Archive of SID

نشریه علوم باغبانی (علوم و صنایع کشاورزی)
جلد ۳۲، شماره ۲، تابستان ۱۳۹۷، ص. ۳۱۰-۳۰۱
شاپا: ۴۷۳۰ - ۲۰۰۸

Journal of Horticultural Science
Vol. 32, No.2, Summer 2018, P. 301-310
ISSN: 2008 - 4730

بهینه‌سازی شرایط کشت درون‌شیشه‌ای پایه رویشی گلابی Pyrodwarf

احمد شریفی[۱]- آزاده خادم[۲*]- مریم مرادیان[۳]- مهدیه خرازی[۴]

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۰۶/۱۱
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۰۴/۰۶

چکیده

گلابی (*Pyrus sativus*) به عنوان یکی از مهم‌ترین میوه‌های دانه‌دار شناخته شده است. کشت پایه رویشی پیرودوارف (pyrodwarf) بدلیل عملکرد مناسب در شرایط تنش، مقاومت در مقابل سرمای زمستانه و قابلیت رشد در محیط خاک‌های قلیایی به عنوان راهکاری موثر به منظور افزایش بازدهی باغات گلابی شناخته شده است. از این‌رو این تحقیق با هدف بهینه‌سازی شرایط ریزازدیادی پایه پیرودوارف در شرایط درون‌شیشه‌ای انجام شد. به منظور پرآوری، ریزنمونه‌های گره از گیاهچه‌های استریل و یکنواخت تهیه و در محیط کشت‌های پایه مختلف شامل محیط کشت‌های MS، WPM، QL و QL تغییریافته در ترکیب با ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر هورمون BA و ۰/۰۵ میلی‌گرم در لیتر هورمون IAA و یا IBA کشت شدند. به منظور بهینه‌سازی ریشه‌زایی نیز در مرحله اول از محیط کشت‌های حاوی عناصر معدنی مختلف استفاده شده و در مرحله دوم اثر کاربرد هورمون اکسین و زغال فعال بر صفات ریشه‌زایی گیاهچه‌ها مورد بررسی قرار گرفت. نتایج این آزمایش نشان داد که تعادل عناصر معدنی پرمصرف بر میزان باززایی گیاهچه‌ها موثر است اما بر رشد گیاهچه‌ها اثر معنی‌داری نداشت. طبق این نتایج، محیط کشت MS حاوی ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BA به همراه ۰/۰۵ میلی‌گرم در لیتر IBA به عنوان محیط کشت مناسب به منظور پرآوری گیاهچه‌ها تعیین شد. علاوه بر این در بین تیمارهای ریشه‌زایی، کاربرد هورمون IAA با غلظت ۱ میلی‌گرم در لیتر و یا زغال فعال به میزان ۱ گرم در لیتر در محیط کشت MS ½ از لحاظ صفات مورد بررسی به عنوان محیط کشت مناسب ریشه‌زایی مشخص شد. بطور کلی نتایج این تحقیق نشان داد که عناصر پرمصرف و حضور هورمون اکسین بیشترین تاثیر را به ترتیب در طی مراحل پرآوری و ریشه‌زایی گیاهچه‌های پیردوارف در شرایط درون شیشه‌ای داشتند.

واژه‌های کلیدی: اکسین، زغال فعال، ریزازدیادی، تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی

مقدمه

یکی از راهکارهای افزایش عملکرد باغات، بکارگیری پایه‌های رویشی مقاوم به تنش‌های محیطی بویژه آفات و بیماری‌ها است، بطوری که در سال‌های اخیر، پایه‌های رویشی با سازگاری بالا بدلیل عملکرد مناسب در تنش‌های محیطی و نیز ارتباط فیزیولوژیکی بهتر با ارقام مورد استفاده به عنوان پیوندک، جایگزین پایه‌های قبلی در باغات شده‌اند. گلابی (*Pyrus sativus*) از خانواده رزاسه (Rosaceae) به لحاظ اهمیت در بین میوه ها، جایگاه چهارم و یا پنجم را به خود اختصاص داده است (۱۸). در این بین پایه رویشی پیرودوارف (pyrodwarf) به عنوان پایه رویشی گلابی، دارای ویژگی‌های زودرسی، عملکرد بالا، میزان بالای سازگاری با انواع ارقام گلابی، مقاومت به سرمای زمستانه و خاک‌های قلیایی است که این ویژگی‌ها موجب شده تا این پایه رویشی در سطح وسیعی از باغات گلابی مورد استفاده قرار گیرد (۸).

پایه‌های رویشی به روش سنتی معمولا از طریق تقسیم کردن و یا قلمه زدن تکثیر می‌شوند که از جمله معایب این روش‌ها می‌توان به سرعت کند تکثیر و نیاز به صرف نیروی انسانی زیاد دانست. از سوی دیگر، تکثیر از طریق بذر نیز امکان ایجاد تنوع را افزایش داده و تولید جمعیت غیریکنواخت را بدنبال خواهد داشت (۱۷). موفقیت آمیز بودن روش‌های مختلف کشت بافت به منظور تکثیر سریع و کم هزینه پایه‌های رویشی موجب شده است تا این فنون در تولید پایه‌های رویشی در مقیاس وسیع بکار گرفته شوند. همچنین تولید گیاهان عاری از ویروس و یکنواخت از لحاظ ژنتیکی و مرفولوژیکی باعث شده است تا کشت بافت به عنوان راهکاری موثر در جهت تولید تجاری پایه‌های رویشی مورد توجه قرار گیرد (۱۴). دستیابی به پروتکل تکثیر پایه‌های رویشی در شرایط کشت بافت نیازمند شناخت ارتباط بین اجزای محیط کشت و هورمون‌های گیاهی با میزان تکثیر و عملکرد گیاهچه‌های حاصل از کشت بافت است که این مهم از

۱، ۲، ۳ و ۴- استادیار، مربیان و استادیار گروه پژوهشی بیوتکنولوژی گیاهان زینتی، پژوهشکده بیوتکنولوژی صنعتی، سازمان جهاد دانشگاهی خراسان رضوی
(*-نویسنده مسئول: Email: Akh.agri69@gmail.com)
DOI: 10.22067/jhorts4.v32i2.67149

www.SID.ir

Archive of SID

طریق بررسی اجزای عملکرد در محیط کشت‌های مختلف بدست خواهد آمد (۹).

