Archive of SID.ir

Iranian Journal of Horticultural Science
Vol 52, No 3, Autumn 2021 (721-730)
DOI: 10.22059/ijhs.2020.287276.1698

علوم باغبانی ایران
دورهٔ ۵۲، شمارهٔ ۳، پاییز ۱۴۰۰ (ص ۷۳۰-۷۲۱)

نشریه پژوهشی:

کاربرد برهم کنش ایندول بوتیریک اسید و پوتریسین بر ریشه‌زایی درون‌شیشه‌ای پایه پیرودوارف گلابی (*P. communis* L.)

خدیجه احمدی اقدم[1]، علی رضا مطلبی آذر[2]، فریبرز زارع نهندی[2]، غلامرضا گوهری[3*]
۱ و ۲. کارشناسی ارشد و دانشیار، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران
۳. استادیار، دانشکده کشاورزی، دانشگاه مراغه، مراغه، ایران
(تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۵/۲۳ - تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۹/۳)

چکیده
پژوهش حاضر به منظور بهینه‌سازی محیط کشت برای ریشه‌زایی ریز نمونه‌های پایه پیرودوارف گلابی در شرایط درون‌شیشه‌ای انجام شد. برای بررسی میزان ریشه‌زایی، ریز نمونه‌هایی به طول ۲ سانتی‌متر به‌طور جداگانه در محیط کشت MS و ½ MS حاوی غلظت‌های مختلف ایندول بوتیریک اسید (صفر، ۰/۵، ۱ و ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر) و پوتریسین (صفر، ۲۵، ۵۰ و ۷۵ میلی‌گرم در لیتر) کشت گردیدند. بر اساس نتایج مقایسه میانگین داده‌ها، درصد ریشه‌زایی و طول ریشه‌های باززایی شده در محیط کشت ½ MS به ترتیب ۴۱/۶۷ و ۱۲/۳۰ درصد بیشتر از محیط کشت MS بود. بررسی اثر ایندول بوتیریک اسید و پوتریسین بر ریشه‌زایی شاخساره‌های پیرودوارف نشان داد استفاده همزمان از این دو تنظیم‌کننده رشدی برای ریشه‌زایی ریزنمونه‌های درون‌شیشه‌ای ضروری می‌باشد و در محیط کشت فاقد تنظیم‌کننده رشد هیچ نوع ریشه‌زایی مشاهده نشد. در هر دو نوع محیط کشت (MS و ½ MS) بالاترین درصد ریشه‌زایی در تیمار ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر ایندول بوتیریک اسید و ۲۵ میلی‌گرم در لیتر پوتریسین حاصل شد. میزان رشد شاخساره‌های کشت شده گلابی پیرودوارف در محیط کشت MS و ½ MS تقریباً مشابه بود با این حال در ترکیب ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر ایندول بوتیریک اسید و ۲۵ میلی‌گرم در لیتر پوتریسین بالاترین رشد ثبت گردید. بر اساس نتایج پژوهش حاضر، محیط کشت ½ MS همراه با ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر ایندول بوتیریک اسید و ۲۵ میلی‌گرم در لیتر پوتریسین، بهترین ترکیب تیماری برای دستیابی به حداکثر ریشه‌زایی در شاخساره‌های درون‌شیشه‌ای پایه پیرودوارف بود.

کلیدواژه‌ها: اکسین، پایه نیمه پاکوتاه، پلی‌آمین، ریز قلمه، ریشه‌زایی.

Interaction effect of indole butyric acid and putrecin on *in vitro* root regeneration of pyrodwarf root stock (*Pyrus communis* L.)

Khadijeh Ahmadi Aghdam[1], Ali Reza Motallebi-Azar[1], Fariborz Zaare Nahandi[3] and Gholamreza Gohari[4*]
1, 2. M. Sc. and Associate Professor, Faculty Agriculture, University of Tabriz, Tabriz, Iran
3. Assistant Professor, Faculty Agriculture, University of Maragheh, Maragheh, Iran
(Received: Aug. 14, 2019 - Accepted: Nov. 23, 2020)

ABSTRACT
Present study was done to optimizing the medium culture for rooting the micro cutting of pyrodwarf rootstock under *in vitro* condition. Propagated shoots of pyrodwarf were used as micro cutting for rooting assay. For rooting, the shoots in 2-3 cm length separately were cultured in MS and ½ MS media cultures with different concentrations of indole butyric acid (IBA: 0, 0.5, 1 and 1.5 mg/l) and putrescine (Put: 0, 25, 50, 75 mg/l). Th mean comparison analaysis showed that in each medium culture the growth regulator IBA and putrescine significantly influenced the rooting and shoot growth. The percent of rooting induction and the length of regenerated roots in ½ MS medium respectively 41.67 and 12.30% were higher than MS medium. The survey effect of IBA and putrescine on rooting of pyrodwarf rootstocks showed that the application of these compounds is necessary for rooting of explants under *in vitro* condition and the explants in free growth regulators medium did not show any rooting. In both medium (MS and ½ MS) the highest root induction was obtained in 0.5 mg/l IBA and 25 mg/l putrescine. The shoot length of cultured shoots in MS and ½ MS approximately was similar that in combination treatment of IBA and putrescine the longest shoots were observed. According to obtained results, ½ MS medium with 0.5 mg IBA and 25 mg/l putrescine suggested for successful rooting in micro cutting of pyrodwarf rootstock.

Keywords: Auxin, micro cutting, polyamine, pyrodwarf rootstock.

* Corresponding author E-mail: gholamreza.gohari@gmail.com

Archive of SID.ir

Archive of SID.ir

مقدمه

ازدیاد ارقام گلابی معمولاً توسط پیوند روی پایه بذری گلابی اروپایی (*Pyrus communis* L.)، پایه‌های کلونال به (*Cydonia oblonga* L.) و یا گونه‌های دیگر گلابی که با قلمه یا خوابانیدن تکثیر می‌شوند، صورت می‌گیرد. پاکوتاه کنندگی و بازده باردهی بالا و همچنین تحمل شرایط نامساعد خاک از مهم‌ترین شاخص‌های گزینش پایه‌های درختان میوه از جمله پایه‌های گلابی می‌باشد. تکثیر این پایه‌ها از طریق بذر، قلمه و خوابانیدن علاوه بر وابسته بودن به فصول خاصی از سال، نیازمند صرف زمان طولانی، تسهیلات خزانه‌ای زیاد و مهارت‌های فردی می‌باشد (Zimmerman *et al.*, 1995).

