میزان در گونهٔ کالریانا[2]، ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر بوده است (Berardi *et al.*, 1992). این در حالی است که برای ریزازدیادی گلابی‌های آسیایی[3] میزان ۱ میلی‌گرم در لیتر BA مناسب گزارش شده است (Roozban *et al.*, 2002). در گونه‌های دیگر مانند بتولیفولیا[4] غلظت‌های بیشتری از BA موردنیاز بوده است و بنا بر نتایج در غلظت ۱/۶ میلی‌گرم در لیتر این نوع سایتوکینین، پرآوری بهتری ناشی شده است (Denisy *et al.*, 1999). در گلابی‌های ایتالیایی نیز مانند اسپادونا[5] و ژنوتیپ‌های وحشی ISF54 و ISF61 از غلظت ۱/۸ میلی‌گرم در لیتر BA استفاده شده است (Caboni *et al.*, 2002). این میزان در گونهٔ گلابی‌های آسیایی افزایش بیشتری یافته و به ۲/۵ میلی‌گرم در لیتر رسیده است (Kadota & Niimi, 2003).

بررسی عمومی ذخایر توارثی (ژرم‌پلاسم) گلابی بومی کشور بیانگر وجود برخی ژنوتیپ‌ها و یا گونه‌های متحمل به تنش‌های محیطی مانند تنش خشکی در

1. *P. communis*
2. *P. calleryana*
3. *P. serotina*
4. *P. betulifolia*
5. Spadona

www.SID.ir

Archive of SID

مناطق مختلف است که مجموع موارد بالا لزوم نگاهی عمیق‌تر، به گزینش پایه‌های پر رشد متحمل‌تر به شرایط خاکی کشور را ضروری می‌سازد. ضرورت استفاده از پایه‌های پر رشد به دلیل ویژگی‌های ژنتیک مطلوبی که دارند، در برنامه‌های اصلاح رقم‌ها و گزینش پایه‌های مناسب با توجه به شرایط اقلیمی هر منطقه، شایان‌توجه است. به‌رغم وجود گزارش‌های چندی در مورد افزایش درون شیشه‌ای رقم‌های مختلف گلابی، تاکنون بررسی جامعی در مورد بهینه‌سازی کشت بافت رقم‌های پر رشد صورت نگرفته است. لذا این پژوهش با هدف تعیین روش مناسب برای ازدیاد درون شیشه‌ای چهارپایهٔ پر رشد گلابی شامل کنجونی، بتولیفولیا، Gh1 و درگزی اجرا شد.

مواد و روش‌ها

به منظور اجرای این پژوهش از ریزنمونه‌های پایه‌های پر رشد گلابی شامل کنجونی (*P. communis* × *P. ussuriensis*)، *P. betulifolia*، Gh1 (*P. communis*) و درگزی (*P. ussuriensis* × *P. communis* cv. Dargazi)، به‌صورت رشد یافته در شرایط درون شیشه‌ای و از بخش تحقیقات باغبانی مؤسسهٔ تحقیقات اصلاح و تهیهٔ نهال و بذر کرج، استفاده شد. این پژوهش در قالب سه آزمایش جداگانه انجام شد.

آزمایش اول: استقرار ریزنمونه‌ها

در این آزمایش، ریزازدیای پایه‌های یادشده در سه محیط کشت پایه شامل محیط MS[1] (Murashige & Skoog, 1962)، محیط QL[2] (Quoirin & Lepoivre, 1977) و محیط QL تغییریافته (Leblay *et al.*, 1991) شامل ۱ میلی‌گرم در لیتر BAP[3] و ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر NAA[4] برای همهٔ محیط‌ها بررسی شد. pH محیط کشت پیش از انجام اتوکلاو در ۵/۷±۰/۱ تنظیم و زمان ضدعفونی محیط کشت بیست دقیقه در فشار ۱/۲ اتمسفر و دمای ۱۲۱ درجهٔ سلسیوس در نظر گرفته شد. سه الی چهار روز پس از اتوکلاو کردن و حصول اطمینان از نبود آلودگی، کشت ریزنمونه‌های موردنظر (جوانه‌های جانبی ناشی از مرحلهٔ استقرار) انجام شد. ریزنمونه‌ها در اتاق رشدی با شدت نور ۴۰ میکرومول بر مترمربع در ثانیه و با دورهٔ نوری (فتوپریود) شانزده ساعت روشنایی و در دمایی معادل ۱±۲۵ درجهٔ سلسیوس برای روز و ۱±۲۲ درجهٔ سلسیوس برای شب، قرار داده شدند. این آزمایش به‌صورت فاکتوریل و در قالب طرح کامل تصادفی با عامل رقم در چهار سطح و نوع محیط کشت در سه سطح به صورتی که هر تیمار پنج تکرار و هر تکرار سه ریزنمونه داشت به اجرا درآمد. محیط کشت پایهٔ گزینش‌شده در انتهای این آزمایش برای انجام آزمایش‌های بعدی، استفاده شد.

آزمایش دوم: بررسی پرآوری

در این آزمایش، میزان پرآوری ریزنمونه‌های چهارپایهٔ پر رشد گلابی در محیط کشت QL در غلظت‌های مختلف دو نوع سایتوکنین شامل BAP و 2ip[5] بررسی شد. عامل‌های بررسی‌شده در این آزمایش شامل چهارپایهٔ پر رشد گلابی، سایتوکینین BAP با غلظت‌های ۱ و ۲ میلی‌گرم در لیتر و سایتوکینین 2ip با غلظت‌های ۰، ۱ و ۲ میلی‌گرم در لیتر بودند و آزمایش به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح کامل تصادفی اجرا شد. از نوک شاخساره‌های رشد یافته از آزمایش اول به عنوان ریزنمونه استفاده شد. در هر تیمار پنج تکرار و در هر تکرار سه ریزنمونه قرار داده شد. در یک دورهٔ زمانی ۴۵ روزه و در فاصله‌های زمانی هر پانزده روز برخی از مؤلفه‌های رشد شامل شمار ریز شاخه، طول ریز شاخه و شمار برگ در تیمارهای مختلف، یادداشت‌برداری شد.