بررسی تحقیقات متعددی که با هدف تکثیر پایه‌های گلابی صورت گرفته است، بیانگر آن است که نمک‌های موجود در محیط کشت یکی از عوامل موثر بر میزان باززایی گیاهچه‌های گلابی است. علاوه بر آن در بین اجزای محیط کشت، نوع منابع نیتروژن موجود در محیط کشت و نسبت آنها مهم‌ترین عامل تعیین کننده میزان باززایی گیاهچه‌ها است. به عنوان مثال، میزان باززایی گیاهچه‌های رقم Beurré Bosc در محیط کشت DKW نسبت به LP، WPM و MS بیشتر بوده است. همچنین گیاهچه‌های رقم Bartlett کمترین میزان باززایی را در محیط کشت MS دارا بودند (۱۲). علاوه بر آن، بررسی اثر هورمون‌های گیاهی مختلف بر باززایی ارقام مختلف گلابی انجام شده است که نشان می‌دهد بیشترین میزان باززایی با کاربرد هورمون BA در محیط کشت بدست آمده است و سایر هورمون‌ها در صورت کاربرد در محیط کشت همراه با BA استفاده شده‌اند (۱۰، ۱۶ و ۱۸). نتایج تحقیقات پیشین نشان داده است که حضور هورمون 2ip همراه با هورمون BA در بزرگ شدن برگ‌ها موثر بوده اما در صورت فقدان هورمون BA در محیط کشت، میزان شکست خواب جوانه‌ها کاهش یافته است (۱ و ۱۱). مجموع نتایج حاصل نشان می‌دهد که عوامل محیطی متنوعی بر میزان باززایی گیاهچه‌های ارقام مختلف گلابی موثر است. از این رو، پژوهش حاضر با هدف تکثیر پایه رویشی پیرودوارف از طریق بررسی محیط کشت‌های مختلف و تیمارهای هورمونی متفاوت انجام شد.

مواد و روش‌ها

مرحله باززایی

جهت اجرای آزمایش از گیاهچه‌های استریل و یکنواخت پایه رویشی پیرودوارف گلابی (*Pyrus communis* L.) که به مدت یک ماه در شرایط درون‌شیشه‌ای آزمایشگاه کشت بافت سازمان جهاد دانشگاهی خراسان رضوی نگهداری شده بودند، استفاده شد. به منظور بررسی اثر محیط کشت‌های مختلف و ترکیبات هورمونی متفاوت، در مرحله باززایی ۱۲ تیمار مورد ارزیابی قرار گرفت که شامل محیط کشت‌های MS، WPM، QL و QL تغییریافته (جدول ۱) در ترکیب با ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر هورمون BA و ۰/۰۵ میلی‌گرم در لیتر هورمون IAA و یا IBA بود.

جدول ۱- مقدار عناصر پرمصرف در محیط کشت‌های QL، QL تغییریافته، Knop و Knop تغییریافته

Table 1- Amount of macronutrients in QL, modified QL, Knop and modified Knop basal media

	محیط کشت QL QL media	محیط کشت QL تغییریافته Modified QL media	محیط کشت Knop Knop media	محیط کشت Knop تغییریافته Modified Knop media
		($mg.L^{-1}$)		
Ca(NO3)2.4H2O	1123.77	550	1000	1000
CaCl2	0	100	0	0
KH2PO4	405	405	250	405
KNO3	1800	800	250	500
K2SO4	0	200	0	0
MgSO4.7H2O	355.79	355.79	250	250
NH4NO3	400	0	0	0

انتخاب محیط کشت‌های پایه مورد بررسی عمدتا بر اساس تفاوت در میزان ترکیبات نیترات، آمونیوم و مقدار کل عنصر نیتروژن موجود در محیط کشت صورت گرفت (جدول ۲). به منظور مشخص نمودن تیمار باززایی مناسب، پس از گذشت یک ماه صفاتی مانند تعداد جوانه، ارتفاع و وزن خشک گیاهچه‌ها اندازه گیری شد.

جدول ۲- مقدار ترکیبات حاوی نیتروژن و نسبت آنها در محیط کشت‌های پایه مورد بررسی

Table 2- Different nitrogen sources and their ratio in studied basal media

محیط کشت Media	مقدار نیترات Nitrate Concentration $mmol.L^{-1}$	مقدار آمونیوم Ammonium Concentration $mmol.L^{-1}$	مقدار کل نیتروژن Total Nitrogen $mmol.L^{-1}$	نسبت آمونیوم به نیترات Ammonium/Nitarte Ratio
QL	31.3	4.3	34.6	0.14
QLm	12.6	0	12.6	0
WPM	8.7	4.3	13	0.49
MS	38	20	58	0.53
MS-NH4NO3	18	0	18	0