با توجه به محدودیت‌های موجود در تکثیر پایه‌های مختلف گلابی به روش کلاسیک، استفاده از شیوه‌های نوین ریزازدیادی به منظور تکثیر انبوه پایه‌های گلابی از نظر اقتصادی قابل توجیه است. در اغلب پژوهش‌ها، موفقیت در تولید درون‌شیشه‌ای پایه‌های مختلف درختان میوه از جمله گلابی گزارش شده است. اغلب پایه‌های پاکوتاه کننده گلابی متعلق به گونه گلابی اروپایی (*P. communis*) هستند که سازگاری بسیار خوبی با ارقام تجاری دارند، همچنین این پایه‌ها را می‌توان از طریق روش‌های کشت بافت با سرعت بالا تکثیر و عرضه نمود. پایه نیمه پاکوتاه پیرودوارف به سبب ویژگی‌های پاکوتاه کنندگی، تحریک زود باردهی، تمایل کم به تولید پاجوش، مقاومت نسبی به بیماری آتشک و مقاومت قابل توجه به آهک و کلروز از جمله پایه‌های مورد توجه گلابی است که استفاده از این پایه در حال گسترش می‌باشد (Radnia, 1996). براساس ویژگی‌های مطلوب پایه پیرودوارف، افزایش راندمان تکثیر این پایه از طریق کشت بافت اهمیت اقتصادی بالایی خواهد داشت (Paprstein *et al.*, 2013).

از مهم‌ترین مراحل در تولید پایه‌های درختان میوه از طریق کشت بافت، القای موفقیت‌آمیز ریشه‌زایی در ریز قلمه‌های حاصل از مرحله پرآوری می‌باشد. برای تحریک ریشه‌زایی، تنظیم‌کننده‌های رشد مختلفی ممکن است مورد استفاده قرار گیرد که انتخاب نوع و غلظت هر کدام از این ترکیبات می‌تواند در میزان موفقیت در ریشه‌زایی مؤثر باشد. نوع و غلظت تنظیم‌کننده‌های رشد مورد استفاده، درصد ریشه‌زایی را به میزان قابل ملاحظه‌ای تحت تأثیر قرار می‌دهد. استفاده از اکسین‌های ایندول بوتیریک اسید (IBA) و نفتالین استیک اسید (NAA) در ریشه‌زایی ریز قلمه‌های پایه‌های مختلف گلابی موفقیت‌آمیز گزارش شده است. ایندول بوتیریک اسید در القای ریشه‌زایی ریز نمونه‌های پایه گلابی (*P. betuleafolia* L.) بسیار مؤثر بود و بالاترین درصد ریشه‌زایی از ریز قلمه‌های کشت شده در محیط کشت MS با نصف غلظت عناصر ماکرو و میکرو (½ MS) و دارای ۲ میلی‌گرم در لیتر IBA، یک گرم در لیتر زغال فعال و ۲۰ گرم در لیتر ساکارز ریشه‌زایی مشاهده شد (Hassanen & Gabr, 2012). درصد ریشه‌زایی، تعداد ریشه در هر ریز نمونه و طول ریشه‌چه در گلابی گونه *P. pashia* تحت تأثیر نوع محیط کشت و تنظیم‌کننده‌های رشد گزارش شده است. NAA با غلظت ۱ میلی‌گرم در لیتر و IBA با غلظت ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر در محیط کشت ½ MS به‌ترتیب عامل القای ۲۷/۴۶ و ۱۴/۰۸ درصد ریشه‌زایی در ریز قلمه‌های *P. pashia* گردیدند (Rehman *et al.*, 2014). علاوه بر اکسین‌ها، استفاده از پلی‌آمین‌ها و مخصوصاً پوتریسین برای القای ریشه‌زایی در ریز نمونه‌های پایه‌های گیاهان چوبی گزارش شده است. پوتریسین از جمله ترکیبات پلی‌آمینی است که نه تنها سمیت اندکی داشته، بلکه القای ریشه‌زایی را تسریع می‌کند (Wu *et al.*, 2010). این ترکیبات عمدتاً برای تحریک ریشه‌زایی گیاهان چوبی سخت‌ریشه‌زا از قبیل فندق (Cristofori *et al.*, 2010) و زیتون (Rugini *et al.*, 1989) مورد استفاده قرار گرفته است. پلی‌آمین‌ها به تنهایی و یا در ترکیب با اکسین‌ها موجب تحریک شدیدتر تولید ریشه‌ها در گیاهان سخت‌ریشه‌زا می‌شوند و استفاده آن‌ها در شرایط درون‌شیشه‌ای و نیز در شرایط مزرعه‌ای مرسوم است (Rugini *et al.*, 1993). با توجه به اهمیت پایه پیرودوارف و ریشه‌دارکردن شاخساره‌های حاصل از مرحله پرآوری، لازم است تا نوع و غلظت تنظیم‌کننده‌های رشدی موثر بر ریشه‌زایی و رشد شاخساره ریشه‌دار شده بهینه

Archive of SID.ir

Archive of SID.ir

گردد. لذا در این پژوهش اثر غلظت‌های مختلف ایندول بیوتریک اسید و پوتریسین در محیط کشت MS و ½MS بر مرحله ریشه‌زایی مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی

نمونه‌های گیاهی مورد استفاده در این پژوهش از پایه پیرودوارف گلابی که به‌صورت درون‌شیشه‌ای نگهداری می‌شدند، از شرکت نهال گستر رویان تهیه گردید. تمامی مراحل این آزمایش در آزمایشگاه کشت بافت و بیوتکنولوژی گیاهی دانشکده کشاورزی دانشگاه تبریز انجام پذیرفت.

تهیه محیط کشت و پرآوری گیاهچه‌های درون‌شیشه‌ای

جهت پرآوری ریزنمونه‌ها از محیط کشت تغییر یافته MS (Murashige & Skoog, 1962) دارای ۲ میلی‌گرم در لیتر بنزیل آمینو پورین (BAP) و یک میلی‌گرم در لیتر اسید جیبرلیک (GA_3) استفاده گردید (Vujovic *et al.*, 2012). بازکشت گیاهچه‌ها در محیط کشت جدید به فواصل هر سه هفته یک بار از آغاز کشت به مدت ۴ ماه انجام شد.