آزمایش سوم: بررسی ریشه‌زایی

در این آزمایش، به منظور تعیین قدرت ریشه‌زایی پایه‌ها و همچنین بهبود شرایط ریشه‌زایی، ریز قلمه‌های رشد یافته با طول تقریبی ۳ تا ۴ سانتی‌متر روی محیط QL حاوی IBA ، به مدت هشت تا ده روز

1. Murashig and Skoog
2. Quoirin and Lepoivre
3. Benzyl amino purine
4. Naphthaleneacetic acid
5. 2-Isopentyladenine

www.SID.ir

Archive of SID

در تاریکی مطلق و سپس به دو شرایط محیطی مختلف شامل آگار و پرلیت که بدون تنظیم‌کنندهٔ رشد بودند، منتقل شدند. این آزمایش به‌صورت فاکتوریل و در قالب طرح کامل تصادفی با چهار تکرار و در هر تکرار سه ریز قلمه انجام شد. عامل‌های موردبررسی در این آزمون پایه‌های پر رشد گلابی در چهار سطح به عنوان عامل اول، سایتوکینین IBA در دو سطح (۱ و ۲ میلی‌گرم در لیتر) به عنوان عامل دوم و نوع محیط به دو صورت آگار و پرلیت به عنوان عامل سوم مدنظر قرارگرفته شدند. در این آزمون برخی صفات رشد شامل طول ریشه، میانگین شمار ریشه به ازا هر ریز قلمه و همچنین درصد ریشه‌زایی، پس از ۴۵ روز از انجام زیر کشت، یادداشت‌برداری شد. تجزیه‌وتحلیل آماری داده‌های سه آزمایش با استفاده از نرم‌افزار SAS و مقایسهٔ میانگین‌ها با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن انجام شد.

نتایج و بحث

آزمایش اول: استقرار ریزنمونه‌ها

نتایج تجزیهٔ واریانس داده‌های ناشی از آزمایش اول نشان داد، تفاوت معناداری در شاخص‌های طول ریز شاخه، شمار ریز شاخه و شمار برگ‌های تولیدشده بین پایه‌ها و محیط‌های کشت مورداستفاده وجود دارد (جدول ۱). پایهٔ بتولیفولیا نسبت به دیگر پایه‌ها قدرت باززایی بیشتری داشت و افزون بر تولید ریز شاخه، برگ‌های بیشتری (جوانه‌های فرعی) را نیز تولید کرد. در برابر پایهٔ درگزی به عنوان کند رشدترین پایه و با کمترین میزان باززایی شناخته شد (شکل ۱).

جدول ۱. تجزیهٔ واریانس صفات ارزیابی‌شدهٔ پایه‌های گلابی در محیط‌های کشت مختلف

Table 1. Variance analysis of measured traits for pear rootstock in different media culture

SOV	df	Mean of Squares		
		Shootlet number	Shootlet length (cm)	Leaf number
Rootstock	3	8.78**	5.23**	40.26**
Medium	2	15.47**	0.73**	20.78*
Rootstock × Medium	6	3.63**	0.27^{ns}	20.96**
Erorre	48	0.91	0.13	5.49
CV (%)	-	14.77	9.65	10.83

** و *: معنادار بر پایه آزمون دانکن به ترتیب در سطوح ۰/۰۱ > P و ۰/۰۵ > P؛ ns: عدم اختلاف معنادار.

** p<0.01, * p<0.05 (According to the Duncan`s multiple range test); ns: non significance.

در بین محیط‌های کشت موردبررسی، میزان باززایی نمونه‌های بررسی‌شده در محیط QL بهتر بود و میانگین طول شاخساره ریزنمونه در این محیط کشت افزایش یافت و به دنبال آن شمار برگ‌های بیشتری نیز در ریزنمونه‌ها مشاهده شد. مهم‌ترین تفاوت الگوی رشدی ریزنمونه‌های پایه‌های مختلف در محیط MS نسبت به محیط QL، تولید ریز شاخهٔ بیشتر در محیط QL بود درحالی‌که در محیط کشت MS ریز شاخه‌های کمتری تولید شد، اما برگ‌ها توسعه‌یافته‌تر بودند (شکل ۱و ۲). الگوهای رشدی متفاوتی که ریزنمونه‌ها در محیط‌های کشت مختلف نشان داده‌اند، به دلیل اثر متقابل و رابطه‌ای است که بین نوع محیط کشت و ژنوتیپ وجود دارد (Bell *et al.*, 2012; Leblay *et al.*, 1991). تفاوت اصلی محیط‌های کشت مورداستفاده در این پژوهش در میزان یون‌های نیترات و آمونیوم است. در محیط کشت MS بیشترین میزان یون‌های یادشده وجود دارد که به نظر می‌رسد غلظت زیاد این یون‌ها، یکی از علل نبود باززایی مناسب در این محیط است. نتایج برخی پژوهش‌ها نشان داد استقرار ریزنمونه‌های گلابی با استفاده از محیط کشت MS با نیمی از غلظت‌های نمک‌های پرمصرف کارایی بهتری دارد (Baviera *et al.*, 1989). گزارش شده است به منظور بهبود ویژگی‌های رویشی ریزنمونه‌های گلابی استفاده از محیط کشت MS با نیمی از غلظت عناصر پرمصرف (ماکرو) نسبت به محیط MS کامل، برتری دارد (Nosrati *et al.*, 2009). در ریزازدیادی رقم درگزی نیز از محیط کشت MS با نصف غلظت نمک‌های پرمصرف و کم‌مصرف استفاده شده است (Javadi *et al.*, 2013). همچنین برخی دورگ‌های گلابی در محیط QL عملکرد مطلوب‌تری نسبت به محیط MS دارند (Previati *et al.*, 2002)، که با نتایج این آزمون همخوانی دارد.

