نشریه علوم باغبانی (علوم و صنایع کشاورزی)
جلد ۳۲، شماره ۴، زمستان ۱۳۹۷، ص. ۶۶۴-۶۵۵
شاپا: ۴۷۳۰-۲۰۰۸

Journal of Horticultural Science
Vol. 32, No. 4, Winter 2019, p.655-664
ISSN: 2008 - 4730

پرآوری درون شیشه‌ای، ریشه‌زایی و افزایش سازگاری گیاهچه‌های گلابی نطنزی (*Pyrus communis* cv. Natanzi) به کمک قارچ مایکوریزا

عظیمه حاجی صادقیان نجف‌آبادی[۱]- ایمان روح اللهی[۲]*

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۰۴/۰۶
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۰۸/۲۷

چکیده

گلابی نطنزی از ارقام مهم گلابی بومی ایران است. ریزازدیادی امکان تولید گیاهچه‌های یکسان و مشابه گیاه مادری را فراهم خواهد نمود. پژوهش حاضر طی سه آزمایش برای شاخه‌زایی و ریشه‌زایی درون شیشه‌ای و سازگاری ریزنمونه‌ها با محیط بر اساس آزمون فاکتوریل در قالب طرح پایه کاملاً تصادفی انجام شد. جهت تحریک شاخه‌زایی محیط موراشیگ و اسکوگ تحت تأثیر چهار سطح از تنظیم کننده‌های رشد بنزیل آمینو پورین[۳]، ایندول ۳-بوتیریک اسید[۴] IBA، همچنین جیبرلیک اسید[۵] مورد استفاده قرار گرفت. گیاهچه‌ها در محیط MS و MS با نصف غلظت عناصر ماکرو و میکرو، در حضور چهار سطح از اکسین‌های IBA و نفتالین استیک اسید[۶] تحت دو تیمار تاریکی و روشنایی ریشه‌دار شدند. سازگاری و بقاء، درصد کلونیزاسیون میکوریزا، غلظت فسفر و برخی خصوصیت های مورفولوژیکی ریشه از قبیل میانگین قطر و تعداد ریشه گیاهچه‌ها به کمک دو گونه قارچ مایکوریزا *G. intraradices* و *Glomus mosseae* در دو بستر پیت‌ماس- پرلیت و کوکوپیت- پرلیت مورد آزمون قرار گرفت. بیشترین شاخه‌زایی در برهم‌کنش بین غلظت سه میلی‌گرم در لیتر BAP به همراه نیم میلی‌گرم در لیتر IBA و بیش‌ترین درصد ریشه‌زایی در تیمار محیط MS کامل حاوی نیم میلی‌گرم در لیتر NAA مشاهده گردید. ۱۰۰ درصد گیاهچه‌های ریشه‌دار شده با محیط سازگار شدند. غلظت فسفر در بستر پیت ماس، میانگین قطر ریشه در حضور قارچ *G. mosseae* در بستر پیت ماس و تعداد ریشه در بستر کوکوپیت افزایش نشان دادند.

واژه‌های کلیدی: ریزازدیادی، سازگاری، قارچ همزیست ریشه، گلابی

مقدمه

خاستگاه گلابی نطنزی[۶] به عنوان یکی از ارقام مهم تجاری با کیفیت و خوش طعم و عطر بومی ایران (۲۲)، روستای طامه از توابع شهرستان نطنز (استان اصفهان) می‌باشد. پیری درختان و کاهش باردهی، افزایش ساخت و سازها در زمین‌های کشاورزی، بی‌توجهی به این ژنوتیپ ارزشمند و روی‌آوری به مشاغل صنعتی از تهدیدات جدی انقراض این درخت بومی می‌باشد. این رقم از گروه گلابی‌های اروپایی[۷] با بافت ترد و آبدار؛ با کیفیت خوراکی خوب و با خاصیت حمل و نقل و انبارداری زیاد می‌باشد که در اواخر پاییز و اوایل زمستان به بازار عرضه می‌گردد (۱۴ و ۲۲). بیشتر درختان میوه به خوبی از طریق بذر تکثیر نمی‌شوند و نمی‌توان آن‌ها را به راحتی از طریق رویشی (روش خوابانیدن و قلمه گرفتن) تکثیر کرد (۱). معمولاً گونه‌های گلابی درختانی سخت‌ریشه‌زا هستند (۹). مهم‌ترین پایه‌های گلابی پایه‌های بذری و اصلاح‌شده بِه، گلابی و گونه‌های دیگرِ سازگار با گلابی می‌باشند (۳۸ و ۱). مهم‌ترین مزیت روش ریزازدیادی سرعت آن نسبت به روش‌های تکثیر سنتی است که در نتیجه می‌توان از یک قطعه کوچک گیاه مادری به تعداد زیادی گیاه مشابه دست یافت. تکثیر از طریق کشت بافت برای گیاهانی که تکثیر رویشی سختی دارند، گیاهان پر محصول یا مقاوم به بیماری‌ها، گیاهانی که تکثیر زایشی باعث کاهش سرعت تکثیر به علت تنوع ژنتیکی شده و همچنین برای جلوگیری از انتقال بیماری‌های گیاهی

۱ و ۲- به‌ترتیب دانشجوی سابق کارشناسی ارشد و استادیار گروه علوم باغبانی، دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه شاهد
(*- نویسنده مسئول: Email: i.rohollahi@shahed.ac.ir)
DOI: 10.22067/jhorts4.v32i4.72622
3- Indole-3-Butyric Acid (IBA)
4- Gibberellic Acid (GA_3)
5- Naphthalene Acetic Acid (NAA)
6- *Pyrus communis* CV. Natanzi
7- *Pyrus communis*

www.SID.ir

Archive of SID

که با روش سنتی تکثیر منتقل می‌شوند را می‌توان پیشنهاد نمود (۱۰). استفاده از روش‌های سنتی تکثیر وقت‌گیر و کم بازده می‌باشد. از این رو بهتر است برای تثبیت صفات زراعی مطلوب، همسان‌سازی و دستیابی به تعداد زیادی گیاه با ساختار ژنتیکی یکسان در مقیاس وسیع از روش کشت بافت استفاده شود که ضمن کاهش هزینه‌های تولید امکان برنامه ریزی از نظر زمان‌بندی و تعداد تولیدات را دارا می‌باشد (۱۰).