www.SID.ir

Archive of SID

مرحله ریشه‌زایی

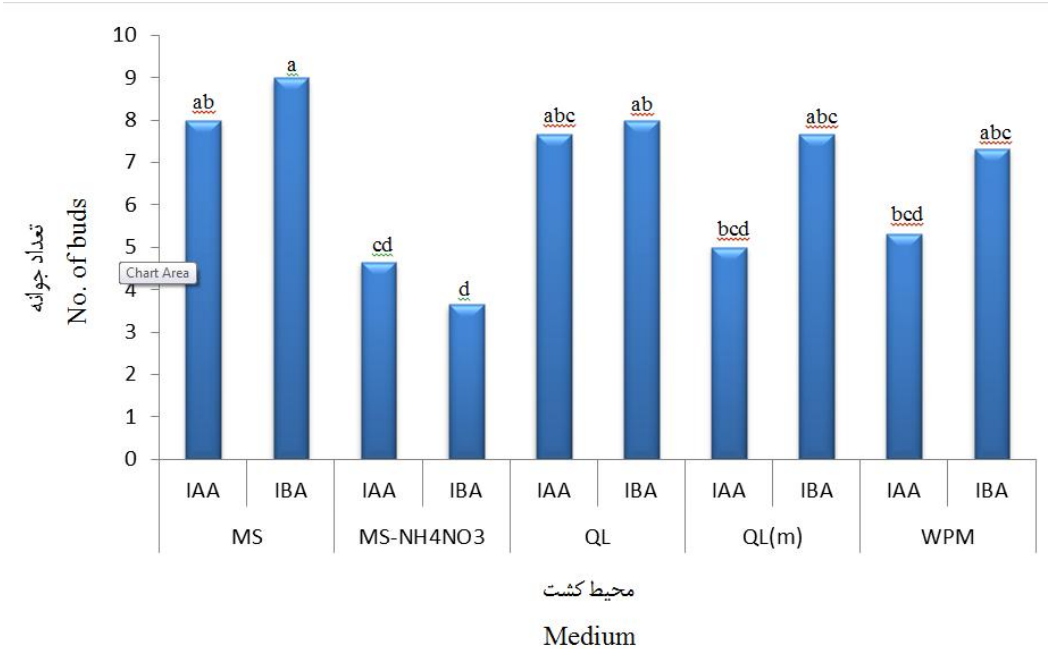
به منظور اعمال تیمارهای ریشه‌زایی، گیاهچه‌های رشد یافته با ارتفاع ۱۵ میلی‌متر از ریزنمونه جدا شده و در مرحله اول در ۹ نوع محیط کشت مختلف شامل MS، MS بدون نیترات آمونیوم و حاوی ۸۵ میلی‌گرم در لیتر فسفات پتاسیم، 1/2 MS، Knop، Knop تغییریافته، QL، QL تغییریافته (جدول ۱)، QL تغییریافته به همراه ۵۰ گرم در لیتر ساکارز، QL تغییریافته به همراه ۱ میلی‌گرم در لیتر سولفات مس و DKW کشت شدند. در مرحله دوم از محیط کشت 1/2 MS همراه با هورمون IAA با غلظت‌های ۰ و ۱ میلی‌گرم در لیتر در ترکیب با در تمام محیط کشت‌ها بجزء مورد ذکر شده از ساکارز با غلظت ۳۰ گرم در لیتر به همراه آگار با غلظت ۸ گرم در لیتر استفاده شد. pH محیط کشت‌ها قبل از اتوکلاو در ۵/۷ تنظیم گردید و سپس محیط کشت‌ها در اتوکلاو با فشار یک اتمسفر و دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد استریل شدند. پس از کشت، نمونه‌ها به اتاق رشد با شرایط نوری ۱۶ ساعت روشنایی (۳۰۰۰-۲۵۰۰ لوکس) در دمای ۱±۲۵ درجه سانتی‌گراد منتقل شدند. پس از ۴۰ روز، صفاتی مانند ارتفاع، وزن خشک، تعداد جوانه، تعداد برگ، تعداد ریشه و طول ریشه در هر یک از گیاهچه‌ها اندازه‌گیری شد.

آنالیز آماری داده‌ها

بررسی عملکرد رشدی در مرحله باززایی بصورت طرح کاملا تصادفی و در قالب آزمایش فاکتوریل با استفاده از دو عامل شامل نوع محیط کشت پایه (۶ سطح) و نوع هورمون اکسین مورد استفاده (۲ سطح) و با ۳ تکرار انجام شد. همچنین بررسی عملکرد گیاهچه‌ها در مرحله ریشه‌زایی نیز بصورت طرح کاملا تصادفی و با ۷ تکرار انجام شد. مقایسه میانگین داده‌ها توسط نرم افزار JMP و با استفاده از آزمون LSD در سطح احتمال ۵ درصد انجام شد.

نتایج و بحث

پس از گذشت ۱۵ روز از کشت ریزنمونه‌ها، باززایی در تمام ریزنمونه‌ها مشاهده شد. بررسی تعداد جوانه در تیمارهای باززایی مختلف نشان داد که نوع هورمون اکسین اثر معنی‌داری بر القای جوانه در گیاهچه‌ها در سطح ۵ درصد نداشت. برخلاف آن، اثر نوع محیط کشت پایه بر تعداد جوانه القایی معنی‌دار بود، بطوری که گیاهچه‌های رشد یافته در محیط کشت MS بیشترین تعداد جوانه را تولید کردند و حذف ترکیب نیترات آمونیوم از محیط کشت MS نیز موجب کاهش ۵۰ درصدی تعداد جوانه در هر گیاهچه شد (شکل ۱). در تحقیقات پیشین نیز مشخص شده است که عناصر پرمصرف بیشترین اثر را بر رشد گیاهچه‌های گلابی در شرایط این‌ویترو داشته است بطوری که رشد گیاهچه‌ها در محیط کشت‌های MS و TK که دارای عناصر کم‌مصرف و ویتامین‌های مشترک بودند، با یکدیگر تفاوت چشمگیری داشتند (۱۲).