www.SID.ir

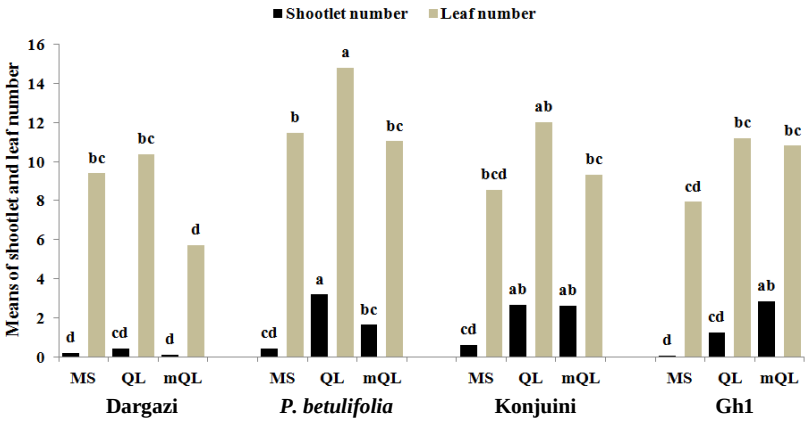
Archive of SID

محیط‌های کشت QL تغییریافته و MS میزان یکسانی از یون نیترات دارند. بر خلاف انتظار، رفتار رشدی ریزنمونه‌ها در این دو محیط، همانند هم نبوده و باززایی ریزنمونه‌ها در محیط QL تغییریافته، بسیار همانند محیط QL بود. متفاوت بودن نسبت آمونیوم به نیترات در محیط‌های کشت QL تغییریافته و QL می‌تواند یکی از علل بروز این رفتار باشد. نسبت آمونیوم به نیترات در محیط MS، ۱ به ۱ و این نسبت در محیط QL تغییریافته، ۱ به ۲/۸ و در محیط QL، ۱ به ۲/۵ است. در آزمایش‌هایی که درزمینهٔ باززایی رقم‌های گلابی صورت گرفته است، نیز مشخص شد، تعادل بین NH_4^+ و NO_3^- در باززایی ریزنمونه‌های گلابی اروپایی مؤثر بوده و باززایی بهینه در محیطی با نسبت ۱ به ۳ این یون‌ها ناشی شد (Leblay *et al.*, 1991). بین دو محیط QL تغییریافته و QL تفاوت‌های در میزان یون کلسیم وجود دارد به‌طوری‌که در محیط QL تغییریافته میزان کلسیم بیشتر به‌اندازهٔ نزدیک به دو برابر محیط QL وجود دارد. به نظر می‌رسد درخت گلابی نیاز چندانی به کلسیم ندارد (Dehghani *et al.*, 2011) و جذب آن در شرایط درون شیشه‌ای نیز ناچیز است و در نتیجه تفاوت در میزان یون کلسیم نمی‌تواند سبب بروز اختلاف زیادی در میزان باززایی ریزنمونه‌ها در این دو محیط شود.

اثر متقابل پایه و نوع محیط کشت در صفات شمار ریز شاخه و برگ معنادار شد و بنابراین پایه‌های درگزی، کنجونی و بتولیفولیا در محیط QL و پایهٔ Gh1 در محیط QL تغییریافته باززایی بهتری را نشان دادند (شکل‌های ۱ و ۲). در دیگر پژوهش‌ها نیز نتایج نشان داد که محیط QL تغییریافته، باززایی بهتری نسبت به محیط‌های MS و QL دارد (Abdollahi *et al.*, 2005; Khodaei-Chegeni *et al.*, 2011). نتایج این گزارش‌ها قابل انطباق با نتایج این پژوهش در مورد پایهٔ Gh1 همخوانی داشت.

آزمایش دوم: بررسی پرآوری

بنا بر نتایج به‌دست‌آمده از تجزیهٔ واریانس داده‌های ناشی از آزمایش دوم، در بین پایه‌های موردبررسی از نظر شمار و طول ریز شاخه و همچنین شمار برگ، تفاوت معناداری مشاهده شد (جدول ۲). پایهٔ Gh1 بیشترین میزان شمار ریز شاخه را تولید کرد (جدول ۳)، لیکن پایهٔ بتولیفولیا با تولید بیشترین شمار برگ (جوانهٔ فرعی)، قدرت پرآوری بیشتری را نشان داد. در بین غلظت‌های متفاوت دو نوع سایتوکینین استفاده‌شده، تنها در شاخص میانگین شمار ریز شاخه تفاوت معنادار در سطح ۵ درصد مشاهده شد که بر پایهٔ آن استفاده از غلظت ۱ میلی‌گرم در لیتر BAP و بدون حضور 2ip نسبت به دیگر ترکیب‌ها برتری داشت. همچنین تأثیر سوء افزایش غلظت 2ip در غلظت ۱ میلی‌گرم در لیتر BAP مشاهده شد. در پایهٔ کنجونی، کیفیت ظاهری ریز شاخه‌ها در غلظت ۲ میلی‌گرم در لیتر BAP کاهش یافت و موجب تغییرات ریختی مانند ریز شدن برگ‌ها و گوشتی و ضخیم شدن ساقه‌ها شد (شکل ۳).