محیط کشت موراشیگ و اسکوگ (۲۳) توسط بیش‌تر پژوهشگران در ریزازدیادی گلابی مورد استفاده قرار گرفته است (۳۴ و ۲۸). بیش‌تر پژوهشگرانی که روی گلابی کار کرده‌اند، از سایتوکاینین BAP برای پرآوری استفاده نموده‌اند (۳۴، ۲۸ و ۴).

ریشه‌زایی در شرایط کشت بافت امری وابسته به ژنوتیپ است که برای ریشه‌زایی از اکسین‌ها و غلظت‌های مختلف آن برحسب شرایط متفاوت بافت و محیط استفاده می‌شود (۲۱). استفاده از اکسین‌های NAA، IBA و IAA موجب ریشه‌زایی شاخساره‌های گونه *P. syriaca* در شرایط درون شیشه‌ای می‌شوند (۳۴). اثر مثبت تاریکی در القای ریشه‌زایی سیب و گلابی توسط اکثر محققان مورد مطالعه قرار گرفته است (۳، ۵، ۱۵، ۳۶ و ۳۷). گونه *P. elaegrifolia* در محیط واجد IBA (۱/۵ میلی‌گرم در لیتر) و محیط ½موراشیگ و اسکوگ و تیمار ۱۰ روز تاریکی ۵۴ درصد ریشه‌زایی به همراه داشته است (۲).

از مشکلات تولید گیاهان از طریق ریزازدیادی مرحله سازگاری گیاهچه‌های خارج شده از شرایط درون شیشه است. بقاء کم و رشد ضعیف گیاهچه‌های ریشه‌دار شده در شرایط درون شیشه‌ای پس از انتقال به محیط، استفاده از کشت بافت را محدود می‌کند. عوامل زیستی مانند قارچ‌های همزیست ریشه می‌تواند باعث افزایش موفقیت این روش گردد. قارچ‌های مایکوریزا داخلی قارچ‌هایی از راسته Glomales و شاخه Glomeromycota می‌باشند. این قارچ‌ها یکی از فراوان‌ترین قارچ‌ها در طبیعت هستند و در اکثر گیاهان دیده می‌شوند (۳۲). همه اعضای این شاخه همزیست‌های اجباری گیاهان هستند (۲۵). قارچ‌های مایکوریزا معمولاً جذب عناصرآهن، منگنز، کلسیم، منیزیم، پتاسیم، فسفر و نیتروژن را افزایش می‌دهد و بیشتر از همه باعث افزایش جذب فسفر در گیاه می‌شود (۳۵). تلقیح گیاهان ریزازدیادی در هنگام سازگاری با محیط بیرون باعث افزایش مقاومت گیاه و افزایش جذب عناصر از بستر و بهبود ویژگی‌های تجاری می‌شود (۶ و ۲۰). در پایه‌های هم گروه گلابی (OH×F51)، تحریک رشد و افزایش جذب فسفر، عناصر محلول در آب و مقاومت به تنش‌های هنگام سازگاری در گیاهان تلقیح شده با قارچ *Glomus* spp. نسبت به شاهد گزارش شده است (۳۱). پایه‌های ریزازدیاد شده سیب در طول مرحله سازگاری در بسترهای غنی از مواد غذایی بعد از ۱۱۲ روز از تلقیح ریشه‌ها افزایش رشد را نشان دادند این افزایش رشد همراه با کاهش محتوی فسفر بستر و افزایش شدت کلونیزاسیون قارچ با ریشه بود (۳۱).

در این آزمایش به منظور تسریع تکثیر و دست‌یابی به پروتکل تکثیر و ریشه‌زایی درون شیشه‌ای گلابی نظنزی گونه‌ای منحصر به فرد، در خطر انقراض و بومی ایران بعد از بررسی تأثیر چهار غلظت مختلف هورمون‌های IBA×BAP و GA_3×BAP بر شاخه‌زایی و استفاده از NAA و IBA بر ریشه‌زایی ریزنمونه‌های گلابی نطنزی، تأثیر قارچ همزیست مایکوریزا به عنوان عامل مؤثر جهت بهبود رشد و نمو و توسعه ریشه گیاهان همچنین جذب فسفر و در نهایت افزایش سازگاری و زنده‌مانی گیاهچه‌های کشت بافتی با شرایط برون شیشه مورد ارزیابی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

ریزنمونه‌های گلابی نطنزی از روستای طامه در شهرستان نطنز به ترتیب با عرض و طول جغرافیایی '۲۸°۳۳ و '۵۳ °۵۱ از درختی سالم در همان روز انجام کشت بافت تهیه شدند.

آزمایش اول: شاخه‌زایی

جهت تحریک شاخه‌زایی طی دو آزمایش مستقل بر اساس آزمون فاکتوریل در قالب طرح پایه کاملاً تصادفی برای هر تیمار سه تکرار و در هر تکرار سه ریز نمونه محیط‌های جامد پرآوری MS کامل با غلظت‌های مختلف مواد تنظیم کننده رشد از قرار زیر آماده شد؛ یکی از آزمایش‌ها شامل چهار غلظت فاکتور BAP (صفر، ۱، ۲ و ۳ میلی‌گرم در لیتر) تحت تأثیر چهار غلظت فاکتور GA_3 (صفر، ۰/۱، ۰/۳ و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر) و آزمایش مستقل دیگر نیز از فاکتور BAP با همان غلظت‌ها و چهار غلظت فاکتور IBA (صفر، ۰/۵، ۱ و ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر) استفاده شد. پس از کشت ریزنمونه‌ها در محیط‌های کشت حاوی غلظت‌های مختلف تنظیم کننده‌های رشد به اتاقک رشد با دمای ^{c}۲±۲۴°، رطوبت ۲±۶۰ درصد و دوره نوری ۱۶ ساعت روشنایی با شدت نور سفید ۴۰۰ میکرومول بر مترمربع بر ثانیه منتقل شدند. بعد از شش هفته میزان شاخه‌زایی ثبت گردید.