شکل ۱- اثر متقابل نوع محیط کشت پایه (۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BA) × نوع اکسین (۰/۰۵ میلی‌گرم در لیتر) بر میزان تولید جوانه در شاخساره‌های پیردوارف

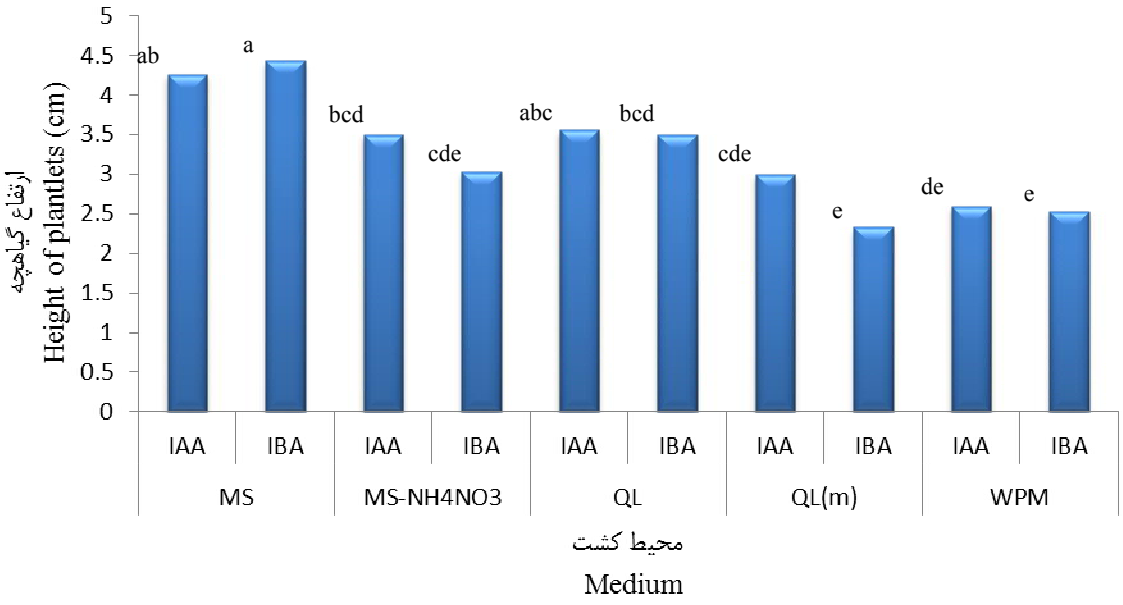
Figure 1- Interaction effect of basal media (0.5 mg.l^{-1} BA) ×auxin type (0.05 mg.l^{-1}) on bud formation of pyrodwarf shoots

www.SID.ir

Archive of SID

نتایج حاصل از این آزمایش نشان داد که تعداد جوانه تولید شده در هر گیاهچه در محیط کشت QL در مقایسه با محیط کشت MS تفاوت معنی‌داری نداشت اگرچه با کاهش مقدار عنصر نیتروژن در محیط کشت QL تغییر یافته، میزان تولید جوانه در مقایسه با محیط کشت QL کاهش چشمگیری داشت (شکل ۱). علاوه بر آن گیاهچه‌های رشد یافته در محیط کشت WPM نسبت به محیط کشت MS تعداد جوانه کمتری تولید کردند اما این میزان نسبت به محیط کشت QL تفاوت معنی‌داری نشان نداد. از این‌رو افزایش و یا کاهش نسبت نیترات به آمونیوم بر میزان باززایی گیاهچه‌های پیرودوارف اثر معنی‌داری نداشته است اما آمونیوم به عنوان یکی از منابع ضروری نیتروژن به منظور القای جوانه در گیاهچه‌های پیرودوارف شناخته شده بطوری که حذف آن از محیط کشت موجب کاهش تولید جوانه شده است. نتایج تحقیقات پیشین نیز نشان می‌دهد اثر متقابل نوع محیط کشت پایه و نوع هورمون مورد استفاده بویژه هورمون اکسین بر تعداد جوانه تولید شده در پایه رویشی GF677 در سطح ۵ درصد معنی‌دار بوده است، اما میزان القای جوانه در دو نوع محیط کشت MS و WPM با یکدیگر تفاوت معنی‌داری نداشته است (۲). اگرچه سیکوتی و همکاران (۵) با بررسی باززایی ۱۲ رقم سیب (*Malus sieboldii*) گزارش کرده‌اند که القای جوانه در ریزنمونه‌های رشد یافته در محیط کشت MS نسبت به محیط کشت‌های QL، WPM و DKW به میزان بیشتری صورت گرفته است.

اندازه‌گیری ارتفاع گیاهچه‌ها نشان داد نوع محیط کشت پایه و ارتباط متقابل آن با نوع هورمون اکسین مورد استفاده، اثر معنی‌داری بر میزان رشد طولی گیاهچه‌ها داشته است، اما نوع هورمون اکسین به تنهایی بر ارتفاع گیاهچه‌های باززا شده تاثیر گذار نیست (شکل ۲).



شکل ۲- اثر متقابل نوع محیط کشت پایه (۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BA) × نوع اکسین (۰/۰۵ میلی‌گرم در لیتر) بر ارتفاع شاخساره‌های پیرودوارف

Figure 2- Interaction effect of basal media (0.5 mg.l^{-1} BA) ×auxin type (0.05 mg.l^{-1}) on height of pyrodwarf shoots

طبق این نتایج، محیط کشت MS در رشد طولی گیاهچه‌ها اثر بسزایی داشته است. همچنین کاهش عنصر نیتروژن موجب کاهش ارتفاع گیاهچه‌ها شد، بطوری که گیاهچه‌های رشد یافته در محیط کشت QL و محیط کشت MS فاقد ترکیب نیترات آمونیوم از ارتفاع کمتری برخوردار بودند (شکل ۲). کانونتیپات و همکاران (۴) نیز با بررسی باززایی پایه رویشی دو رقم بادام (*Prunus dulcis*) در ۵ نوع محیط کشت، در نهایت محیط کشت MS را به عنوان محیط کشت مناسب باززایی گزارش کردند.