شکل ۱. اثر متقابل پایه و محیط کشت بر میانگین شمار ریزشاخه و شمار برگ.

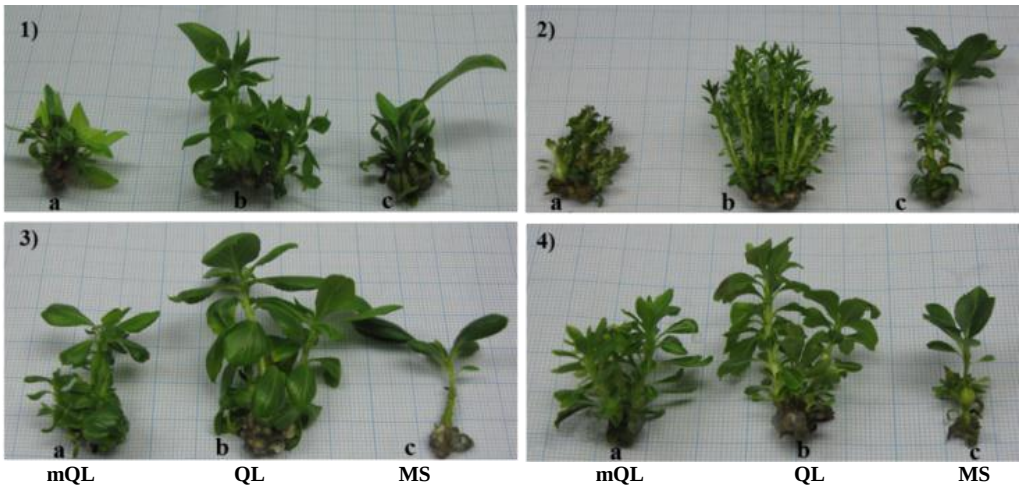
(میانگین‌های دارای حروف همسان برای هر صفت، تفاوت معناداری در سطح ۵ درصد با استفاده از آزمون دانکن ندارند.)

Figure 1. The interaction effect of rootstock and media on mean number of shootlet and leaf.

(Mean values followed by the same letter in each traits are not significantly different at $P \leq 0.05$ by Duncan's multiple range test.)

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۲. میزان پرآوری در چهار پایهٔ گلابی: درگزی (۱)، *P. betulifolia* (۲)، کنجونی (۳) و Gh1 (۴) در سه محیط کشت (a) mQL، (b) QL و (c) MS.

Figure 2. The amount of proliferatron in four pear rootstock: Dargazi (1), *P. betulifolia* (2), Konjuni (3) and Gh1 (4) in three medium culture: mQL (a), QL (b) and MS (c).

جدول ۲. تجزیهٔ واریانس صفات ارزیابی‌شدهٔ پایه‌های گلابی با استفاده از تیمار سایتوکینین

Table 2. Variance analysis of measured traits for pear rootstocks using cytokinin treatment

SOV	df	Mean of Squares		
		Shootlet number	Shootlet length (cm)	Leaf number
Rootstock	3	63.53**	1.75**	149.17**
BAP	1	21.61*	1.42^{ns}	4.4^{ns}
2ip	2	18.76*	0.72^{ns}	13.14^{ns}
BAP × 2ip	2	8.93^{ns}	0.7^{ns}	5.93^{ns}
Rootstock × BAP	3	9.31^{ns}	1.71**	0.64^{ns}
Rootstock × 2ip	6	9.35^{ns}	0.67^{ns}	5.15^{ns}
Rootstock × BAP × 2ip	6	7.18^{ns}	0.33^{ns}	8.98^{ns}
Error	96	5.62	0.44	6.79
CV (%)	-	14.71	9.80	9.92

** و *: معنادار بر پایه آزمون دانکن به ترتیب در سطوح ۰/۰۱ > P و ۰/۰۵ > P؛ ns: عدم اختلاف معنادار.

** p<0.01, * p<0.05 (According to the Duncan`s multiple range test); ns: non significance.

گزارش شده است در گلابی‌های ژاپنی، غلظت ۲/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP، پرآوری بهتری را ایجاد می‌کند (Kadota & Niimi, 2003). همچنین در گزارش‌های دیگر در گلابی‌های ژاپنی، محیط کشت WPM[1] حاوی ۲ میلی‌گرم در لیتر BAP، بیشترین پرآوری مشاهده شده است (Roozban *et al.*, 2002). به‌احتمال تفاوت در رقم و همچنین نوع محیط کشت به‌کاررفته می‌توانند از دلایل مغایرت با نتایج این پژوهش باشند. در بررسی کشت بافت رقم‌های گلابی، غلظت ۱ میلی‌گرم در لیتر BAP به عنوان بهترین غلظت برای پرآوری ریزنمونه‌ها، گزارش‌شده که نتایج این پژوهش با نتایج آن‌ها همخوانی دارد (Abdollahi *et al.*, 2005). این مسئله بیانگر آن است که گلابی‌های آسیایی در مقایسه با گلابی‌های اروپایی به BAP بیشتری نیاز دارند. افزون بر تفاوت در رقم‌های موردبررسی، نوع ریزنمونهٔ به‌کاررفته و پیش‌تیمارهای انجام‌شده روی ریزنمونه‌ها پیش از ازدیاد درون شیشه‌ای و همچنین شرایط نوری اعمال‌شده و نوع کربوهیدرات به‌کاررفته، می‌توانند از علل بروز تفاوت‌های حاصله باشند.