ارزیابی اثر ایندول بوتیریک اسید و پوتریسین بر ریشه‌زایی

پس از تهیه تعداد کافی گیاهچه‌های درون‌شیشه‌ای پایه پیرودوارف، برای بررسی ریشه‌زایی ریزنمونه‌های حاصل، از دو تنظیم‌کننده رشد شامل ایندول بوتیریک اسید و پوتریسین در دو محیط کشت MS کامل و محیط کشت MS با نصف عناصر ماکرو و میکرو (½MS) استفاده شد. برای اعمال تیمار، ریز نمونه‌هایی به طول ۲ سانتی‌متر به‌طور جداگانه در دو محیط کشت MS و ½MS دارای غلظت‌های مختلف ایندول بوتیریک اسید (صفر، ۰/۵، ۱ و ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر) و پوتریسین (صفر، ۲۵، ۵۰ و ۷۵ میلی‌گرم در لیتر) کشت گردیدند. ریز نمونه‌های کشت شده در اتاقک رشد با دمای ۲±۲۵ درجه سانتی‌گراد و رژیم نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی قرار داده شدند.

یک ماه پس از کشت، صفات درصد ریشه‌زایی، طول ریشه‌های باززایی شده، طول شاخه‌ها، تعداد و اندازه برگ‌ها و همچنین طول میانگره‌ها در هر یک از تیمارها در هر دو محیط کشت اندازه گیری شد.

طرح آزمایشی و تجزیه و تحلیل آماری

این بررسی به صورت آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار و در هر تکرار با چهار ریز نمونه به‌طور جداگانه در دو محیط کشت MS و ½MS اجرا گردید. تجزیه واریانس داده‌ها و مقایسات میانگین با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ۵ درصد توسط نرم‌افزار آماری SPSS (ver. 16) انجام شد.

نتایج و بحث

بر اساس نتایج تجزیه واریانس اثر متقابل ایندول بوتیریک اسید و پوتریسین در محیط کشت MS بر درصد ریشه‌زایی، طول ریشه، طول شاخه, تعداد برگ و طول میانگره پایه پیرودوارف در شرایط درون‌شیشه‌ای معنی‌دار بود، همچنین اثر متقابل این دو نوع تنظیم‌کننده رشدی در محیط کشت ½ MS بر صفات مورد بررسی به‌جز طول برگ (درصد ریشه‌زایی، طول ریشه، طول شاخه، تعداد برگ و طول میانگره) معنی‌دار بود.

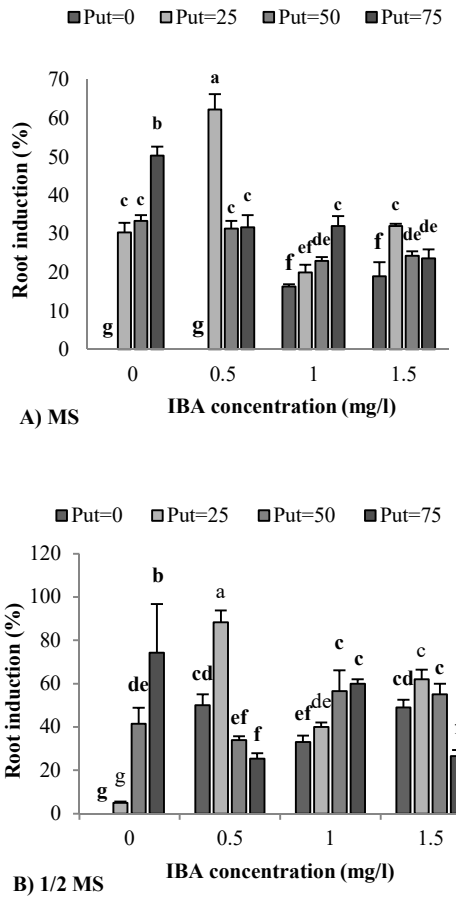
درصد ریشه‌زایی و طول ریشه

استفاده از پوتریسین و ایندول بوتیریک اسید در محیط کشت MS سبب افزایش معنی‌دار درصد ریشه‌زایی شاخساره‌های کشت شده گلابی پیرودوارف در محیط کشت MS نسبت به ریز نمونه‌های کشت شده در محیط کشت شاهد (محیط کشت فاقد ایندول بوتیریک اسید و پوتریسین) گردید. در محیط کشت فاقد تنظیم‌کننده رشد هیچ نوع ریشه‌زایی مشاهده نشد و با افزایش غلظت ایندول بوتیریک اسید و پوتریسین درصد ریشه‌زایی افزایش نشان داد. بر اساس نتایج اثرات متقابل، بالاترین درصد ریشه‌زایی (۶۲ درصد) در تیمار دارای ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر ایندول بوتیریک اسید و ۲۵ میلی‌گرم در لیتر پوتریسین

Archive of SID.ir

Archive of SID.ir

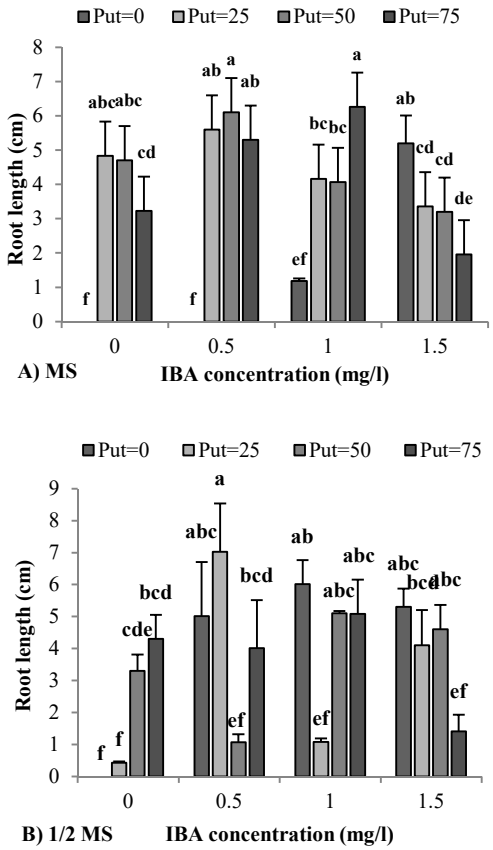
مشاهده شد (شکل A-۱). در محیط کشت MS ½ ریزنمونه‌های گلابی در محیط کشت فاقد ایندول بوتیریک اسید و پوتریسین ریشه‌زایی نداشتند و مانند محیط کشت MS استفاده از این دو نوع تنظیم‌کننده رشد در محیط کشت برای ریشه‌زایی ضروری بوده است. بالاترین درصد ریشه‌زایی (۸۸ درصد) در تیمار ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر ایندول بوتیریک اسید به‌همراه ۲۵ میلی‌گرم در لیتر پوتریسین مشاهده شد (شکل B-۱).