آزمایش دوم: ریشه‌زایی

در مرحله ریشه‌زایی ابتدا گیاهچه‌ها سه هفته در محیط MS بدون تنظیم کننده‌های رشد کشت شدند. بعد از این مرحله گیاهچه‌ها بر اساس آزمون فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی به محیط جامد ریشه‌زایی انتقال داده شدند. فاکتور اول محیط IBA در چهار غلظت (صفر، ۰/۵، ۱ و ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر) و فاکتور دوم محیط NAA در چهار غلظت (صفر، ۰/۱، ۰/۳ و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر) در دو محیط MS و ½MS انتقال داده شدند. سپس هر تیمار در دو مکان تاریک و

www.SID.ir

Archive of SID

روشن در اتاقک رشد با دمای ۲±۲۴°c، رطوبت ۲±۶۰ درصد و دوره نوری ۱۶ ساعت روشنایی با شدت نور سفید ۴۰۰ میکرومول بر متر مربع بر ثانیه قرار داده شدند. هدف از ایجاد شرایط روشنایی و تاریکی بررسی تأثیر نور بر میزان ریشه‌دهی بود. بعد از گذشت شش هفته درصد گیاهچه‌های ریشه‌دار شده ثبت شد.

آزمایش سوم: سازگاری

در مرحله سازگاری ریزنمونه‌های تولید شده از محیط جامد MS کامل حاوی غلظت سه میلی‌گرم در لیتر BAP به همراه نیم میلی‌گرم در لیتر IBA و سپس ریشه‌دار شده در محیط MS کامل حاوی نیم میلی‌گرم در لیتر NAA از محیط کشت درون شیشه جدا و بعد از شستن تمامی آگار چسبیده به ریشه به محیط خارج از شیشه منتقل شدند. به این منظور از دو بستر پیت‌ماس و پرلیت (۱:۱) و کوکوپیت و پرلیت (۱:۱) استریل شده توسط اتوکلاو به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد با فشار ۱/۲ اتمسفر و لیوان‌های یک‌بار مصرف درپوش‌دار جهت سازگاری گیاهچه‌های ریشه‌دار شده، استفاده شد. تلقیح هر ۵۰ گرم بستر با استفاده از ۱۰ گرم آمیخته خاکی حاوی ۳۰۰ تا ۴۰۰ اسپور قارچ گونه *G. intraradices* و *G. mosseae* یک سانتی‌متر زیر ریشه استفاده شد. گیاهچه‌ها در شرایط کنترل شده نوری، دمایی و رطوبت قرار داده شدند و بعد از مدت هشت هفته گیاهچه‌ها از بستر خارج شدند. ویژگی‌های مورفولوژیکی ریشه گیاهان از قبیل میانگین قطر ریشه (سانتی‌متر)، تعداد ریشه، طول مخصوص ریشه[1] (مجموع طول ریشه‌ها تقسیم بر حجم سیستم ریشه) (سانتی‌متر برسانتی‌متر مکعب)، نسبت عرض به عمق (سانتی‌متر بر سانتی‌متر) توسط نرم‌افزار GiA Roots مورد بررسی قرار گرفت. میزان جذب عنصر فسفر با استفاده از روش رنگ سنجی اندازه‌گیری شد (۱۹). ۲۰ عدد از نوک ریشه‌های دانهال‌های سازگار شده با استفاده از روش تغییر یافته فیلیپس و هایمن (۲۶) رنگ‌آمیزی و درصد کلونیزاسیون ثبت و بین تیمارها مقایسه گردید.

نتایج حاصل از این آزمایش به صورت آزمون فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار در مرحله شاخه زایی با دو آزمایش مستقل IBA×BAP و GA_3×BAP و در مرحله ریشه‌زایی با دو فاکتور IBA و NAA انجام شد. توسط نرم‌افزار SAS تجزیه واریانس و مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون LSD صورت گرفت. نمودارها در نرم‌افزار اکسل رسم گردید.

نتیجه‌گیری و بحث

شاخه‌زایی

نتایج تجزیه واریانس (جدول ۱) نشان داد برهم‌کنش غلظت‌های مختلف IBA×BAP و GA_3×BAP بر میانگین شاخه‌زایی در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بوده است. در برهم‌کنش GA_3×BAP بهترین شاخه‌زایی در حضور BAP با غلظت سه میلی‌گرم در لیتر و GA_3 با غلظت یک دهم میلی‌گرم در لیتر ثبت گردید (شکل a–۱). تأثیر مثبت استفاده هم زمان از GA_3 و BAP برای شاخه‌زایی گلابی سبری (۱۸) و بِه (۸) گزارش شده است. در آزمایش انجام شده بر گونه گلابی نطنزی با افزایش غلظت BAP تعداد شاخه‌زایی افزایش و طول شاخه‌ها کاهش یافت. در موارد معدود نیز تغییر شکل برگ و شاخه مشاهده شد. در پژوهش انجام گرفته توسط شن و مولینز (۳۳) کاهش کیفیت گیاهچه‌ها و نابودی آن‌ها در طی واکشت به دلیل استفاده از غلظت‌های بالای BAP گزارش شده است. هم چنین در مورد گونه *P. calleryana* (۵) و *P. syrica* (۳۳) با افزایش غلظت BAP و افزایش میزان شاخه‌زایی در محیط کشت، زردی، ریزش، تغییر شکل برگ، کاهش طول و از بین رفتن نمونه‌ها نیز گزارش شده است. نتیجه آزمایش در مورد گلابی نطنزی بیان‌گر استفاده از BAP با غلظت سه میلی‌گرم در لیتر به عنوان بهترین غلظت تنظیم کننده رشد مؤثر بر میانگین شاخه‌زایی بود (شکل ۱). در گلابی سبری نیز غلظت بالاتر از دو میلی‌گرم در لیتر BAP برای شاخه‌زایی مناسب گزارش شده است (۱۸) که با نتایج تحقیق انجام شده مطابقت دارد. در این پژوهش در محیط فاقد BAP شاخه‌زایی مشاهده نشد (شکل a-۱). پژوهش انجام گرفته در مورد پایه گلابی OH×F33 عدم شاخه‌زایی را در محیط فاقد سایتوکنین گزارش نموده است (۷). مقایسه تعداد جوانه جانبی تیمار غلظت‌های مختلف IBA×BAP بر شاخه‌زایی گلابی نطنزی نشان داد که شاخه‌زایی در محیط کشت حاوی BAP با غلظت سه میلی‌گرم در لیتر به همراه IBA با غلظت نیم میلی‌گرم در لیتر به نحو معنی‌داری بیشتر بوده است (شکل b–۱). استفاده از ترکیب تنظیم کننده‌های رشد BAP×IBA در محیط کشت گونه سبری (۱۸)، *P. elaeagrifolia* (۲) و *P. boissieriana* (۴۰) در مرحله استقرار و شاخه‌زایی نیز موفقیت‌آمیز گزارش شده است.