در این رابطه برخی پژوهشگران گزارش کردند منابع مختلف کربوهیدرات موجود در محیط‌های کشت پایه بر میزان پرآوری گلابی‌های ژاپنی مؤثر است (Kadota *et al.*, 2001). در محیط‌های کشت پایه، ساکاروز به عنوان مهم‌ترین منبع تأمین‌کنندهٔ کربن است که با غلظت ۲ تا ۵ درصد استفاده می‌شود و پس‌ازآن گلوکز قرار دارد. بااین‌حال از دیگر منابع تأمین‌کنندهٔ کربن مانند لاکتوز، گالاکتوز، مالتوز و

1. Woody plant medium

www.SID.ir

Archive of SID

نشاسته استفاده می‌شود اما کاربرد و تأثیر آن‌ها کمتر از ساکاروز و یا گلوکز است (Vinterhalter & Vinterhalter, 1997). در پژوهشی، مشخص شد استفاده از ساکاروز و گلوکز در محیط کشت به عنوان منبع کربوهیدرات در گلابی *P. glabra* نسبت به فرکتوز کارایی بهتری در باززایی ریزنمونه‌ها داشته است (saadat *et al.*, 2012). در گلابی رقم درگزی، استفاده از بخش‌های میانی و پایینی برگ در مقایسه با نوک برگ مؤثرتر بوده است (Javadi *et al.*, 2013). با تأمین نور قرمز در شرایط محیطی پرورش درون شیشه‌ای پایه‌های M9 سیب، غالبیت انتهایی در ریزنمونه‌ها کاهش و به تبع پرآوری افزایش یافته است (Muleo *et al.*, 2001).

آزمایش سوم: بررسی ریشه‌زایی

نتایج تجزیهٔ واریانس به‌دست‌آمده از داده‌های مربوط به ریشه‌زایی چهارپایهٔ گلابی با استفاده از هورمون IBA و دو محیط آگار و پرلایت نشان داد بین غلظت‌های مختلف IBA در صفاتی مانند طول ریشه و درصد ریشه‌زایی اختلاف معناداری وجود نداشت (جدول ۴).

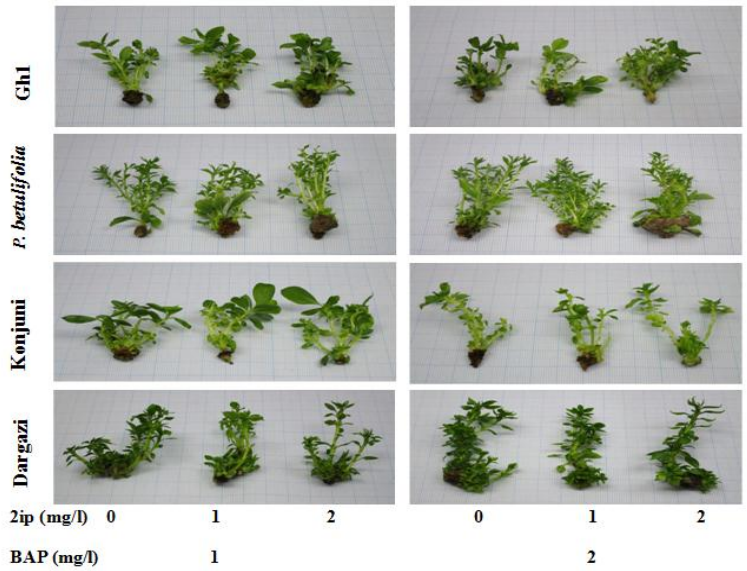
جدول ۳. مقایسهٔ میانگین تأثیر سایتوکینین‌های BAP و 2ip بر مؤلفه‌های رشد پایه‌های گلابی در شرایط درون شیشه‌ای

Table 3. Mean comparison of cytokinin effects (BAP and 2ip) on growth parameters of pear rootstocks in *in vitro* conditions

Pear rootstock	Cytokinin	Concentration	Shootlet number	Shootlet length (cm)	Leaf number
Konjuni	BAP	1	4.52[a]	2.57[a]	10.32[b]
		2	2.78[b]	3[a]	11.13[b]
	2ip	0	3.06[b]	2.84[a]	11.17[b]
		1	4.63[a]	2.7[a]	11.64[b]
		2	3.26b	2.8[a]	9.36[b]
Gh1	BAP	1	6[a]	2.83[a]	11.6[b]
		2	5.75[a]	2.65[a]	11.92[b]
	2ip	0	6.63[a]	2.49[ab]	10.95[b]
		1	6.7[a]	2.72[a]	12.26[b]
		2	4.3[a]	3.03[a]	12.08[b]
Dargazi	BAP	1	5.96[a]	2.97[a]	15.67[a]
		2	4.14[a]	2.54[ab]	15.93[a]
	2ip	0	5.88[a]	2.38[b]	14.88[a]
		1	5.81[a]	2.98[a]	16.46[a]
		2	3.46b	2.9[a]	16.07[a]
P. betulifolia	BAP	1	2.39[b]	3.59[a]	10.87[b]
		2	2.82[b]	2.9[a]	12.01[b]
	2ip	0	2.50[b]	3.21[a]	11.63[b]
		1	2.23[b]	3.57[a]	12.5[b]
		2	3.09[b]	2.95[a]	11.7[b]

حروف مشترک در هر ستون بیانگر نبود اختلاف معنادار میانگین‌ها بر پایهٔ آزمون دانکن (P < ۰/۰۵) است.

Means within a column followed by the same letter are not significantly different at p<0.05 according to the Duncan`s test.



شکل ۳. تأثیر تیمار سایتوکینین بر رشد و نمو چهار پایهٔ گلابی در شرایط درون شیشه‌ای

Figure 3. Effect of cytokinin treatments on growth and development of four pear rootstocks in *in vitro* condition.

