مجله بیوتکنولوژی کشاورزی

علمی-پژوهشی و ISC

بررسی رشد، تکثیر و ریشه‌زایی ارقام مختلف گلابی بومی ایران به منظور حفاظت درون شیشه‌ای

فریبا بختیاری[1]، جواد مظفری*[2]، حمید عبداللهی[3]

[1]دانشجوی کارشناسی ارشد علوم باغبانی واحد کرج، دانشگاه آزاد اسلامی، کرج، ایران.

[2*]استاد بخش ژنتیک و بانک ژن گیاهی ملی ایران، مؤسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران.

[3]دانشیار موسسه علوم باغبانی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی کرج، ایران.

تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۰۶/۲۳، تاریخ پذیرش: ۱۳۹۵/۱۱/۱۹

چکیده

تکثیر رویشی گلابی از طریق روشهای معمول قلمه چوب نرم یا سخت مشکل می‌باشد. بنابراین امکان تکثیر و ایجاد کلکسیون درون شیشه‌ای، در ۱۰ رقم بومی گلابی ایران مورد مطالعه قرار گرفت. برای این منظور ابتدا صفات رشد گیاهچه‌ها از قلمه‌های تک‌گره نرم این ارقام بر روی محیط کشت MS حاوی تنظیم کننده‌های رشد بررسی شد. در این مرحله پس از گذشت سه هفته از کشت ریز نمونه‌ها، ارقام نطنزی و قوسی با میانگین ٤/٧٥ روز زودترین زمان القاء رشد و رقم خوج با میانگین ۲۰/۷۵ روز دیرترین زمان القاء رشد را نشان داد. ارقام قوسی و نطنزی بیش‌ترین تعداد برگ و ارتفاع شاخساره را به خود اختصاص دادند. سپس تکثیر درون شیشه‌ای گیاهچه‌های این ارقام در محیط کشت QL تغییر یافته حاوی تنظیم کننده‌های رشد مورد مطالعه قرار گرفت. در گیاهچه‌های تکثیر شده درون شیشه‌ای، رقم قوسی به صورت متوسط بیش‌ترین تعداد برگ تکثیر شده و بالاترین ارتفاع گیاه را تولید کرد. ارقام بیروتی و شاه میوه کمترین رشد را نشان دادند. همچنین ریشه‌زایی ارقام منتخب گلابی در غلظت‌های مختلف اکسین (IBA) بر روی محیط کشت QL تغییر یافته مطالعه شد. در غلظت‌های ۰/۵ و ۲ میلی‌گرم در لیتر IBA در هیچ یک از ارقام ریشه‌زایی مشاهده نشد، در حالی‌که همه ارقام مورد بررسی در غلظت ۱ میلی‌گرم در لیتر ریشه‌دار شدند. بیش‌ترین تعداد ریشه در رقم قوسی و کمترین میزان آن در ارقام نطنزی و سردرودی مشاهده گردید. رقم شاه میوه دارای بیش‌ترین طول ریشه و ارقام سردرودی و قوسی دارای کمترین طول ریشه بودند. نتایج این تحقیق نشان داد که تکثیر و ریشه‌دار نمودن ارقام گلابی بومی ایران در شرایط درون شیشه به راحتی امکان‌پذیر بوده ولی صفات رشد و تکثیر آن‌ها تحت تاثیر ژنوتیپ (رقم) می‌باشد. همچنین در این تحقیق اولین کلکسیون حفاظت درون شیشه‌ای ذخایر ژنتیکی گلابی در ایران با موفقیت ایجاد گردید.

واژه‌های کلیدی: *گلابی، ذخایر ژنتیکی، تکثیر درون شیشه‌ای، تنظیم کننده‌های رشد، کشت بافت.*