ریشه‌زایی

غلظت ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر تیمار IBA در محیط کشت MS کامل و محیط تاریکی و در ½MS و محیط روشنایی به ترتیب با ۵۶ درصد و ۴۱ درصد ریشه‌زایی به عنوان بهترین غلظت برای IBA ثبت گردید (جدول ۲). همچنین در محیط کشت MS کامل و ½MSغلظت ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر تیمار NAA در هر دو محیط روشنایی و تاریکی با ۵۸ درصد به عنوان بهترین غلظت ریشه‌زایی برای NAA ثبت گردید (جدول ۲).

1- Specific root length (SRL)

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۱- تجزیه واریانس اثرات BAP×IBA، BAP×GA_3 بر شاخه‌زایی ریزنمونه‌های گلابی نطنزی

Table 1- ANOVA of BAP×IBA ،BAP×GA_3 effects on the shoot proliferation of Natanzi pear

منبع تغییرات Source of variation	میانگین مربعات Mean of squares	
	تعداد جوانه جانبی Number of lateral branches	درجه آزادی df
BAP	89.93**	3
GA_3	5.09**	3
BAP×GA_3	5.75**	9
BAP×IBA	9.37**	9
خطای آزمایش Error	0.61	32
ضریب تغییرات Coefficient of variations (%)	21.88	

**معنی‌دار در سطح احتمال ۱ درصد

**Significant at 1% probability level

جدول ۲- درصد ریشه‌زایی ریزنمونه‌های گلابی نطنزی در دو محیط کشت MS و ½MS تحت شرایط تاریکی و روشنایی

Table 2- Rooting percentage of Natanzi pear explants in MS and ½MS medium under dark and light conditions

محیط کشت Medium	نور Light	IBA (mg.L)	ریشه‌زایی Rooting (%)	NAA (mg.L)	ریشه‌زایی Rooting (%)
MS	+	0	00.00	0	00.00
		0.5	25.00	0.1	12.50
		1	33.33	0.3	23.07
		1.5	58.33	0.5	25.00
		Total treatments کل تیمار**	37.5	Total treatments کل تیمار	19.50
	-	0	00.00	0	00.00
		0.5	00.00	0.1	31.25
		1	6.25	0.3	37.50
		1.5	8.33	0.5	56.25
		کل تیمار	7.50	کل تیمار	41.66
½MS	+	0	8.33	0	8.33
		0.5	12.50	0.1	00.00
		1	37.50	0.3	33.33
		1.5	6.25	0.5	41.66
		Total treatments کل تیمار	18.75	Total treatments کل تیمار	37.50
	-	0	00.00	0	00.00
		0.5	6.25	0.1	41.66
		1	31.25	0.3	25.00
		1.5	58.33	0.5	33.33
		Total treatments کل تیمار	27.08	Total treatments کل تیمار	33.33

+ و – به ترتیب وجود و عدم وجود نور می‌باشد.

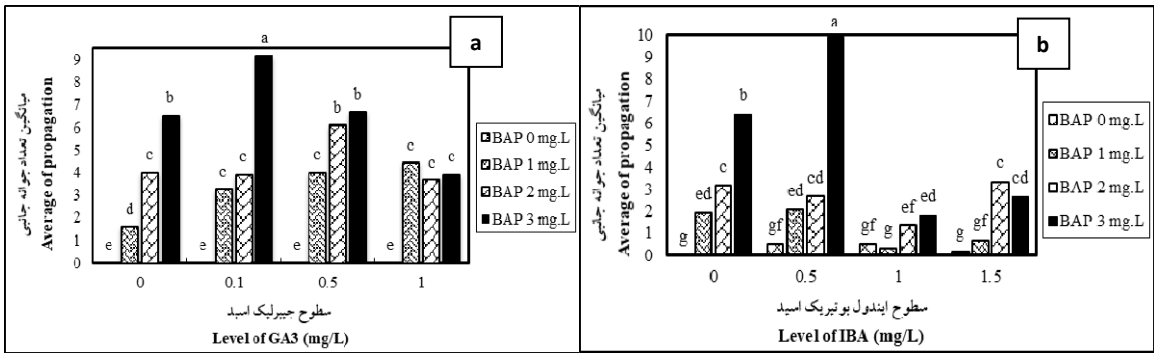
+ And – Respectively means with and without light

*درصد در هر غلظت حاصل تقسیم مشاهدات ریشه‌دار شده هر غلظت به کل مشاهدات آن تیمار می‌باشد.

*Percentage in each concentration comes from division of rooted observations of each hormone concentration into total observations of treatment.

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۱- مقایسه میانگین سطوح مختلف BAP×GA_3 (a) و IBA×BAP (b) بر شاخه‌زایی ریزنمونه‌های گلابی نطنزی با استفاده از آزمون LSD (α=۰/۰۱)

Figure 1- Compares the average levels of BAP×GA_3 (a) and BAP×IBA (b) on shoot proliferation of Natanzi pear using LSD Test (α =0.01)

نتایج مشاهده شده در مورد ریشه‌زایی گلابی نطنزی با استفاده از محیط کشت MS، تیمار IBA و تاریکی همسو با گزارش در مورد گونه *P. elaeagrifolia* (۲) و پایه‌های گلابی (۳۹) می‌باشد. مشاهده‌های حاصل از آزمایش ریشه‌زایی گلابی نطنزی تولید کالوس را مانع از ریشه‌زایی بیان نکرد. تأثیر مثبت کالوس‌زایی در تیمارهای NAA و IBA بر ریشه‌زایی گلابی ویلیامز و بوره بوس (۳۳) بیان شده است. مشاهدات در مورد گلابی نطنزی NAA را مناسب‌تر از IBA برای ریشه‌زایی نشان داد؛ ریشه‌های حاصل از تیمار NAA قطور، کوتاه، منشعب و پنجه‌ای و ریشه‌های حاصل از تیمار IBA بلند، رشته‌ای و ظریف بودند. در طول سازگاری هیچ تفاوتی بین سازگاری گیاهچه‌های حاصل از دو تنظیم کننده رشد مشاهده نشد.