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۴. تجزیهٔ واریانس ریشه‌زایی پایه‌های گلابی در شرایط محیطی آگار و پرلیت با استفاده از غلظت‌های مختلفIBA

Table 4. Variance analysis of rooting of pear rootstocks in medium culture of agar and perlite using different concentration of IBA

SOV	df	Mean of Squares		
		Root number	Root length (cm)	Rooting (%)
Rootstock	3	3.16**	0.36**	22.92**
Medium	1	1.06**	1.51**	29.61**
IBA	1	2.90**	0.02ns	0.10ns
Rootstock × Medium	3	4.63**	0.94**	57.40**
Rootstock × IBA	3	3.41**	0.84**	15.25**
Medium × IBA	1	4.59**	0.74**	0.43**
Rootstock × IBA × Medium	3	5.51**	0.73**	9.01**
Error	48	0.07	0.02	27.59
CV (%)	-	14.26	12.55	14.09

** و *: معنادار بر پایه آزمون دانکن به ترتیب در سطوح ۰/۰۱ > P و ۰/۰۵ > P؛ ns: عدم اختلاف معنادار.

** p<0.01, * p<0.05 (According to the Duncan`s multiple range test); ns: non significance.

در شرایط محیطی پرلیت به‌احتمال به دلیل وجود خلل و فرج و اکسیژن کافی، بیشترین شمار ریشه به وجود آمد، لیکن در مقایسه با شرایط محیطی آگار، ریشه‌ها طویل نشدند، یکنواختی محیط آگار و نداشتن برخورد با موانع می‌تواند یکی از علل بروز این رفتار باشد (شکل ۴). هر یک از پایه‌های موردبررسی در غلظت‌های متفاوتی از IBA، ریشه‌زایی مناسب‌تری را نشان دادند. در پایهٔ بتولیفولیا تفاوت معناداری بین غلظت‌های ۱ و ۲ میلی‌گرم در لیتر IBA، بر میزان شمار و طول ریشه و همچنین درصد ریشه‌زایی، مشاهده نشد. پایه‌های Gh1 و کنجونی در غلظت ۱ میلی‌گرم در لیتر و پایهٔ درگزی در غلظت ۲ میلی‌گرم در لیتر IBA شمار و طول ریشهٔ بیشتری تولید کردند. احتمال دارد سخت‌ریشه‌زا بودن پایهٔ درگزی نیاز آن را به IBA افزایش داده است. در شرایط محیطی آگار غلظت ۲ میلی‌گرم در لیتر IBA، و در پرلیت غلظت ۱ میلی‌گرم در لیتر آن ریشه‌زایی مناسب‌تری ایجاد کرد. به‌احتمال وجود تخلخل کمتر در محیط آگار نیاز به وجود هورمون اکسین را برای ریشه‌زایی بیشتر می‌کند. درصد ریشه‌زایی در پایه، بتولیفولیا صرف‌نظر از غلظت IBA به شدت به نوع محیط (آگار و پرلیت) بستگی داشت، درحالی‌که در پایهٔ Gh1، غلظت IBA عامل تعیین‌کننده بود.

جدول ۵. مقایسهٔ میانگین تأثیر متقابل پایه، محیط کشت و IBA بر مؤلفه‌های ریشه‌زایی پایه‌های گلابی در شرایط درون شیشه‌ای

Table 5. Mean comparison of interaction effects among rootstock, culture medium and IBA on rooting parameters of pear rootstocks in *in vitro* conditions

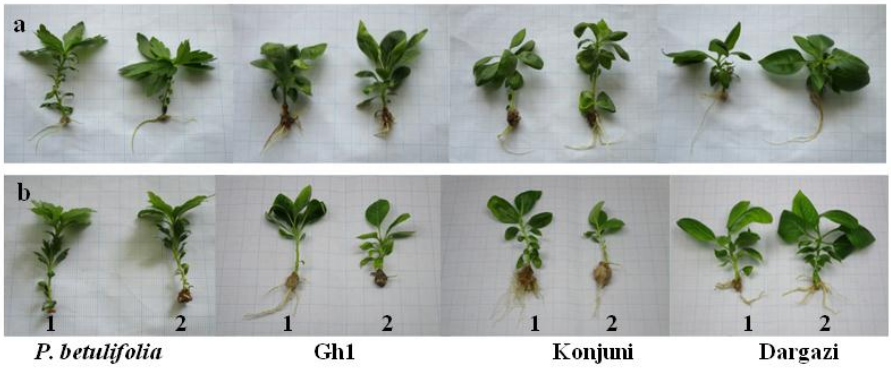
Pear rootstock	Culture medium	IBA (mg/l)	Root number	Root length (cm)	Rooting (%)
Dargazi	Agar	1	1.74efgh	2.58bcd	58.32cd
		2	2.25efg	3.41a	74.99bc
	Perlite	1	1.16fghi	0.2g	25e
		2	4.98c	1.91def	77.25bc
Konjuni	Agar	1	0.66ghi	0.55g	16.66e
		2	2.66ef	2.35bcde	58.33dc
	Perlite	1	21.66a	2.94ab	100a
		2	0.75ghi	0.5g	25e
Gh1	Agar	1	4.66cd	1.56f	100a
		2	3.22de	0.58g	55d
	Perlite	1	10.11b	2.75abc	100a
		2	2.83e	0.37g	62dc
P. betulifolia	Agar	1	3.33de	1.67ef	91.66ab
		2	2.88e	2.18cdef	91.66ab
	Perlite	1	0.08i	0.1g	8e
		2	0.16hi	0.1g	8e

حروف مشترک در هر ستون بیانگر نبود اختلاف معنادار میانگین‌ها بر پایهٔ آزمون دانکن (۰/۰۵ > P) است.