داده‌های وزن خشک گیاهچه‌های رشد یافته این آزمایش بیانگر آن بود که رشد تحت تاثیر نوع ترکیبات موجود در محیط کشت، نوع هورمون اکسین مورد استفاده و اثر متقابل آنها قرار نگرفت بطوری که تفاوت معنی‌داری بین وزن خشک گیاهچه‌ها در تیمارهای مورد بررسی وجود نداشت (جدول ۳). اگرچه در گزارش‌های ارائه شده، غلظت بالای آمونیوم در محیط کشت MS باعث شیشه‌ای شدن گیاهچه‌ها و کاهش وزن خشک آنها شده است.

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۳- جدول تجزیه واریانس مربوط به وزن خشک شاخساره‌های حاصل از تیمارهای باززایی شاخه در گلابی پیرودوارف

Table 3- Analysis of variance summary table for the weight of shoots from pyrodwarf shoot regeneration

منبع Source of Variation	درجه آزادی Degrees of Freedom	مجموع مربعات Sum of Squares	درجه معنی‌داری Significance Value
محیط کشت Medium	4	0.00509167	0.5408 ns
اکسین Auxin	1	0.00018750	0.7354 ns
محیط کشت×اکسین Medium Auxin×	4	0.00471433	0.5767 ns
خطا Error	20	0.07581	
کل Total	29		

ns : عدم معنی داری

ns: non significant

در بین تیمارهای مختلف ریشه‌زایی نیز از لحاظ ارتفاع گیاهچه‌ها تفاوت معنی‌داری وجود داشت، بطوری که گیاهچه‌های رشد یافته در تیمارهای DKW و MS نسبت به محیط کشت‌های QL و Knop از ارتفاع بیشتری برخوردار بودند. همچنین حذف ترکیب نیترات آمونیوم از محیط کشت MS و QL موجب کاهش ارتفاع گیاهچه‌ها شد. این نتایج نشان می‌دهد که حضور آمونیوم به عنوان یکی از منابع نیتروژن در طی رشد گیاهچه‌های پیرودوارف ضروری بوده تا آنجا که حذف و یا کاهش آن نسبت به ترکیبات نیترات موجود در محیط کشت، بازدارنده رشد گیاهچه‌ها بوده است. علاوه بر این کاهش چشمگیر ارتفاع گیاهچه‌ها بدنبال کاهش غلظت نمک‌های محیط کشت MS به میزان پنجاه درصد بیانگر آن است که مقدار نمک‌های موجود در محیط کشت MS 1/2 کمتر از مقدار بهینه برای رشد گیاهچه‌های پیرودوارف بوده است. کاهش غلظت عناصر پرمصرف در طول کشت درون شیشه‌ای گیاه درختی *Arbutus unedo* نیز موجب کاهش میزان باززایی این گیاه شده است (۷). اگرچه روگینی و ورما (۱۵) باززایی و رشد گیاهچه‌های بادام (*Prunus amigdalus*) را در محیط کشت MS 1/2 کمتر از محیط کشت B5 1/2 گزارش کردند.

داده‌های حاصل از اندازه‌گیری وزن خشک گیاهچه‌ها نشان داد تیمارهای ریشه‌زایی مختلف اثر اندکی بر رشد گیاهچه‌ها داشته است (جدول ۴)، بطوری که افزایش غلظت ساکارز در محیط کشت QL تغییر یافته موجب افزایش وزن خشک گیاهچه‌ها شد اما این تفاوت از لحاظ آماری در سطح ۵ درصد معنی‌دار نبود.

جدول ٤- جدول تجزیه واریانس مربوط به وزن خشک گیاهچه‌های حاصل از تیمارهای ریشه‌زایی گلابی پیرودوارف

Table 4- Analysis of variance summary table for the weight of pyrodwarf plantlets induced by rooting treatments

منبع Source of Variation	درجه آزادی Degrees of Freedom	مجموع مربعات Sum of Squares	میانگین مربعات Mean of Squares	درجه معنی‌داری Significance Value
تیمار Treatment	9	0.01676201	0.001862	0.0254*
خطا Error	60	0.04801555	0.0008	
کل Total	69	0.06477756		

*:معنی دار بودن در سطح احتمال ۵ درصد

*:significant at 5% probability level

علاوه بر این کاهش مقدار ترکیب فسفات پتاسیم و حذف همزمان نیترات آمونیوم نسبت به محیط کشت MS و MS 1/2 موجب کاهش چشمگیر وزن خشک گیاهچه‌ها شد که بیانگر آن است که این دو ترکیب از جمله مواد معدنی ضروری برای رشد گیاهچه‌های پیرودوارف در شرایط درون‌شیشه‌ای است. همچنین تعداد جوانه‌ها در هر گیاهچه مشخص نمود تمام تیمارهای ریشه‌زایی مورد بررسی، بازدارنده القای جوانه در گیاهچه‌ها بوده‌اند زیرا در بیشتر تیمارها هیچ جوانه جانبی مشاهده نشد. با توجه به اعمال تیمارها به منظور بهبود ریشه‌زایی گیاه و حضور غلظت بالای اکسین در این تیمارها، کاهش القای جوانه‌های جانبی طبیعی به نظر می‌رسد زیرا حضور هورمون اکسین در طی رشد گیاه عمدتا از توسعه اندام‌های هوایی آن جلوگیری می‌کند. یئو و رید (۱۹) نیز حضور هورمون اکسین در محیط کشت را در کاهش تعداد گیاهچه‌های باززایی گلابی (*Pyrus calleryana*) موثر دانسته‌اند.