سازگاری

طبق نتایج جدول تجزیه واریانس (جدول ۳) بستر کاشت و قارچ مایکوریزا در مرحله سازگاری گیاهچه‌های حاصل از ریزازدیادی بر میانگین قطر و طول مخصوص ریشه در سطح احتمال یک درصد و بر تعداد و نسبت عرض به عمق ریشه در سطح احتمال پنج درصد اثر معنی‌داری داشت. تأثیر معنی‌دار قارچ *G. mosseae* در بستر پیت ماس بر میانگین قطر ریشه گلابی نطنزی مشاهده شده است (شکل a-۲). در بستر کوکوپیت شاهد نسبت به سایر تیمارها تعداد ریشه افزایش معنی‌داری داشته است (شکل b-۲). برخلاف گزارش ارائه شده توسط Fortunato و همکاران (۲۰۰۵) استفاده از گونه‌های قارچ *Glomus* در گلابی نطنزی تعداد ریشه‌های گیاهچه‌های تلقیح شده گلابی نطنزی را افزایش نداد (شکل b-۳). طول مخصوص ریشه به طور معنی‌داری در بستر پیت ماس تیمار شاهد و ترکیب دو گونه قارچ مایکوریزا معنی‌دار بوده است. بین تیمار شاهد و ترکیب دو گونه قارچ در بستر پیت ماس اختلاف معنی‌داری در طول مخصوص ریشه مشاهده نشد (شکل c-۲). بستر کوکوپیت شاهد بیشترین نسبت سطح به عمق ریشه را نشان داد. بستر کوکوپیت باعث پخش شدن سطحی ریشه‌ها و کاهش عمق نفوذ ریشه شده است (شکل d-۲). به کمک قارچ مایکوریزا تعداد و طول مخصوص ریشه افزایش نشان داد. سیستم ریشه‌ای گسترده، افزایش قدرت نفوذ و افزایش سطح ریشه در گلابی نطنزی در بستر پیت ماس به کمک قارچ همزیست مشاهده شد (شکل d تا a-۲). بهبود سیستم ریشه‌ای با کمک قارچ مایکوریزا توسط محققان گزارش شده است (۲۴، ۲۷ و ۲۹).

نتایج جدول تجزیه واریانس (جدول ۴) اثر متقابل معنی‌داری بین بستر و نوع قارچ بر میزان غلظت فسفر برگ در سطح احتمال یک درصد را نشان می‌دهد، همچنین بیانگر اثر معنی‌دار درصد کلونیزاسیون بین تیمار قارچ مایکوریزا در سطح احتمال یک درصد می‌باشد. برخلاف گزارش افزایش جذب عناصر به ویژه فسفر در خاک‌های آلوده به قارچ مایکوریزا (۱۶ و ۱۷)، در گیاهچه‌های گلابی نطنزی میزان فسفر تیمار شاهد در بستر پیت ماس به طور معنی‌داری بیشتر از سایر تیمارها ثبت گردید (شکل a-۳). تفاوت معنی‌دار کلونیزه شدن همه تیمارهای آلوده شده با قارچ در گلابی نطنزی و تیمار شاهد مشهود است (شکل b-۳). آلوده شدن تمام گیاهچه‌های پایه سیب MM106 تحت تیمار قارچی نیز گزارش شده است (۳۱). نتایج غلظت فسفر برگ و درصد کلونیزاسیون ریشه (شکل b و a-۳) نشان می‌دهد که ارتباط معنی‌داری بین غلظت فسفر و درصد کلونیزاسیون وجود نداشت. معنی‌دار نبودن میزان غلظت فسفر و درصد کلونیزاسیون ریشه گلابی نطنزی مطابق با گزارش ارائه شده در پایه‌های سیب M9 و M26 (۱۳) بود.

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۳- تجزیه واریانس صفات مورفولوژیکی ریشه گیاهچه‌های گلابی نطنزی تحت تأثیر بسترهای کشت و قارچ‌های مایکوریزا

Table 3- ANOVA of root morphological traits of Natanzi pear seedling affected by substrates and mycorrhizal fungi

منبع تغییرات Source of variation	درجه آزادی Df	میانگین مربعات Mean of squares: نسبت عرض به عمق Width to depth ratio (cm/cm)	طول مخصوص ریشه Specific root length (cm/cm^3)	تعداد ریشه Number of roots (n)	میانگین قطر ریشه Average root diameter (cm)
بستر کاشت Culture media	1	0.06^{ns}	$10^{-5ns}\times7.8$	$10^{2ns}\times11.68$	0.04^{ns}
قارچ مایکوریزا Mycorrhizae	3	0.15^{ns}	$10^{-4*}\times7.78$	$10^{3**}\times12.83$	0.55^{ns}
بسترکاشت × قارچ Culture media × Mycorrhizae	3	0.29^{*}	$^{**}10^{-4}\times10.95$	$10^{2*}\times37.64$	2.99^{**}
خطای آزمایش Error	24	0.07	$10^{-4}\times2.05$	994.4	0.21
ضریب تغییرات Coefficient of variations (%)		21.33	24.51	23.87	10.76

ns ، * و ** به ترتیب غیر معنی‌دار و معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد و ۱درصد.

ns, * and **: non-significant, significant at 5% and 1% probability level, respectively.

جدول ٤- تجزیه واریانس غلظت فسفر برگ و درصد کلونیزاسیون ریشه گیاهچه‌های گلابی نطنزی تحت تأثیر بسترهای کشت و قارچ‌های مایکوریزا

Table 4- ANOVA of phosphorus leaf content and the root colonization percentage of Natanzi pear seedlings affected by substrates and mycorrhizal fungi