شکل ۱. مقایسه میانگین اثر متقابل ایندول بوتیریک اسید و پوتریسین بر ریشه‌زایی ریزنمونه‌های گلابی پایه پیرودوارف در محیط‌های کشت MS (A) و ½ MS (B).

Figure 1. Mean comparison interaction effect of indole butyric acid and putrescine on root induction of pyrodwarf rootstock explants in MS (A) and ½ MS (B) mediums.

استفاده از ایندول بوتیریک اسید و پوتریسین سبب افزایش طول ریشه ریز نمونه‌های گلابی در محیط کشت MS گردید و بیشترین طول ریشه در تیمارهای دارای ۱ میلی‌گرم در لیتر ایندول بوتیریک اسید به‌علاوه ۷۵ میلی‌گرم در لیتر پوتریسین (۶/۲۶ سانتی‌متر) و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر ایندول بوتیریک اسید بعلاوه ۵۰ میلی‌گرم در لیتر پوتریسین (۶/۱ سانتی‌متر) ثبت گردید (شکل A-۲). در محیط کشت MS ½ بین تیمارهای مختلف تفاوت معنی‌داری از نظر طول ریشه مشاهده گردید. در تیمارهای فاقد ایندول بوتیریک اسید با افزایش غلظت پوتریسین طول ریشه نیز افزایش قابل‌ملاحظه‌ای نشان دادند. بر اساس شکل B-۲ بیشترین طول ریشه در تیمار ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر ایندول بوتیریک اسید به همراه ۲۵ میلی‌گرم در لیتر پوتریسین حاصل گردید.



شکل ۲. مقایسه میانگین اثر متقابل ایندول بوتیریک اسید و پوتریسین بر طول ریشه ریز نمونه‌های گلابی پایه پیرودوارف در محیط‌های کشت MS (A) و ½ MS (B).

Figure 2. Mean comparison interaction effect of indole butyric acid and putrescine on root length of pyrodwarf rootstock explants in MS (a) and ½ MS (b) mediums.

از مهم‌ترین مراحل در تولید پایه‌های درختان میوه از طریق کشت بافت، القای موفقیت‌آمیز ریشه‌زایی در

Archive of SID.ir

Archive of SID.ir

ریز قلمه‌های حاصل از مرحله پرآوری می‌باشد. براساس گزارش Sabatini *et al.* (1999) تمایز آغازین‌های ریشه از سلول‌های پارانشیم فلوئم بستگی به نوع و غلظت اکسین مورد استفاده دارد. همچنین گزارش شده است که سلول‌های تمایز یافته نیاز به نوع و غلظت مناسبی از اکسین دارند تا قادر باشند به علائم و سیگنال‌های ارگانوژنیک پاسخ دهند (Blakesley & Chaldecott, 1997).

در پژوهش حاضر از دو محیط کشت MS و ½ MS با استفاده از غلظت‌های مختلف تنظیم‌کننده رشد ایندول بوتیریک اسید برای ریشه‌زایی شاخساره‌های درون‌شیشه‌ای گلابی پایه پیرودوارف استفاده شد که درصد ریشه‌زایی و طول ریشه‌های باززایی شده در محیط کشت ½ MS به ترتیب ۴۱/۶۷ و ۱۲/۳۰ درصد بیشتر از محیط کشت MS بود. نتایج مختلفی از نظر مناسب‌ترین محیط کشت و تنظیم‌کننده‌های رشد برای ریزازدیادی ارقام مختلف گلابی گزارش شده است. محیط کشت MS توسط بیش‌تر پژوهشگران در ریزافزایی و ریشه‌زایی گلابی مورد استفاده قرار گرفته است (Kadota & Niimi, 2003; Shibli *et al.*, 1997). استقرار و ریشه‌زایی موفقیت‌آمیز ریز نمونه‌های گلابی با استفاده از محیط کشت MS با نصف غلظت نمک‌های ماکرو و میکرو توسط Ruzic *et al.* (2011) گزارش شده است. برای ریشه‌دار کردن شاخساره‌های درون‌شیشه‌ای هم گروه‌های گلابی از محیط کشت MS و QL (Quoirin & Lepoivre) با نصف یا یک چهارم غلظت نمک‌ها استفاده کرده‌اند (Sun *et al.*, 2009). همچنین تعیین مناسب‌ترین محیط کشت برای پرآوری و ریشه‌زایی گیاهان مختلف بستگی به ژنوتیپ، نور، نوع نمک‌ها و ترکیبات قندی مورد استفاده دارد (Bell *et al.*, 1999; Roozban *et al.*, 2002; Abdollahi *et al.*, 2006; Sun *et al.*, 2009). میزان ریشه‌زایی ریزنمونه‌های ارقام مختلف گلابی علاوه بر نوع محیط کشت بستگی به نوع و مقدار تنظیم‌کننده‌های مورد استفاده دارد. بررسی اثر ایندول بوتیریک اسید و پوتریسین بر ریشه‌زایی شاخساره‌های پیرودوارف نشان داد که استفاده از این ترکیبات برای ریشه‌زایی ریزنمونه‌های درون‌شیشه‌ای پایه پیرودوارف گلابی ضروری می‌باشد و در محیط کشت فاقد تنظیم‌کننده رشد هیچ نوع ریشه‌زایی مشاهده نشد. در هر دو نوع محیط کشت (MS و ½MS) بالاترین درصد ریشه‌زایی در تیمار ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر ایندول بوتیریک اسید و ۲۵ میلی‌گرم در لیتر پوتریسین حاصل شد. استفاده از ایندول بوتریریک اسید و نفتالین استیک اسید در ریشه‌زایی درون‌شیشه‌ای شاخساره‌های تولید شده *P. syriaca* اثرات مثبتی داشت که حداکثر ریشه‌زایی (۷۲ درصد) در محیط کشت MS دارای ۳ میلی‌گرم در لیتر IBA بوده است (Shibili *et al.*, 1997). ایندول بوتیریک اسید در القای ریشه‌زایی ریز نمونه‌های پایه گلابی *P. betuleafilia* بسیار مؤثر بوده است و بالاترین درصد ریشه‌زایی در ریز قلمه‌های کشت شده در محیط کشت ½ MS دارای ۲ میلی‌گرم در لیتر IBA گزارش شده است (Hassanen & Gabr, 2012). همچنین بالاترین درصد ریشه‌زایی در ریز قلمه‌های پایه OH×F 230 در محیط کشت دارای IBA گزارش شده است. استفاده از IBA برای ریشه‌زایی هم‌گروه‌های دیپلوئید، تریپلوئید و تتراپلوئید گلابی مؤثر بوده است (Sun *et al.*, 2009). درصد ریشه‌زایی، تعداد ریشه در هر ریز نمونه و طول ریشه‌چه در گلابی *P. pashia* تحت تأثیر نوع محیط کشت و تنظیم‌کننده‌های رشد گزارش شده است. NAA با غلظت ۱ میلی‌گرم در لیتر و IBA با غلظت ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر در محیط کشت MS با نصف غلظت عناصر ماکرو و میکرو به ترتیب عامل القای ۲۷/۴۶ و ۱۴/۰۸ درصد ریشه‌زایی در ریز قلمه‌های *P. pashia* گردیده‌اند (Rehman *et al.*, 2014). طبق گزارش Hausman (2003) کارایی بالای IBA در القای ریشه‌زایی، به علت سرعت کند اکسیداسیون این ترکیب در داخل بافت‌های گیاهی می‌باشد. استفاده از IBA برای افزایش ۱۰۰ درصدی ریشه‌زایی شاخه‌های باززایی شده پایه پیرودوارف مؤثر گزارش شده است (Ruzic *et al.*, 2008; 2011).