بین تیمارها از لحاظ تعداد برگ تولید شده در هر گیاهچه اختلاف معنی‌داری وجود داشت. با توجه به نتایج بدست آمده، گیاهچه‌های رشد یافته در محیط کشت MS و MS تغییر یافته از تعداد برگ بیشتری برخوردار بودند اما کاهش غلظت نمک‌ها در محیط کشت MS 1/2، موجب کاهش تعداد برگ تولید شده در هر گیاه شد. همچنین تغییر غلظت نمک‌ها، افزایش مقدار ساکارز و یا سولفات مس در محیط کشت QL در کاهش تعداد برگ گیاهچه‌ها موثر بود (جدول ۵).

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۵- اثر محیط کشت‌های مختلف بر صفات ریشه‌زایی شاخساره‌های پیردوارف*

Table 5- Effect of basal media on rooting properties of pyrodwarf shoots

تیمار Treatment	ارتفاع height	وزن خشک Dry weigth (mg)	تعداد جوانه No. of buds	تعداد برگ No. of leaves	تعداد ریشه No. of roots
MS	4.01 ab	115 ab	0.8 a	29.85 a	1.14 a
1/2 MS	2.97 d	99 ab	0.6 ab	23.42 bc	8.43 b
MS-NH4NO3+85 mg.L^{-1} KH2PO4	3.41 cd	65 c	0.6 ab	30.28 a	1.57 b
QL	3.5 bcd	89 bc	0 b	28.57 ab	0.86 b
QL(m)	3.34 cd	107 ab	0 b	24.71 abc	0 b
QL(m)+5% suc	3.02 cd	117 a	0 b	21.42 c	0.43 b
QL(m)+1 mg.L^{-1} CuSO4	3.2 cd	89 abc	0.3 ab	21.85 c	0.86 b
Knop	3.56 bc	117 a	0 b	27.14 abc	0.28 b
Knop(m)	3.6 bc	105 ab	0.1 ab	25.42 abc	1 b
DKW	4.36 a	95 abc	0.4 ab	26 abc	0 b

*اعداد دارای حروف مشابه در آزمون LSD و در سطح ۵ درصد اختلاف معنی‌داری ندارند.

*Numbers followed by the same letter are not significantly differentns (P<0.05) by LSD test.

اندازه‌گیری تعداد ریشه در هر گیاهچه مشخص نمود کاهش غلظت نمک‌ها اثر چشمگیری بر تعداد ریشه تولیدی داشت بطوری که گیاهچه‌های رشد یافته در محیط کشت 1/2 MS بطور میانگین با دارا بودن ۸ ریشه در هر گیاهچه بیشترین میزان تولید ریشه را به خود اختصاص دادند که در سطح ۵ درصد تفاوت معنی داری با سایر تیمارها داشت. این در حالی است که سایر تیمارها با یکدیگر اختلاف معنی‌داری نشان ندادند. همچنین داده‌های حاصل از اندازه‌گیری طول ریشه‌ها بیانگر آن بود که تیمارهای مورد بررسی از لحاظ رشد ریشه‌ها با یکدیگر اختلاف معنی‌داری نداشته و ریشه‌های تولید شده در هر تیمار بطور میانگین حدود ۲ سانتی‌متر طول داشتند.

در مرحله دوم آزمایش، اثر زغال فعال و هورمون IAA بر ریشه‌زایی گیاهچه‌های پیرودوارف بررسی شد. نتایج حاصل از این آزمایش بیانگر آن بود که هورمون IAA اثر معنی‌داری بر رشد طولی گیاهچه‌ها داشته است بطوری که گیاهچه‌های رشد یافته در محیط کشت 1/2 MS حاوی ۱ میلی‌گرم در لیتر هورمون IAA از ارتفاع بیشتری نسبت به تیمار شاهد برخوردار بودند. همچنین کاربرد زغال فعال نیز موجب افزایش رشد گیاهچه‌ها شد. این در حالی است که کاربرد همزمان هورمون IAA به همراه زغال فعال در محیط کشت اثر بازدارنده بر رشد گیاهچه‌ها داشت و ارتفاع گیاهچه‌ها تحت تاثیر این تیمار و تیمار شاهد با یکدیگر برابر بود (جدول ۵). در صفت تعداد برگ نیز روندی مشابه با نتایج حاصل از ارتفاع گیاهچه‌ها مشاهده شد اما میزان تفاوت بین تیمارها ناچیز بود بطوری که تعداد برگ در تمام تیمارها از لحاظ آماری با یکدیگر یکسان بود.

جدول ۵- اثر کاربرد هورمون IAA و زغال فعال بر صفات ریشه‌زایی گیاهچه‌های پیرودوارف

Table 4- Effect of IAA and charcoal on rooting properties of pyrodwarf plantlets

تیمار Treatment	تعداد ریشه No. of roots	طول ریشه Root lenght	ارتفاع Height	تعداد برگ No. of leaves	وزن خشک Dry weight
1/2 MS	4.6 bc	3.33 a	4.33 b	25 b	61.05 b
1/2 MS+IAA	8.5 a	2.33 a	6 a	33 a	104.15 a
1/2 MS+زغال فعال 1/2 MS+Charcoal	5.1 b	2.16 a	5.67 a	30 ab	78.06 ab
1/2MS+IAA+زغال فعال 1/2MS+IAA+Charcoal	1.3 c	1.98 a	4.47 b	25 b	87.56 ab

*اعداد دارای حروف مشابه در آزمون LSD و در سطح ۵ درصد اختلاف معنی‌داری ندارند.