* نویسنده مسئول: جواد مظفری تلفن: ۰۹۱۲۳۷٦۳٤٥۷ Email: jmozafar@yahoo.com

مقدمه

گلابی با نام علمی *Pyrus communis* متعلق به خانواده رزاسه (Rosaceae) و زیر خانواده (Pomoideae) می‌باشد که بعد از سیب مهم‌ترین میوه دانه‌دار در سطح جهان محسوب می‌شود (Ahmed and Anjum, 2010). طعم و مزه و قابلیت هضم بالای میوه گلابی باعث شده که این میوه محبوبیت زیادی بین مصرف کنندگان داشته باشد (Ahmed and Anjum, 2010). تولید گلابی طی ۱۰ سال منتج به سال زراعی 2005 روند صعودی پیوسته‌ای را در جهان نشان داده است. این روند افزایشی بیشتر ناشی از توسعه و افزایش تولید گلابی در کشور چین می‌باشد (Abdollahi, 2014). ایران با دارا بودن بیش از ده گونه از جنس گلابی به عنوان یکی از مراکز تنوع ژنتیکی گلابی شناخته شده است. ارقام مورد کشت در مناطق گلابی‌خیز ایران اغلب شامل ارقام بومی شاه میوه، نطنزی، سردرودی، سه فصله، تاشکندی، سبری، درگزی، بیروتی، قوسی، فلسطینی، دم‌کج و ارقام وارداتی مانند ویلیامز[1]، دوشس[2]، اسپادونا[3]، ویلیامز دوشس[4]، آنجو[5]، ژاندارک[6]، پاسه کولمار[7] و دوینه‌دوکومیس[8] می‌باشد که در سال‌های اخیر تغییر قابل توجهی داشته است (Abdollahi, 2015). ارقام مختلف گلابی در بیش از ۷٦ کشور جهان کشت و کار می‌شود به طوری که کشورهای چین، ایتالیا، امریکا، آرژانتین، اسپانیا، کره جنوبی، ترکیه، آفریقای جنوبی و ژاپن به ترتیب عمده‌ترین کشورهای تولید کننده گلابی در جهان محسوب می‌شوند که کشور چین با تولیدی بیش از ۱۷ میلیون تن مقام اول تولید گلابی را در جهان دارد. ایران هم از نظر میزان تولید گلابی با بیش از ۱۳٦ هزار تن در جهان در مقام ۱۸ قرار دارد (FAO, 2013).

با توجه به اینکه منابع ژنتیکی در کنار آب و خاک یکی از سه نهاده پایه‌ای تولید می‌باشد حفاظت و بهره‌برداری موثر از آن برای افزایش و پایداری تولید از اهمیت زیادی برخوردار است. این در حالی است که حفاظت منابع ژنتیکی درختان میوه از جمله گلابی از طریق نگهداری بذر آن در سردخانه‌های بانک‌های ژن میسر نیست. از طرف دیگر تهدیدات کلکسیون‌های گیاهی زنده در مزرعه و عرصه‌های طبیعی با عواملی مانند آفات و بیماری‌ها، خشکی، شوری، گرما و سرمای غیر متعارف و بلایای طبیعی دیگر و همچنین تخریب رویشگاه‌ها توسط انسان موجب شده است که حفاظت ژرم‌پلاسم درختان میوه به صورت باغ‌های کلکسیون روش موثر و مناسبی نباشد. علاوه بر موارد فوق، ایجاد باغ کلکسیون در مورد گیاهانی مانند گلابی مشکلات اجرائی دیگری نیز از جمله مشکلات تکثیر و ریشه‌دار کردن، بالا بودن

1-Williams
2-Duchesse
3-Spadona
4-Williams Duchesse
5-Anjou
6-Janne dark
7-Passe colmar
8-Doyenne du comice

هزینه‌های کاشت و نگهداری، کمبود آب و تغییرات ناگهانی آب و هوا نیز دارد.