در مورد تأثیر پلی‌آمین‌ها بر ریشه‌زایی ارقام مختلف گلابی گزارشی یافت نشد و به نظر می‌رسد پژوهش حاضر اولین گزارش در مورد اثر پوتریسین بر ریشه‌زایی گلابی پایه پیرودوارف در شرایط درون‌شیشه‌ای باشد. بطورکلی نتایج محققان پیشین نشان داده است که استفاده از پوتریسین اثر افزایشی در ریشه‌زایی و طول

Archive of SID.ir

Archive of SID.ir

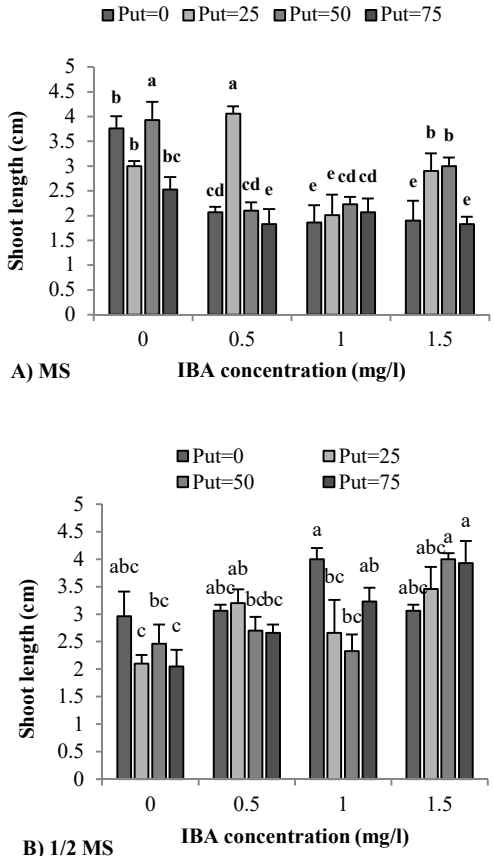
ریشه همراه با ایندول بوتیریک اسید داشت (De Gyves *et al.*, 2007; Cristofori *et al.*, 2010).

استفاده از پلی‌آمین‌ها برای القای ریشه‌زایی در ریز نمونه‌های پایه‌های گیاهان چوبی گزارش شده است. پوتریسین از جمله ترکیبات پلی‌آمینی است که نه تنها سمّیت اندکی داشته، بلکه القای ریشه‌زایی را تسریع می‌کند. در حقیقت به نظر می‌رسد پلی‌آمین‌ها در فرآیندهای متعددی شامل تقسیمات سلولی، سنتز پروتئین‌ها و اسیدهای نوکلئیک نقش اساسی دارند و بنابراین اثرات متعددی در تکامل و اندام‌زایی گیاهان مختلف دارند (Tiburcio & Alcázar, 2018). طبق گزارش Karimi & Yadollahi (2012) استفاده از غلظت‌های پایین پوتریسین در مقایسه با ایندول بوتیریک اسید در القای ریشه‌زایی ریز نمونه‌های پایه GF 677 (هیبرید هلو و بادام) مؤثرتر بوده است.

طول شاخه

غلظت‌های مختلف ایندول بوتیریک اسید و پوتریسین اثرات متفاوتی بر رشد شاخه‌های کشت شده پایه پیرودوارف در محیط کشت MS داشت و استفاده از غلظت‌های ۵۰ میلی‌گرم در لیتر پوتریسین و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر ایندول بوتیریک اسید به همراه ۲۵ میلی‌گرم در لیتر پوتریسین رشد طولی شاخه‌های کشت شده را به ترتیب به میزان ۴/۵ و ۸ درصد نسبت به طول شاخه‌های تیمار شاهد افزایش دادند (شکل A-۳). در محیط کشت MS ½ بالاترین طول شاخه در تیمارهای دارای ایندول بوتیریک اسید و پوتریسین تفاوت معنی‌داری با نمونه شاهد نداشتند و حداکثر طول شاخه ۴ سانتی‌متر بود که در تیمار ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر ایندول بوتیریک اسید به همراه ۷۵ میلی‌گرم در لیتر پوتریسین مشاهده گردید (شکل B-۳).