Numbers followed by the same letter are not significantly differentns (P<0.05) by LSD test.

www.SID.ir

Archive of SID

مقایسه تعداد ریشه‌ها نیز بیانگر آن بود که کاربرد هورمون IAA و یا زغال فعال در محیط کشت، افزایش تولید ریشه را در گیاهچه‌ها بدنبال داشته است، اما حضور همزمان این دو ترکیب در محیط کشت باعث کاهش چشمگیر تولید ریشه در گیاهچه‌ها شده است. همچنین گیاهچه‌های رشد یافته در محیط کشت‌های حاوی هورمون IAA، زغال فعال و یا ترکیب همزمان این دو ماده در مقایسه با تیمار شاهد از وزن خشک بیشتری برخوردار بودند اما تفاوت معنی‌داری بین سه تیمار فوق مشاهده نشد (جدول ۵). در گزارش شارما و همکاران (۱۷) نیز کاربرد همزمان هورمون اکسین و زغال فعال در محیط کشت موجب کاهش درصد ریشه‌زایی گیاهچه‌های M7 نسبت به تیمارهای حاوی هورمون IAA به تنهایی شده است . بر خلاف تعداد ریشه‌های تولیدی، طول ریشه‌ها تحت تاثیر تیمارهای مورد بررسی قرار نگرفت. دی‌کلرک و همکاران (۶) نیز گزارش کردند که کاربرد هورمون IAA در محیط کشت MS موجب افزایش دو برابری تعداد ریشه در گیاهچه‌های سیب رقم Jork9 شده است. با توجه به نتایج حاصل، محیط کشت MS 1/2 حاوی یک میلی‌گرم در لیتر هورمون IAA از لحاظ صفات ریشه‌زایی مورد بررسی مناسب ارزیابی شد.

نتیجه‌گیری کلی

داده‌های حاصل از این آزمایش نشان داد که نوع محیط کشت و ترکیبات هورمونی مورد استفاده بر عملکرد گیاه در دو مرحله باززایی و ریشه‌زایی موثر است. طبق این نتایج، عناصر پر مصرف و ترکیبات هورمونی موجود در محیط کشت تاثیر مهمی در باززایی گیاهچه‌های پیرودوارف در شرایط درون شیشه‌ای دارند، بطوری که در مرحله پرآوری محیط کشت MS حاوی ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BA به همراه ۰/۰۵ میلی‌گرم در لیتر IBA موجب تولید بیشترین تعداد جوانه در ریزنمونه‌ها شده و گیاهچه‌های حاصل نیز از ارتفاع بیشتری برخودار بودند. همچنین در مرحله ریشه‌زایی نیز محیط کشت MS ۱/۲ حاوی یک میلی‌گرم در لیتر IAA از لحاظ صفات مورد ارزیابی به عنوان تیمار مناسب ریشه‌زایی مشخص شد.

منابع

1- Bell R.L. 1995. Preconditioning effects of proliferation medium on adventitious regeneration of pear. HortScience, 30:832.

2- Bolandi A.R., Hamidi H., and Rezagholi A.A. 2016. Effects of culture media and growth regulators on propagation of rootstock GF677 in tissue culture conditions. Journal of Plant Researches, 29(1): 1-14. (in Persian with English abstract)

3- Cerović R., Kuzmanović M., Ružić D.J., and Vujović,T. 2008. The influence of imidazole fungicides on multiplication *in vitro* of low vigorous pear and cherry rootstocks. International Symposium on Biotechnology of Fruit Species: 79-86.

4- Channuntapipat C., Sedgley M., and Collins G. 2003. Micropropagation of almond cultivars Nonpareil and Ne Plus Ultra and the hybrid rootstock Titan× Nemaguard. Scientia Horticulturae, 98(4): 473-484.

5- Ciccotti A.M., Bisognin C., Battocletti I., Salvadori A. Herdemertens M. and Jarausch W. 2008. Micropropagation of apple proliferation-resistant apomictic Malus sieboldii genotypes. Agronomy Research, 6(2): 445-458.

6- De Klerk G.J., Ter Brugge J., and Marinova S. 1997. Effectiveness of indoleacetic acid, indolebutyric acid and naphthaleneacetic acid during adventitious root formation *in vitro* in Malus 'Jork 9'. Plant cell, tissue and organ culture, 49(1): 39-44.

7- Gomes F., and Canhoto J.M. 2009. Micropropagation of strawberry tree (*Arbutus unedo* L.) from adult plants. *In Vitro* Cellular & Developmental Biology-Plant, 45(1): 72-82.

8- Jacob H.B. 1997. Pyrodwarf, a new clonal rootstock for high density pear orchards. In VII International Symposium on Pear Growing: 169-178.

9- Jamshidi S., Yadollahi A., Ahmadi H. Arab M.M., and Eftekhari M. 2016. Predicting *in vitro* culture medium macro-nutrients composition for pear rootstocks using regression analysis and neural network models. Frontiers in plant science, 7:1-12.

10- Kadota, M., and Niimi, Y. 2003. Effects of cytokinin types and their concentrations on shoot proliferation and hyperhydricity in *in vitro* pear cultivar shoots. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 72(3): 261-265.

11- Moretti, C., Scozzoli, A., Pasini, D. and Paganelli, F., 1990. *In vitro* propagation of pear cultivars. *In Vitro* Culture, 300: 115-118.

12- Nezami Alanagh E., Garoosi G.A., Haddad R., Maleki S., Landín M., and Gallego P.P. 2014. Design of tissue culture media for efficient Prunus rootstock micropropagation using artificial intelligence models. Plant Cell,