Means within a column followed by the same letter are not significantly different at p<0.05 according to the Duncan`s test.

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۴. تأثیر غلظت‌های مختلف IBA (۱ و ۲ میلی‌گرم در لیتر) در ریشه‌زایی پایه‌های گلابی در دو محیط کشت آگار (a) و پرلیت (b)

Figure 4. Effect of different concentrations of IBA (1 and 2 mg/l) on rooting of pear rootstocks in two culture media agar (a) and perlite (b)

گزارش‌شده در پایهٔ بتولیفولیا غلظت ۲ تا ۶ میلی‌گرم در لیتر IBA نسبت به غلظت‌های پایین‌تر، تحریک ریشه‌زایی را افزایش داده است (Dolcet-Sanjuan *et al.*, 1990). به منظور ریشه‌زایی رقم‌های گلابی اروپایی، از محیط کشتی شامل نصف نمک‌های QL به همراه ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر IBA و ۱ میلی‌گرم در لیتر PVA[1]، استفاده شده است (Sun *et al.*, 2009). محیط کشت MS با نصف عناصر پرمصرف و کم‌مصرف به همراه ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر IBA سبب تحریک ریشه‌زایی در رقم‌های آسان‌ریشه‌زا، مانند کنفرانس شد، اما در رقم‌های سخت‌ریشه‌زا چنین اثری را نداشت (Quoirin & Lepoivre, 1977). در مجموع به نظر می‌رسد که کارایی نوع محیط به‌کاررفته و میزان تنظیم‌کننده‌های رشد، به رقم موردبررسی بستگی داشته باشد. پایه‌های پر رشد گلابی به دلیل تحمل به تنش‌های محیطی و داشتن برخی ویژگی‌های ژنتیک مطلوب در احداث باغ‌ها و برنامه‌های اصلاح پایه‌ها مناسب هستند.

نتیجه‌گیری کلی

نتایج کلی آزمایش‌ها نشان داد به منظور موفقیت در ریزازدیادی پایه‌های کنجونی، بتولیفولیا، درگزی و Gh1، استفاده از محیط کشت QL حاوی ۱ میلی‌گرم در لیتر BAP نسبت به محیط کشت MS و QL تغییریافته مناسب‌تر است. پرآوری ریزنمونه‌ها در محیط کشت QL بیشتر از محیط کشت MS بود. پایه‌های بالا در غلظت ۱ میلی‌گرم در لیتر IBA ریشه‌زایی مناسبی دارند و به منظور دست یافتن به بیشترین ریشه‌زایی استفاده از پرلیت در شرایط درون شیشه‌ای در مقایسه با آگار، قابل توصیه است، لیکن تنها پایهٔ بتولیفولیا در شرایط محیطی آگار ریشه‌زایی مطلوب‌تری نشان داد.

سپاسگزاری

این پژوهش در بخش تحقیقات باغبانی مؤسسهٔ تحقیقات اصلاح و تهیهٔ نهال و بذر کرج انجام شد که بدین‌وسیله نویسندگان مقاله از مدیریت آن بخش کمال تشکر را دارند.

REFERENCES

1. Abdollahi, H., Muleo, R., & Rugini, E. (2005). Study of basal growth media, growth regulators and pectin effects on micropropagation of pear (*Pyrus communis* L.) cultivars**.** *Seed and Plant*, 21, 373-384. (in Farsi)
2. Baviera, J. A., Garcia, J. L. & Ibarra, M. (1989). Commercial *in vitro* micropropagation of pear cv. Conference. Acta Horticulturae, 256, 63-68.
3. Bell, R. L., Quamme, H. A., Layne, R. E. C. & Skirvin, R. M. (1996). Pears. In: Janick, J. & Moore, J.N. (Eds.), *Fruit breeding I, Tree and Tropical Fruits*. John Wiley & Sons. pp. 441-514.
4. Bell, R. L., Scorza, R. & Lomberk, D. (2012). Adventitious shoot regeneration of pear (*Pyrus* spp.) genotypes. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 108, 229-236.