تکثیر و نگهداری گیاهان در سیستم درون شیشه‌ای یا کشت بافت می‌تواند یکی از سیستم‌های بسیار ساده، کارآمد و اقتصادی برای تولید نهال‌های یکنواخت، عاری از بیماری و حفاظت ارقام و مواد ژنتیکی گلابی باشد. اگرچه در حال حاضر روش‌های کارآمد برای کشت بافت گلابی ایجاد شده است اما متغیر بودن نرخ رشد و تکثیر و ریشه‌دار کردن گیاهچه‌های تکثیر شده درون شیشه‌ای همچنان یکی از چالش‌های آن می‌باشد. در واقع قابلیت ریشه‌دار شدن از ژنوتیپی به ژنوتیپی فرق داشته و اختصاصی ژنوتیپ می‌باشد. بنابراین دستیابی به روش جامعی که با استفاده از آن اکثر ارقام گلابی به راحتی تکثیر و ریشه‌دار شوند و بتوان به مدت طولانی آن‌ها را در سیستم کشت بافت نگهداری کرد لازمه‌ی ایجاد بانک درون شیشه‌ای است. در کشت بافت و ریزازدیادی گلابی اکثرا از ریزنمونه‌های نوک ساقه یا تک جوانه بر روی محیط‌های کشت بر پایه MS (Murashinge and Skoog, 1962) حاوی سیتوکینین BAP به طور گسترده‌ای استفاده می‌شود (Thakur *et al*., 2008). در پژوهش‌های قبلی ترکیب مناسب عناصر محیط کشت، مقادیر مناسب تنظیم کننده‌های رشد و رفتارهای ارقام و ژنوتیپ‌های مختلف گلابی در محیط رشد درون شیشه‌ای مورد مطالعه قرار گرفته است. در یک مطالعه برای ازدیاد درون شیشه‌ای پایه پابلند گلابی *(P. calleryana)* بهترین میزان پرآوری شاخساره در محیط کشت MS حاوی 1 میلی‌گرم BAP گزارش شده است (Rossi *et al*., 1991). در تحقیق دیگری اثر نوع و غلظت سایتوکینین 2ip و BAP همراه با پکتین بر روی پرآوری رقم کنفرانس مطالعه شد ۰/۵ در صد پکتین سبب افزایش تعداد و بقاء ریز شاخساره‌ها و توسعه‌ی برگی آن‌ها در ارقام گلابی مورد بررسی شد (Nor Mohammadi *et al*., 2015). در مقایسه رشد سه رقم گلابی بومی شامل ژنوتیپ‌های درگزی، شاه‌میوه و تاشکندی و شش رقم گلابی وارداتی شامل Bartlett, Spadona, Pyrodwarf, Harrow Sweet, Harrow delight, Old home Framing del تفاوت‌های قابل توجهی بین ارقام وارداتی و بومی برای صفات طول ساقه و ریشه‌زایی مشاهده شد. رقم وارداتی Pyrodwarf دارای بیش‌ترین میزان افزایش طول ساقه و درصد ریشه‌زایی بود (Nosrati, 2010).

تکثیر و حفاظت درون شیشه‌ای یک روش جایگزین، ارزان و مطمئن برای حفاظت منابع ژنتیکی و تولید نهال سالم درختان میوه می‌باشد (Viseur, 1987) که در چند دهه اخیر توسعه پیدا کرده است. پیشرفت بیوتکنولوژی گیاهی گزینه‌های جدیدی را برای جمع‌آوری، تکثیر و حفاظت کوتاه یا بلند مدت ذخایر ژنتیکی گیاهی با استفاده از تکنیک‌های کشت درون شیشه فراهم نموده است.

پیشرفت‌های قابل توجهی برای حفاظت از گونه‌های نادر، زینتی، جنگلی و دارویی خصوصاً برای خویشاوندان وحشی گیاهان زراعی و گیاهانی که به صورت رویشی تکثیر می‌شوند بدست آمده است. حفاظت میان مدت درون شیشه‌ای با استفاده از ذخیره‌سازی با رشد آهسته، امکان گسترش واکشت‌ها از چند ماه تا چند سال را به گونه‌ی مورد نظر می‌دهد. مزایای این نوع حفاظت عبارتند از: حفاظت تمامیت ژنتیکی ژنوتیپ‌های دگرگشن در طولانی مدت و در حجم بسیار کم، حفاظت منابع ژنتیکی گیاهانی که تکثیر رویشی دارند، تهیه ایزوله سالم ژرم‌پلاسم برای انتقال از مکانی به مکان دیگر، تولید نتاج زیاد از بافت‌های مختلف یک نمونه در زمان محدود، تولید گیاهان اولیه (هسته‌های بذری) عاری از ویروس می‌باشد (Moradi, 2010).