www.SID.ir

Archive of SID

Tissue and Organ Culture, 117(3):349-359.
13- Rathore J.S., Rathore V., Shekhawat N.S., Singh R.P., Liler G., Phulwaria M., and Dagla H.R. 2004. Micropropagation of woody plants. In Plant Biotechnology and Molecular Markers, p.195-205.
14- Rugini E., and Verma D.C. 1983. Micropropagation of difficult-to-propagate almond (Prunus amygdalus, Batsch) cultivar. Plant science letters, 28(3): 273-281.
15- RUŽIĆ D., Vujović T., Nikolić D., and Cerović, R. 2011. *In vitro* growth responses of the 'Pyrodwarf' pear rootstock to cytokinin types. Romanian Biotechnological Letters, 16(5): 6631.
16- Sharma T., Modgil M., and Thakur M. 2007. Factors affecting induction and development of *in vitro* rooting in apple rootstocks. Indian Journal of Experimental Biology, 45: 824-829.
17- Silva, G.J., Souza, T.M., Barbieri, R.L., and Costa de Oliveira, A. 2014. Origin, domestication, and dispersing of pear (*Pyrus* spp.). Advances in Agriculture, 12:1-8.
18- Vujovic T., Ruzic D.J., and Cerovic R. 2012. *In vitro* shoot multiplication as influenced by repeated subculturing of shoots of contemporary fruit rootstocks. Hort. Sci., 39: 101-7.
19- Yeo D.Y., and Reed B.M. 1995. Micropropagation of three Pyrus rootstocks. HortScience, 30(3): 620-623.

www.SID.ir

Archive of SID

Journal of Horticultural Science
Vol. 32, No.2, Summer 2018, P. 301-310
ISSN: 2008 - 4730

نشریه علوم باغبانی (علوم و صنایع کشاورزی)
جلد ۳۲، شماره ۲، تابستان ۱۳۹۷، ص. ۳۱۰-۳۰۱
شاپا: ۴۷۳۰ - ۲۰۰۸

Optimization of *In Vitro* Culture of Pear Rootstock (Pyrodwarf)

A. Sharifi[1]- A. Khadem[2*]- M. Moradian[3]- M. Kharrazi[4]

Received: 02-09-2017
Accepted: 27-06-2018

Introduction: Application of stress-tolerant rootstocks is known as one of the effective methods to enhance the productivity of fruit gardens. Pear is one of the four or five major classes of fruits that are produced worldwide. Among pear cultivars, Pyrodwarf rootstock is tolerant to alkaline soil and low temperatures of winter. In addition, many cultivars of pear with high productivity could be grafted to this rootstock. These advantages result in widespread culture of pyrodwarf rootstock in pear gardens. The increasing market demand of this rootstock presents an opportunity to investigate alternative methods for efficient production of pyrodwarf. Therefore, this study has been conducted to increase the efficiency of pyrodwarf propagation through tissue culture methods.

Materials and Methods: For this experiment, sterile plantlets of pyrodwarf rootstocks in a same growth phase were used. Plantlets were cultured in different 12 media including MS, WPM, KNOP, modified KNOP, QL and modified QL basal media supplemented with 0.5 $mg.L^{-1}$ BA and 0.05 $mg.L^{-1}$ IAA or IBA and solidified with 8 $g.L^{-1}$ agar. After that, cultures were transferred to the growth room at 25 ± 1°C under a 16/8h light/dark photoperiod (light intensity 30 $\mu mol.m^{-2}.s^{-1}$, cool-white fluorescent light). In the next step for rooting optimization, two separate experiments were conducted. In the first, 10 different basal media containing various nutritional compounds were examined for rooting properties of pyrodwarf plantlets. The following experiment was performed to reveal the effects of IAA and active charcoal on the efficiency of plantlets rooting. All the experiments were carried out in acompletelyrandomized design. The study of propagation efficiency of plantlets was arranged in a factorial approach with twofactors including the type of basal media (sixlevels) and auxins (twolevels) with threereplications. The both experiments of plantlet rooting were performed with sevenreplications. Data were analyzed using JMP-8 statistical software and the meanswere compared by using LSD test at 5% probability.

Results and Discussion: All explants were regenerated 15 days after cultivation. The number of buds per explants indicates that nutritional compounds significantly affected bud formation. MS basal media induced the most number of adventitious buds and decreasing amount of nitrogen in the culture medium (either in its ammonium or nitrate form) leads to 50%-decrease in the number of buds induced per explant. Previous reports mentioned that macronutrients have the most significant effect on bud formation of peach hybrid rootstock GF677. In addition, high amount of nitrogen is necessary to achieve the highest height of pyrodwarf*in vitro* plantlets. In contrast to the basal media, neither bud formation nor height of plantlets did not affected by the type of auxins, IAA and IBA. Also weight of plantlets was similar in all treatments and shows the effect of basal media and auxins were not significant on biomass production. According to the results of rooting experiment, plantlets that were cultured in MS and DKW had higher height than QL and Knop in rooting phase. Also, 1/2 MS-cultured plantlets have the lowest height among all treatments. These results showed that macronutrients have positive effects on the growth of pyrodwarf plantlets as decreasing concentration; the growth of plantlets was inhibited. In contrast to shoot growth, number of roots per explants in 1/2 MS medium was significantly higher than the other media. These results are expected as shoots and roots of plants have different response to environmental stimuli. Data obtained from the following experiment of rooting indicated that IAA improved root induction similar toother functional traits of plants but the presence of both of those compounds in medium have inhibitory effect on the functional traits of plants.

1, 2, 3 and 4- Assistant Professor, Instructors and Assistant Professor, Research group of Ornamntal Plants Biotechnology, Department of Industrial Biotechnology, Khorasan Razavi Branch of Academic Center of Education, Culture and Research
(*- Corresponding Author Email: Akh.agri69@gmail.com)

www.SID.ir

Archive of SID

Conclusion: These data suggest that macronutrients and hormonal compounds have impressive impact on the regeneration of pyrodwarf plantlets. In this regard, MS medium supplemented with 0.5 $mg.L^{-1}$ BA and 0.05 $mg.L^{-1}$ IAA or IBA induced most number of buds and the regenerated plantlets hadthe highest height in that medium compared to the other treatments. Also, 1/2 MS medium containing 1 $mg.L^{-1}$ IAA was identified as the best media in case of rooting parameters.

Keywords: Auxin, Charcoal, Micropropagation, *Pyruscommunis*

www.SID.ir