میزان رشد شاخساره‌های کشت‌شده گلابی پیرودوارف در محیط کشت MS و ½ MS تقریباً مشابه بود که در ترکیبی از ایندول بوتیریک اسید و پوتریسین بالاترین رشد ثبت گردید. میزان پرآوری، طول و تعداد شاخه در ریزازدیادی گلابی به غلظت تنظیم‌کننده‌های رشد در محیط کشت، نوع محیط کشت، هورمون‌های افزودنی دیگر و رقم مورد استفاده بستگی دارد. در اکثر آزمایش‌های انجام شده استفاده از سایتوکینین‌ها برای پرآوری شاخساره‌های کشت شده گلابی گزارش شده است (Shibli *et al.*, 1997). برای شاخه‌زایی رقم بوره بوسک، محیط MS همراه با ۵ میکرومولار بنزیل آدنین و ۰/۶ میکرومولار GA_3 و ۰/۵ میکرومولار IBA پیشنهاد شده است (Bell *et al.*, 1999). عرضه پوتریسین خارجی در غلظت ۴۰ میلی‌مولار منجر به افزایش تعداد شاخه‌ها و طول ساقه در شرایط درون‌شیشه‌ای در گیاه *Cichorium intybus* گردیده است. نقش تحریکی پوتریسین روی باززایی ریز نمونه‌ها ممکن است از طریق ایجاد تغییر مناسب در سلول‌های مستعد و تبدیل آن‌ها به جنین باشد. پلی‌آمین‌ها برای رشد و نمو متعادل گیاهچه‌ها یعنی رشد همزمان شاخه‌ها و ریشه‌ها مفید هستند (Bias *el al.*, 2000).



شکل ۳. مقایسه میانگین اثر متقابل ایندول بوتیریک اسید و پوتریسین بر طول شاخه ریز نمونه‌های گلابی پایه پیرودوارف در محیط‌های کشت MS (A) و ½ MS (B).

Figure 3. Mean comparison interaction effect of indole butyric acid and putrescine on shoot length of pyrodwarf rootstock explants in MS (A) and ½ MS (B) mediums.

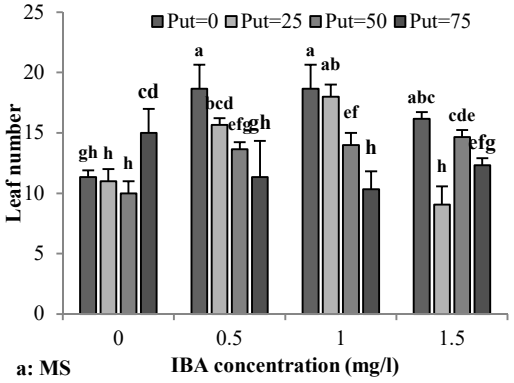
Archive of SID.ir

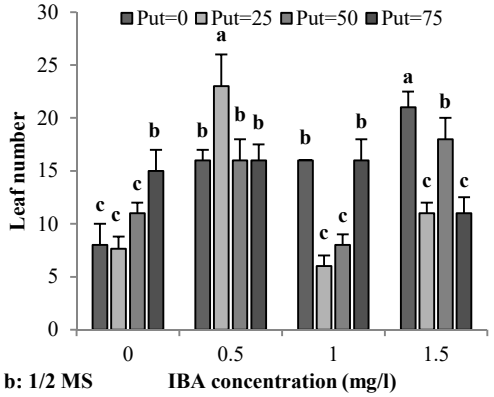
Archive of SID.ir

تعداد و طول برگ و تعداد میانگره

تعداد برگ نمو یافته در شاخه‌های گلابی به‌طور معنی‌داری تحت تأثیر تنظیم‌کننده‌های رشد قرار گرفته بود. در محیط کشت MS استفاده از ایندول بوتیریک اسید به تنهایی اثر بسیار بارزتری در افزایش تعداد برگچه‌های ریز نمونه‌های کشت شده داشت. به‌طوری‌که بیشترین تعداد برگ در غلظت‌های ۰/۵ (۱۸/۶۶ برگ) و ۱ (۱۸/۶۶ برگ) میلی‌گرم در لیتر ایندول بوتیریک اسید مشاهده شد (شکل ۴- الف). در محیط کشت MS ½ بیشترین تعداد برگ در محیط کشت‌های دارای ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر ایندول بوتیریک اسید + ۲۵ میلی‌گرم در لیتر پوتریسین (۲۳ برگ) و محیط دارای ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر ایندول بوتیریک اسید و فاقد پوتریسین (۲۱ برگ) ثبت گردید (شکل ۴، ب). تعداد برگ در شاخساره‌های کشت شده گلابی در محیط کشت MS ½ در حدود ۲۳/۲۶ درصد بیشتر از محیط کشت MS بود که در محیط کشت MS اثر ایندول بوتیریک اسید در افزایش تعداد برگ بارزتر بود و در محیط کشت MS ½ بیشترین تعداد برگ در محیط‌های کشت دارای ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر ایندول بوتیریک اسید بعلاوه ۲۵ میلی‌گرم در لیتر پوتریسین (۲۳ برگ) و محیط دارای ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر ایندول بوتیریک اسید و فاقد پوتریسین (۲۱) ثبت گردید.

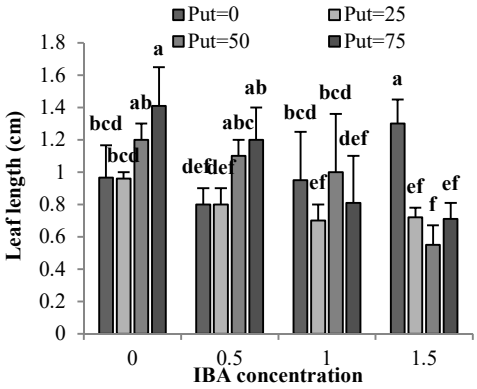
در محیط کشت MS میانگین طول برگ‌های باززایی شده در ریز نمونه‌های کشت شده پیرودوارف در محیط کشت فاقد تنظیم‌کننده‌های رشد ۰/۹۷ سانتی‌متر بود و تیمارهای ۷۵ میلی‌گرم در لیتر پوتریسین و ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر ایندول بوتیریک اسید به ترتیب به میزان ۴۶ و ۳۴/۵۷ درصد سبب افزایش قابل توجه طول برگ‌ها نسبت به ریز نمونه‌های شاهد گردید (شکل ۵). در محیط کشت ½ MS اثر ایندول بوتیریک اسید و پوتریسین بر طول برگ‌های باززایی شده معنی‌دار نبود. بیشترین طول برگ در محیط کشت MS در تیمارهایی که دارای بالاترین غلظت ایندول بوتیریک اسید (۱/۳ سانتی‌متر) و یا پوتریسین (۱/۴ سانتی‌متر) بود، حاصل شد. در محیط کشت MS ½ طول برگ تحت تأثیر تیمارهای مورد بررسی قرار نگرفته بود.