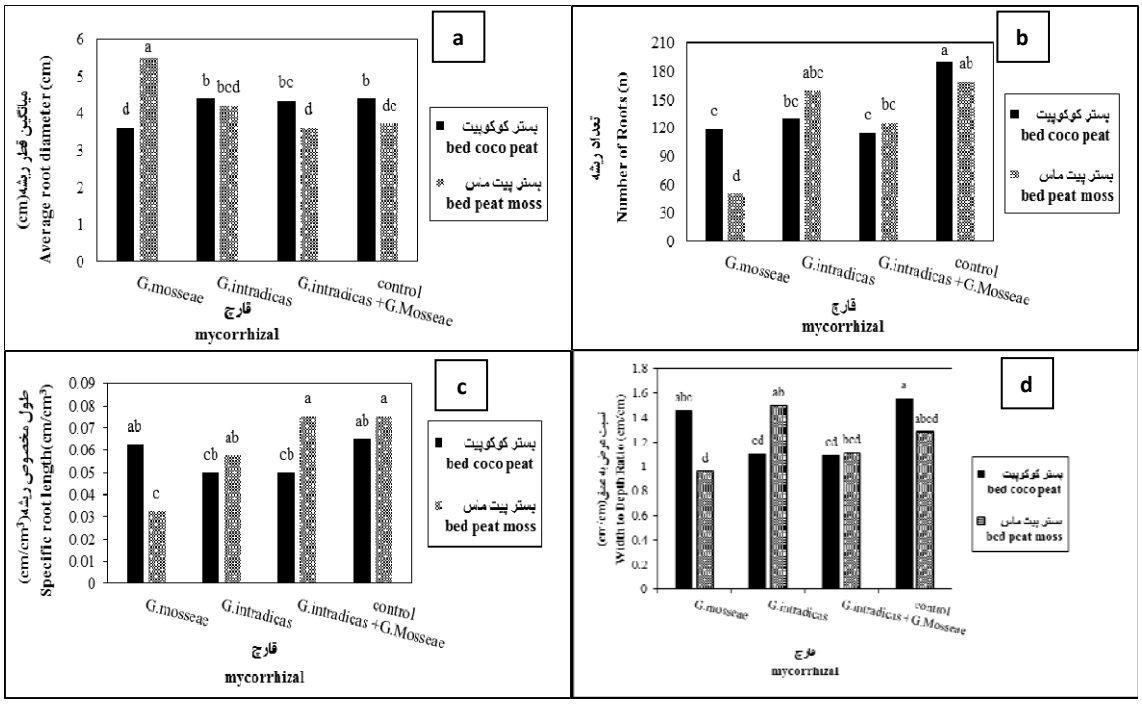
منبع تغییرات Source of variation	درجه آزادی df	میانگین مربعات Mean of squares: درصد کلونیزاسیون Colonization (%)	غلظت فسفر Concentration of phosphorus (mg/g DW)
بستر کاشت Media	1	110.51^{ns}	15.65^{**}
قارچ مایکوریزا Mycorrhizae	3	3917.12^{**}	1.59^{ns}
بسترکاشت × قارچ Media × Mycorrhizae	3	275.45^{ns}	5.38^{**}
خطای آزمایش Error	16	139.01	0.67
ضریب تغییرات Coefficient of variations (%)	1	23.66	26.62

ns و** به ترتیب غیر معنی‌دار و معنی‌دار در سطح احتمال ۱درصد.

ns and **: non-significant, and significant at 1% probability level, respectively.

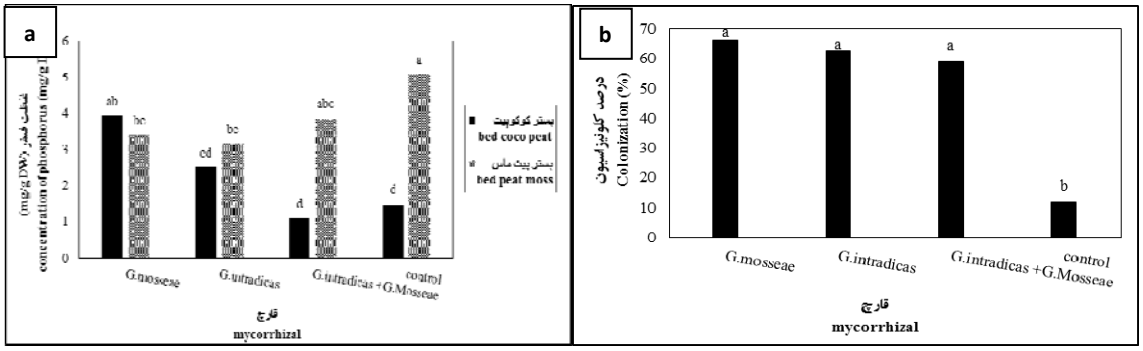
www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۲- تأثیر قارچ مایکوریزا و بستر بر ویژگی‌های رشدی ریشه، میانگین قطر ریشه (a)، تعداد ریشه (b)، طول مخصوص ریشه (c) و نسبت عرض به عمق (d) گیاهچه‌های گلابی نطنزی با استفاده از آزمون LSD (α=۰/۰۱)

Figure 2– The effect of mycorrhizal fungi and the substrate on root growth characteristics, Average root diameter (a), Number of roots (b), Specific root length (c) and Width to depth ratio (d), of seedlings Natanzi pear using LSD Test (α =0.01)



شکل ۳- تأثیر قارچ مایکوریزا و بسترکشت بر غلظت فسفر (a) و درصد کلونیزاسیون (b) ریشه گیاهچه های گلابی نطنزی با استفاده از آزمون LSD (α=۰/۰۱)

Figure 3– The effect of mycorrhizal fungi and the substrate on the root phosphorus content (a) and the colonization percentage (b) of Natanzi pear seedlings using LSD Test (α =0.01)

نتیجه‌گیری

جهت ازدیاد درون شیشه‌ای گلابی نطنزی استفاده از BAP (۳ میلی‌گرم در لیتر) به همراه تیمار IBA (۰/۵ میلی‌گرم در لیتر) برای شاخه‌زایی مناسب می‌باشد. افزایش غلظت BAP افزایش میزان شاخه‌زایی را به همراه داشت و تأثیر منفی بر خصوصیات رویشی گیاهچه‌ها مشاهده نشد. در مرحله ریشه‌زایی در مقایسه بین تیمارهای ریشه‌زایی در هر دو محیط موراشیگ و اسکوگ کامل و ½موراشیگ و اسکوگ، بهترین تیمار محیط واجد IBA بود. بهترین غلظت ریشه‌زایی ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA ثبت شد. وجود کالوس تأثیر

www.SID.ir

Archive of SID

منفی بر ریشه‌زایی نشان نداد. تلقیح با قارچ مایکوریزا در مرحله سازگاری گیاهچه ها با محیط بیرون باعث افزایش رشد طولی گیاهچه‌ها و همچنین افزایش ویژگی‌های رشدی ریشه شد. در بستر پیت ماس با حضور قارچ *G. mosseae* به‌طور معنی‌داری افزایش میانگین قطر ریشه مشاهده شد. سازگاری و بقای گیاهچه‌ها و میزان کلونیزاسیون مستقل از بستر بود. ۱۰۰ درصد گیاهچه‌ها با محیط سازگار و در حضور قارچ کلونیزاسیون مشاهده شد. غلظت فسفر مستقل از کلونیزاسیون بود و در بستر پیت ماس غلظت فسفر اندام هوایی بیشتر اندازه‌گیری شد.