1. Polyvinyl alcohol

www.SID.ir

Archive of SID

5. Berardi, G., Infante, R. & Neri, D. (1992). Micropropagation of *Pyrus calleryana* Dcn. From seedlings. *Scientia Horticulturae*, 53, 157-165.
6. Caboni, E., Angeli, S. D., Chiappetta, A., Innocenti, A. M., Van Onckelen, H. & Damiano, C. (2002). Adventitious shoot regeneration from vegetative shoot apices in pear and putative role of cytokinin accumulation in the morphogenetic process. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 70, 199-206.
7. Dehghani, B., Arzani, K., & Malakouti, M. J. (2011). Fruit mineral removal rates from Asian pear (*Pyrus serotina* Rehd) orchards.*7th Congress of Iranian Horticultural Science* (Abstract). (in Farsi)
8. Denisy, Y., Yeo, B. & Reed, M. (1999). Micro-propagation of *Pyrus* rootstocks. *HortScience*, 30, 620-623.
9. Dolcet-Sanjuan, R., Mok, D. W. & Mok, M. C. (1990). Micropropagation of *Pyrus* and *Cydonia* and their responses to Fe-limiting conditions. *Plant cell, tissue and organ culture*, 21, 191-199.
10. Jackson, D., Looney, N. E., & Morley-Bunker, M. (2011). *Temperate and subtropical fruit production*. CABI. pp. 1-311.
11. Janick, J. (2002). The pear in history, literature, popular culture, and art. *Acta Horticulturae*, 596, 41-42.
12. Javadi, S., Kermani, M., Irian, S. & Majd, A. (2013). Indirect regeneration from *in vitro* grown leaves of three pear cultivars and determination of ploidy level in regenerated shoots by flow cytometry. *Scientia Horticulturae*, 164, 455-460.
13. Kadota, M. & 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.
14. Kadota, M., Imizu, K. & Hirano, T. (2001). Double-phase *in vitro* culture using sorbitol increases shoot proliferation and reduces hyperhydricity in Japanese pear. *Scientia Horticulturae*, 89, 207-215.
15. Khodaei-Chegeni, F., Abdollahi. H., Ershadi, A. & Asnaashari, M. (2011). Determination of micro-propagation protocol for OH × F333 and OH × F69 pear clonal rootstocks. Seed and Plant, 27, 297-312. (in Farsi)
16. Leblay, C., Chevreau, E. & Robin, L.M. (1991). Adventitious shoot regeneration from in vitro leaves of several pear cultivars (*Pyrus communis* L.). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 25, 99-105.
17. Moretti, C., Scozzoli, A., Passini, D. & Pagannelli, F. (1991). *In vitro* propagation of pear cultivars. *Acta Horticulturae*, 300, 115-122.
18. Muleo, R., Morini, S. & Casano, S. (2001). Photoregulation of growth and branching of plum shoots physiological action of two photosystems. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 37, 609-617.
19. Murashige, T. & Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15, 473-497.
20. Nosrati, S. Z., Zamani, Z. & Babalar, M. (2009). Micropropagation of four cultivars (Dargazi, Natanzi, Shahmiveh and Williams) of pear (*Pyrus communis* L.). *Iranian Journal of Horticultural Science*, 40, 83-91. (in Farsi)
21. Previati, A., Darei, F., Bassi, D., Tagliavini, M. & Marangoni, B. (2002). Development of protocols for *in vitro* propagation of advanced selections of *Pyrus communis* rootstocks 69BIS. *Acta Horticulturae*, 596, 505-508.
22. Quoirin, M. & Lepoivre, P. (1977). Improved medium for *in vitro* culture of *Prunus* sp. *Acta Horticulturae*, 78, 437-442.
23. Roozban, M. R., Arzani, K., & Moieni, A. (2002). Study on *in vitro* propagation of some Asian pear (*Pyrus serotina* Rehd.) cultivars. *Seed and Plant*, 18, 348-361. (in Farsi)
24. Saadat, Y. A., Rasti, O. & Zamani, J. (2012). Effects of different growth regulators, nutrient media, gelling agents and carbohydrate sources on shoot multiplication of *Pyrus glabra* Boiss. Iranian *Journal of Rangelands and Forests Plant Breeding and Genetic Research*, 20, 83-96. (in Farsi)
25. Sabeti, H. (1994). *Trees and Shrubs of Iran*. Yazd University Publications. (in Farsi)
26. Sedlak, J. & Paprstein, F. (2008). *In vitro* shoot proliferation of sweet cherry cultivars Karesova and Rivan. *Hortscince*, 35, 95-98.
27. Singha, S., Oberly, G. H. & Townsend, E. C. (1987). Changes in nutrient composition and pH of the culture medium during in vitro shoot proliferation of crabapple and pear. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 11, 209-220.
28. Sun, Q., Sun, H., Bell, R.L. & Xin, L. (2009). Effect of polyvinyl alcohol on in vitro rooting capacity of shoots in pear clones (*Pyrus communis* L.) of different ploidy. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 99, 299-304.
29. Vinterhalter, D. & Vinterhalter, B.S. (1997). Micropropagation of Dracaena sp. In: Bajaj Y. P. S. (Eds.), *Biotechnology in agriculture and forestry 40, High-tech. and Micropropagation VI.* Berlin, Heidelberg, Springer, pp. 131-146.

www.SID.ir

Archive of SID

Iranian Journal of Horticultural Science, Vol. 47, No. 2, Summer 2016

Optimization of *in vitro* micropropagation protocol for some vigorous rootstocks of pear

Masumeh Mansouryar[1], Javad Erfani-Moghadam[2*], Hamid Abdollahi[3] and Seyed Alireza Salami[4]
1, 2. Former M.Sc. Student and Assistant Professor, Faculty of Agriculture, Ilam University, Iran
3. Associate Professor, Seed and Plant Improvement Institute, Karaj, Iran
4. Assistant Professor, University College of Agriculture & Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran
(Received: Dec. 14, 2015 - Accepted: Feb. 6, 2016)

ABSTRACT

In order to micropropagate of four vigorous rootstocks of pear, including *Pyrus betulifolia*, Konjuni, Dargazi and Gh1, effects of basic plant culture media (MS, QL and modified QL), cytokinins and auxins on productivity, proliferation and rooting were studied in Seed and Plant Improvement Institute, Karaj. The highest amount of productivity for all rootstocks was observed in QL medium. Among pear rootstocks, Gh1 rootstock in both QL and modified QL mediums showed proper growth. Results of proliferation (BAP with 1 and 2 mg/l and 2ip at 0, 1 and 2 mg/l) illustrated that the highest amount of proliferation was achieved with 1 mg/l BAP, while adding 2ip into medium had no significant influence on proliferation rate. In addition, maximum rooting percentage was obtained by IBA at 1 mg/l. Also, evaluation of rooting percentage in both culture media containing agar and perlite proved that the highest rooting of all rootstocks (except *P. betulifolia*) was achieved in culture medium containing perlite. In general, to succeed micropropagation of aforementioned rootstocks, utilizing QL culture medium containing BAP (1 mg/l) is recommended for optimal proliferation and treatment of IBA (1 mg/l) in perlite is suitable for proper rooting.

Keywords: Auxin, cytokinin, pear, proliferation, rooting.

* Corresponding author E-mail: J.erfani@ilam.ac.ir Tel: +98 841 2227029

www.SID.ir