شکل ۴. مقایسه میانگین اثر متقابل ایندول بوتیریک اسید و پوتریسین بر تعداد برگ ریزنمونه‌های گلابی پایه پیرودوارف در محیط‌های کشت MS (A) و ½ MS (B).

Figure 4. Mean comparison interaction effect of indole butyric acid and putrescine on leaf number of pyrodwarf rootstock explants in MS (A) and ½ MS (B) mediums.



شکل ۵. مقایسه میانگین اثر متقابل ایندول بوتیریک اسید و پوتریسین بر طول برگ‌های باززایی شده ریزنمونه‌های گلابی پایه پیرودوارف در محیط کشت MS.

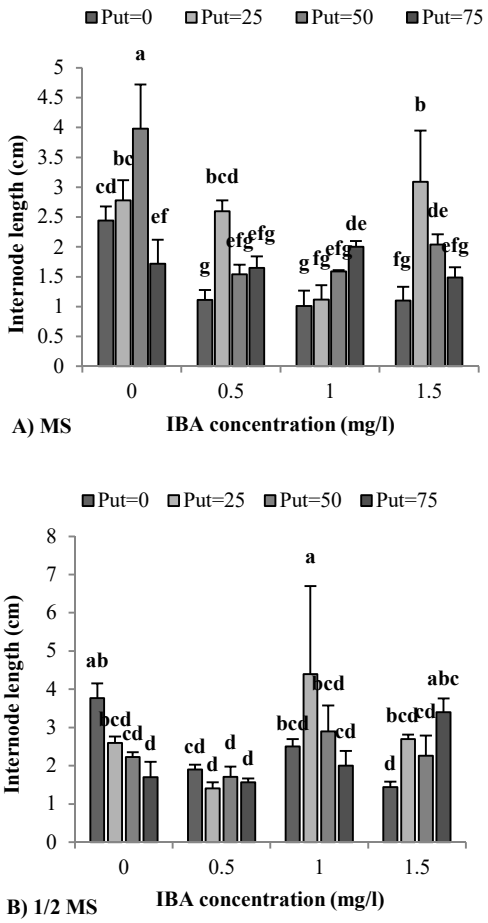
Figure 5. Mean comparison interaction effect of indole butyric acid and putrescine on length of regenerated leaves of pyrodwarf rootstock explants in MS medium.

Archive of SID.ir

Archive of SID.ir

استفاده از ایندول بوتیریک اسید در محیط کشت MS به تنهایی سبب کاهش معنی‌دار طول میانگره شاخساره‌های کشت شده گلابی گردید. به‌طوری‌که کوتاه‌ترین میانگره‌ها در تیمارهای دارای غلظت‌های مختلف ایندول بوتیریک اسید (۰/۵، ۱ و ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر) و فاقد پوتریسین مشاهده شد. با این وجود بیشترین طول میانگره در ریزنمونه‌های کشت شده در محیط کشت دارای ۵۰ میلی‌گرم در لیتر پوتریسین (۳/۹۸ سانتی‌متر) و فاقد ایندول بوتیریک اسید مشاهده گردید (شکل A-۶). در محیط کشت ½ MS از نظر طول میانگره دو تیمار ۱ میلی‌گرم در لیتر ایندول بوتیریک اسید+ ۲۵ میلی‌گرم در لیتر پوتریسین و ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر ایندول بوتیریک اسید+ ۷۵ میلی‌گرم در لیتر پوتریسین به ترتیب با ۴/۴ و ۳/۴ برگ در هر شاخه تفاوت معنی‌داری با نمونه شاهد نداشتند ولی با سایر تیمارها این تفاوت معنی‌دار بود (شکل B-۶). بیشترین طول میانگره در محیط کشت MS (۳/۹۸ سانتی‌متر) در محیط فاقد ایندول بوتیریک اسید و دارای ۵۰ میلی‌گرم در لیتر پوتریسین حاصل شد. در محیط ½ MS بیشترین طول میانگره (۴/۴ سانتی‌متر) در محیط کشت دارای یک میلی‌گرم در لیتر ایندول بوتیریک اسید و ۲۵ میلی‌گرم در لیتر پوتریسین مشاهده گردید.

توسعه برگ ریزنمونه‌ها می‌تواند تحت تأثیر محیط کشت قرار گیرد (Abdollahi *el al.*, 2006). عوامل محیطی مثل دما، نور و طول مدت روشنایی در کنار ترکیب هورمونی محیط کشت، می‌تواند باعث بهبود صفات رشدی ریز نمونه‌ها شود (Abdollahi *el al.*, 2006). در طول مراحل مختلف نمو گیاهان میزان سنتز پلی‌آمین‌ها متغیر است و در مرحله تقسیم سلولی میزان سنتز پلی آمین‌ها به بیشترین میزان خود می‌رسد. افزایش بیوسنتز این ترکیبات در بافت‌های در حال رشد از جمله تشکیل آغازنده‌های برگ با افزایش رشد گیاهان همبستگی دارد (Arias *et al.*, 2005). وجود پلی آمین‌ها در تمام اندام‌های گیاهی مبین نقش کلیدی آن‌ها در تنظیم رشد گیاهان می‌باشد (Kaur-Sawhney *et al.*, 1980).



شکل ۶. مقایسه میانگین اثر متقابل ایندول بوتیریک اسید و پوتریسین بر طول میانگره ریزنمونه‌های گلابی پایه پیرودوارف در محیط کشت MS (A) و ½ MS (B).

Figure 6. Mean comparison interaction effect of indole butyric acid and putrescine on internode length of pyrodwarf rootstock explants in MS (A) and ½ MS (B) mediums.

نتیجه‌گیری کلی

بررسی اثر ایندول بوتیریک اسید و پوتریسین بر ریشه‌زایی شاخساره‌های پیرودوارف نشان داد که استفاده از این ترکیبات برای ریشه‌زایی ریزنمونه‌های درون‌شیشه‌ای ضروری می‌باشد و در محیط کشت فاقد تنظیم‌کننده‌های رشد هیچ نوع ریشه‌زایی مشاهده نشد. درصد ریشه‌زایی و طول ریشه‌های باززایی شده در محیط کشت ½ MS بیشتر از محیط کشت MS کامل بود. بر اساس نتایج به‌دست‌آمده استفاده از محیط کشت ½ MS همراه با ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر ایندول بوتیریک اسید و ۲۵ میلی‌گرم در لیتر پوتریسین برای حداکثر ریشه‌زایی در گلابی پایه پیرودوارف قابل توصیه می‌باشد.