منابع

1- Al-Maarri K., Arnaud Y., and Miginiac E. 1994. Micro propagation of *Pyrus communis* cultivar 'Passe Crassane'seedlings and cultivar 'Williams': Factors affecting root formation in vitro and ex vitro. Scientia horticulture, 58(3): 207-214.
2- Aygun A., and Dumanoglu H. 2015. In vitro shoot proliferation and in vitro and ex vitro root formation of *Pyrus elaeagrifolia* Pallas. Frontiers in plant science, 6(March) 225.
3- Banno K., Yoshida K., Hayashi S., and Tanabe K. 1989. In vitro propagation of Japanese pear cultivars. Journal of the Japanese Society for Horticultural Science, 58(1): 37-42.
4- Bell R.L., Srinivasan C., and Lomberk D. 2009. Effect of nutrient media on axillary shoot proliferation and preconditioning for adventitious shoot regeneration of pears. In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant, 45(6), 708.
5- Berardi G., Infante R., and Neri D. 1993. Micro propagation of *Pyrus calleryana* Dcn. from seedlings. Scientia horticulture, 53(1-2): 157-165.
6- Branzanti B., Gianinazzi-Pearson V., and Gianinazzi S. 1992. Influence of phosphate fertilization on the growth and nutrient status of micropropagated apple infected with endomycorrhizal fungi during the weaning stage. Agronomie, 12(10): 841-845.
7- Cordier C., Trouvelot A., Gianinazzi S., and Gianinazzi-Pearson V. 1996. Arbuscular mycorrhiza technology applied to micro propagated *Prunus avium* and to protection against Phytophthora cinnamomi. Agronomie, 16: 679-688.
8- Dimitrova N., Nacheva L., and Berova M. 2016. Effect of Meta-topolion on the shoot multiplication of pear rootstock OH×F-333 (*Pyrus communis* L.). Acta Scientiarum polonorum. Hortorum Cultus, 15(2): 43–53.
9- Duron M., Decourtye L., and Druart P. 1989. Quince (*Cydonia oblonga* Mill.). In Trees II. p. 42-58. Springer, Berlin Heidelberg.
10- Fadl M.S., and Hartmann H.T. 1967. Isolation, purification, and characterization of an endogenous root-promoting factor obtained from basal sections of pear hardwood cuttings. Plant Physiology, 42(4): 541-549.
11- Forotan A., and Vadi dar R. 2007. Plant tissue culture, Sepehr, Tehran. (In Persian)
12- Fortunato I.M., Ruta C., Castrignano A., and Saccardo F. 2005. The effect of mycorrhizal symbiosis on the development of micropropagated artichokes. Scientia Horticulture, 106(4): 472–483.
13- Ganji Moghadam I. 2011. Pomology in temperate regions. Agriculture research and education. Tehran. (In Persian)
14- Jalili Marandi R. 2010. Growing fruits temperate regions. Jahad Daneshgahi. (In Persian)
15- James D.J. 1983. Adventitious root formation '*in vitro*'in apple rootstocks (*Malus pumila*) I. Factors affecting the length of the auxin-sensitive phase in M. 9. Physiologia Plantarum, 57(1): 149-153.
16- Jeffries P., Gianinazzi S., Perotto S., Turnau K., and Barea J.M. 2003. The contribution of arbuscular mycorrhizal fungi in sustainable maintenance of plant health and soil fertility. Biology and fertility of soils, 37(1): 1–16.
17- Kapoor R., Sharma D., and Bhatnagar A. K. 2008. Arbuscular mycorrhizae in micro propagation systems and their potential applications. Scientia Horticulturae, 116(3): 227–239.
18- Karimpour S., Davarynejadur G.H., Bagheri A., and Tehranifar A. 2013. *In vitro* establishment and clonal propagation of Sebri pear cultivar. Journal of Agricultural Science and Technology, 15(6): 1209-1217.
19- Kitson R.E., and Mellon M.G. 1944. Colorimetric determination of phosphorus as molybdivanadophosphoric acid. Industrial and Engineering Chemistry Analytical Edition, 16(6): 379-383.
20- Lovato P., Guillemin J. P., and Gianinazzi S. 1992. Application of commercial arbuscular endomycorrhizal fungal inoculants to the establishment of micropropagated grapevine rootstock and pineapple plants. Agronomie, 12(10): 873-880.
21- Mansseri-Lamrioui A., Louerguioui A., Bonaly J., Yakoub-Bougdal S., Allili N., and Gana-Kebbouche S. 2011. Proliferation and rooting of wild cherry: The influence of cytokinin and auxin types and their concentration. African Journal of Biotechnology, 10(43): 8613-8624.
22- Moniee A.A. 2001. Pear and Quinces Growing. Iran Technical Publishing Corporation, 105pp. (In Persian)
23- Murashige T., and Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. Physiologia plantarum, 15(3): 473-497.

www.SID.ir

Archive of SID

24- Norman J.R., Atkinson D., and Hooker J.E. 1996. Arbuscular mycorrhizal fungal-induced alteration to root architecture in strawberry and induced resistance to the root pathogen. *Phytophthora fragariae*. Plant and Soil, 185(2): 191-198.
25- Ozdemir G., Akpinar C., Sabir A., Bilir H., Tangolar S., and Ortas I. 2010. Effect of inoculation with mycorrhizal fungi on growth and nutrient uptake of grapevine genotypes (*Vitis* spp.). European Journal of Horticultural Science, 103-110.
26- Phillips J.M., and Hayman D.S. 1970. Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. Transactions of the British mycological Society, 55(1): 158IN18.
27- Ponton F., Piche Y., Parent S., and Caron M. 1990. The use of vesicular-arbuscular mycorrhizae in Boston fern production: I. Effects of peat-based mixes. HortScience, 25(2): 183-189.
28- Predieri S., and Govoni M. 1997. *In vitro* propagation of compact pear clones. In VII International Symposium on Pear Growing, 475: 127-134.
29- Puthur J.T., Prasad K.V.S.K., Sharmila P., and Saradhi P.P. 1998. Vesicular arbuscular mycorrhizal fungi improves establishment of micro propagated *Leucaena leucocephala* plantlets. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 53(1): 41.
30- Reed B.M., and Bell R.L. 2000. *In vitro* tissue culture of pear: advances in techniques for micro propagation and germplasm preservation. In VIII International Symposium on Pear, 596: 412-418.
31- Schubert A., and Lubraco G. 2000. Mycorrhizal inoculation enhances growth and nutrient uptake of micro propagated apple rootstocks during weaning in commercial substrates of high nutrient availability. Applied Soil Ecology, 15(2): 113-118.
32- Shah M.A. 2014. Mycorrhizas: novel dimensions in the changing world. Springer, India.
33- Shen X.S., and Mullins M.G. 1984. Propagation in vitro of pear, *Pyrus communis* L. cultivars 'William's Bon Chrétien','Packham's Triumph'and 'Beurré Bosc'. Scientia horticulture, 23(1): 51-57.
34- Shibli R.A., Ajlouni M.M., Jaradat A., Aljanabi S., and Shatnawi M. 1997. Micro propagation in wild pear (*Pyrus syricca*). Scientia Horticulture, 68(1-4): 237-242.
35- Smith S.E., and Read D.J. 2010. Mycorrhizal symbiosis. Academic press.
36- Viseur J. 1985. Micro propagation of pear, *Pyrus communis* L., in a double-phase culture medium. In Symposium on In Vitro Problems Related to Mass Propagation of Horticultural Plants, 212: 117-124.
37- Welander M. 1983. *In vitro* rooting of the apple rootstock M 26 in adult and juvenile growth phases and acclimatization of the plantlets. Physiologia Plantarum, 58(3): 231-238.
38- Westwood M.N. 1993. Temperate Zone Pomology. Timber Press, Portland, Oregon, USA.
39- Yeo D.Y., and Reed B.M. 1995. Micropropagation of three *Pyrus* rootstocks. HortScience, 30(3): 620-623.
40- Zakavi M., Askari H., and Irvani N. 2016. Optimizing micropropagation of drought resistant *Pyrus boissieriana* Buhse. Physiology and Molecular Biology of Plants, 22(4): 583–593.