Archive of SID.ir

Archive of SID.ir

REFERENCES

1. Abdollahi, H., Rosario, M., & Eddo, R. (2006). Optimisation of regeneration and maintenance of morphogenic callus in pear (*Pyrus communis* L.) by simple and double regeneration techniques. *Scientia Horticulturae*, 108, 352-358.
2. Arias, M., Carbonell, J., & Agusti, M. (2005). Endogenous free polyamines and their role in fruit set of low and high parthenocarpic ability citrus cultivars. *Journal of Plant Physiology*, 126(8), 845-853.
3. Bell, R.L., Scorza, R., Srinivasan, C.H., & Weeb, K. (1999). Transformation of Beurre Bosc pear with the rolc gene. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 124(6), 570-574.
4. Bias, H.P., Sudha, G.S., & Ravishankar, G.A. (2000). Putrescine and silver nitrate influences shoot multiplication, *in vitro* flowering and endogenous titers of polyamines in *Circhoorium intybus* L. cv. Lucknow local. *Journal of Plant Growth Regulation,* 19, 238-248.
5. Blakesley, D., & Chaldecott, M.A. (1997). The role of endogenous auxin in root initiation. *Plant Growth Regulators*, 13(1), 77-84.
6. Cristofori, V., Rouphael, Y., & Rugini E. (2010). Collection time, cutting age, IBA and putrescine effects on root formation in *Corylus avellana* L. cuttings. *Scientia horticulturae*, 124(2), 189-194.
7. De Gyves, E. M., Royani, J. I., & Rugini, E. (2007). Efficient method of micropropagation and *in vitro* rooting of teak (*Tectona grandis* L.) focusing on large-scale industrial plantations. *Annals of Forest Science*, 64(1), 73-78.
8. El-Sharnouby, M.E., & Essam, E.R. (2006). Micropropagation of pear rootstock *(Pyrus Communis*) by using tissue culture technique and gamma irradiation. *Isotope and Radiation Research*, 38(4), 1195-1202.
9. Hassanen, S.A., & Gabr, M.F. (2012). *In vitro* propagation of pear *Pyrus betulaefolia* rootstock. *American-Eurasian Journal of Agricultural & Environmental Sciences*, 12(4), 484-489.
10. Hausman, J.F. (2003). Changes in peroxidase activity, auxin level and ethylene production during root formation by poplar shoots raised in vitro. *Plant Growth Regulators*, 13(3), 263-268.
11. Kadota, M., & Niimi, Y. (2003). Effects of cytokinion types and their concentrations on shoot proliferation and hyperhydricity in in vitro pear cultivars shoots. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 72, 201-265.
12. Karimi, S., & Yadollahi, A. (2012). Using putrescine to increase the rooting ability of hardwood cuttings of the peach × almond hybrid GF677. *Journal of Agrobiology,* 29(2), 63-69.
13. Kaur-Sawhney, R., Flores, H.E., & Gaston, A.W. (1980). Polyamin-induced DNA synthesis and mitosis in oat leaf protoplasts. *Plant Physiology*, 65, 368-370.
14. Murashige, T., & Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15, 473-497.
15. Paprstein, F., Sedlak, J., Sillerova, J., & Korba, J. (2013, July). *In vitro* evaluation of cultivar resistance to fire blight. *In XIII International Workshop on Fire Blight,* 29 October 2014, Zurikh, Switzerland, pp. 259-262.
16. Rehman, H.U., Gill, M.I.S., Sidhu, G.S., & Dhaliwal, H.S. (2014). Micropropagation of Kainth (*Pyrus pashia*) - an important rootstock of pear in northern subtropical region of India. *Journal of Experimental Biology and Agricultural Sciences*, 2(2), 188-196.
17. 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).
18. Rugini, E., Jacoboni, A., & Luppino, M., (1993). Role of basal shoot darkening and exogenous putrescine treatments on *in vitro* rooting and on endogenous polyamine changes in difficult-to-root woody species. *Scientia Horticulturae*, 53, 63-72.
19. Rugini, E., Politi, V., Bignami, C., De Agazio, M., & Grego, S. (1989). Effect of polyamine treatments on rooting cutting of three olive cultivars. 1 December 1989, *In International Symposium on Olive Growing*, pp. 97-100.
20. Ruzic, D.J., Vujovi, T., Milenkovi, S., Cerovi, R., & Mileti, R. (2008). The infuence of Imidazole fungicides on multiplication in vitro of Pyrodwarf pear rootstock. *Australian Journal of Crop Science*, 1(2), 63-68.
21. Ruzic, D.J., Vujovic, T., Nikolic, D., & Cerovic, R. (2011). In vitro growth responses of the 'Pyrodwarf' pear rootstock to cytokinin types. *Romanian Biotechnological Letters*, 16(5), 6630-6637.
22. Sabatini, S., Beis, D., Wolkenfelt, H., & Murfett, J. (1999). An auxin-dependent distal organizer of pattern and polarity in the Arabidopsis root. *Cell*, 99(5), 463-472.
23. Sun, Q., Sun, H., & Bell, R.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.

Archive of SID.ir

Archive of SID.ir

24. Tiburcio, A. F., & Alcázar, R. (2018). Potential applications of polyamines in agriculture and plant biotechnology. In Polyamines (pp. 489-508). Humana Press, New York, NY.
25. Vujović, T., Ružić, D. J., & Cerović, R. (2012). *In vitro* shoot multiplication as influenced by repeated subculturing of shoots of contemporary fruit rootstocks. *Horticultural Science,* 39(3), 101-107
26. Wu, Q.S., Zou, Y.N., & He, X.H. (2010). Exogenous putrescine, not spermine or spermidine, enhances root mycorrhizal development and plant growth of trifoliate orange (*Poncirus trifoliata*) seedlings. *International Journal of Agricultural and Biological Engineering*, 12, 576-580.
27. Zimmerman, R.H., Bhardwaj, S.V., & Fordham, I.M. (1995). Use of starchgelled medium for tissue culture of some fruit crops. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 43(3), 207-213.

Archive of SID.ir