www.SID.ir

Journal of Horticultural Science
Vol. 32, No. 4, Winter 2019, p.655-664
ISSN: 2008 - 4730

نشریه علوم باغبانی (علوم و صنایع کشاورزی)
جلد ۳۲، شماره ۴، زمستان ۱۳۹۷، ص. ۶۶۴-۶۵۵
شاپا: ۴۷۳۰-۲۰۰۸

In vitro Proliferation, Rooting and Acclimatization of Natanzi Pear Seedlings (*Pyrus communis* cv. Natanzi) with Mycorrhiza Fungi Infection

A. Hajisadeghian Najafabadi[1], I. Rohollahi[2*]

Received: 27-06-2018
Accepted: 18-11-2018

Introduction: Natanzi, a native pear cultivar of Iran, is one of the Iranian high quality and commercial pear. True plant type can be produced with *in vitro* micropropagation. Micropropagation used for species that have long generation time, low levels of seed production, or seeds that do not readily germinate. Auxins in various concentrations are used for rooting depending on the different conditions of the tissue and culture medium. After propagation one of the problems with the production of plants through micropropagation is acclimatization. Low survival and poor growth of rooted seedlings in *in vitro* conditions after transferring to the environment, limits the use of tissue culture. The fungi symbiosis with root can enhance the success of this method. Natanzi pear propagation in Murashige and Skoog (MS) and propagated seedling acclimatization with mycorrhiza treatment were not reported. The aim of this study is evaluation the effects of various concentrations of BAP, IBA and GA_3 on shooting, and NAA and IBA on rooting of Natanzi pear. In the second part of this experiment, the effects of mycorrhizal fungi on root development and absorption of phosphorus were evaluated.

Materials and Methods: In this study one-year branch buds of *P.communis* cv. Natanz from a wild mature tree native in village Tame, Natanz city, Isfahan Province, were used as plant material. Natanzi pear cutting were propagated supplemented with MS media under factorial experimental designs with three replications. Shoot proliferation in MS and MS with half concentration by BAP, IBA and GA_3 were studied. Four different levels of IBA and NAA under light and dark condition for rooting were studied. After rooting plants were transplanted into 10 cm×12 cm plastic pots. Transplant was made in conditions of high ambient humidity to reduce damage to the plantlets. At transplant, pots were filled with different sterilized substrates, composed of mixtures of a coco peat:perlit and peat moss:perlit at a 1:1 (v/v) ratio. Substrates were wetted before filling the pots. At transplant, plants were inoculated with the AM fungus *Glomus mosseae* and *G. intraradices*, in the form of a mixture of spores, soil, and infected clover roots. Ten grams of inoculum were placed in each planting hole about 1 cm below the roots, for a total treatment. 10 g of the autoclaved mixed soil used for inoculated control treatment. Acclimatization, seedling survival, colonization, phosphorus concentrations and some morphological characteristics of root such as root characteristic were evaluated under *G. mosseae* and *G. intraradices* infection. Also two different bed, coco peat:perlite and peat moss:perlite at a 1:1 (v/v) ratio were examined. At the end of the experiment, Roots plants were stained to assess mycorrhiza colonization using Phillips and Hayman method (????). Colonization percentages of colonization were measured using Giovannetti and Mosse method. The total P concentration of plants was assessed using standard analytical techniques.

Results and Discussions: BAP (3 mg L^{-1}) with IBA (0.5 mg L^{-1}) is suitable of Natanzi pear proliferation under micropropagation condition. The highest rooting of Natanzi pear under *in vitro* condition were reported in MS and ½MS and 0.5 mg L^{-1} NAA under light and dark conditions, respectively. The results of experiments on Natanzi pear showed a positive effect of mycorhiza on the growth of infected seedlings compared to control treatments. Finally 100% of seedling were survived after acclimatization with mycorrhiza. Mycorrhiza increased the seedling length and root growth characteristics. No significant differences were observed in colonization of different mycorrhiza infection. Peat moss with no treatment (control) showed the most phosphorus concentrations and peat moss with *G. mosseae* mycorrhiza showed the most average root diameter.

Conclusions: BAP and IBA (3 × 0.5 mg L^{-1}) showed significant effect on proliferation and NAA (0.5 mg L^{-1}) on rooting in MS respectively. Peat moss with *G. mosseae* is suitable to increase the acclimatization of Natanzi pear seedlings. Mycorrhiza increased the length of seedling and root growth characteristics during eight weeks of acclimatization. Natanzi pear seedlings showed the highest growth under *G. intraradices* treatment in peat moss. *G. mosseae* showed a significant effect on the average root diameter in peat moss. Results of leaf phosphorus concentration and root colonization percentage showed that there was no significant correlation between phosphorus concentration and colonization percentage.

Keywords: Acclimatization, *Glomus*, Pear, Propagation, Rooting

1 and 2- Assistant Professor and M.Sc. Student, Horticulture Department, Faculty of Agriculture, Shahed University
(*- Corresponding Author Email: i.rohollahi@shahed.ac.ir)

www.SID.ir