نیاز به فضای کوچک و سهولت فراهم کردن شرایط مناسب موجب شده است که کشت‌های درون شیشه‌ای روش کاربردی مناسبی جهت حفظ گیاهان مادری کلکسیون‌ها نیز محسوب شوند. از این روش می‌توان برای نگهداری گیاهان زراعی در معرض خطر، گونه‌های کمیاب و گونه‌های غیرزراعی در معرض خطر انقراض بهره گرفت (Moradi, 2010). در راستای ایجاد کلکسیون درون شیشه‌ای گلابی، دستیابی به روشی که طی آن همه ژنوتیپ‌های گلابی بومی کشور به راحتی در سیستم کشت بافت تکثیر و ریشه‌دار شوند برای حفاظت منابع ژنتیکی گلابی حائز اهمیت است. بنابراین در این تحقیق رشد، تکثیر و ریشه‌زایی ارقام بومی گلابی ایران و امکان ایجاد کلکسیون منابع ژنتیکی آن‌ها در شرایط درون شیشه‌ای مورد مطالعه و مقایسه قرار گرفته است.

مواد و روش‌ها

در این تحقیق شاخه‌های نرم یکساله ده رقم منتخب گلابی بومی ایران در اواخر فروردین و اوایل اردیبهشت ماه از باغات کلکسیون گلابی ایران واقع در کرج، مشهد یا اصفهان برداشته شده و در دمای پایین (بر روی یخ) قرار داده شده و به آزمایشگاه کشت بافت بخش تحقیقات ژنتیک و بانک ژن گیاهی ملی ایران واقع در موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر در کرج منتقل گردیدند (جدول ۱).

ریز نمونه‌هایی که شامل یک قلمه نرم دارای یک جوانه بودند تهیه و ضد عفونی سطحی شدند. برای این منظور ابتدا ریزنمونه‌ها با محلول آب و صابون شستشو داده شدند و بعد از گذشت ۲۰ دقیقه، در معرض شستشو با جریان آب ملایم قرار گرفتند.

جدول ۱- ارقام بومی گلابی استفاده شده برای بررسی صفات رشد و تکثیر آنها در شرایط درون شیشه‌ای.

Table 1- Native pear cultivars used to study their growth and proliferation characteristics under *in vitro* conditions.

نام رقم Name of Cultivar	محل کلکسیون Location of Collection	منشا Origin	ویژگی‌ها Characteristics
فلسطینی Felestini	ایستگاه کمالشهر Kamalshahr	البرز Alborze	کیفیت خوب، حساس به آتشک، کم‌رشد Good quality, susceptible to fire blight, low growth
شاه میوه Shahmiveh	ایستگاه کمالشهر Kamalshahr	اصفهان Esfahan	کیفیت خوب، تحمل متوسط به آتشک، متوسط‌رشد Good quality, moderate tolerance to fire blight, medium growth
تاشکندی Tashkandi	ایستگاه کمالشهر Kamalshahr	خراسان Khorasan	کیفیت متوسط، تحمل به آتشک، متوسط رشد Medium quality, tolerance to fire blight, medium growth
درگزیDargazi	ایستگاه کمالشهر Kamalshahr	خراسان Khorasan	کیفیت متوسط، تحمل به آتشک، پررشد Medium quality, tolerance to fire blight, high-growth
نطنزی Natanzi	ایستگاه کمالشهر Kamalshahr	اصفهان Esfahan	کیفیت عالی، کم باره، متوسط‌رشد High quality, low fruiting, medium growth
سردرودی Sardroodi	ایستگاه کمالشهر Kamalshahr	آذر شرقی Azar Sharghi	کیفیت متوسط، حساس به آتشک، متوسط‌رشد Medium quality, susceptible to fire blight, medium growth
سبری Sebri	ایستگاه کمالشهر Kamalshahr	اصفهان Esfahan	کیفیت خوب، حساس به آتشک، متوسط رشد Good quality, susceptible to fire blight, medium growth
خوج Khoj	ایستگاه کمالشهر Kamalshahr	گیلان Gilan	میوه وحشی، حساسیت کم به آتشک، متوسط رشد Wild fruit, susceptible to fire blight, medium growth
قوسی Ghosi	ایسگاه طرق Torogh	خراسان Khorasan	کیفیت متوسط، حساس به آتشک، کم‌رشد Wild fruit, susceptible to fire blight, medium growth
بیروتیBeiruti	ایستگاه کمالشهر Kamalshahr	البرز Alborze	کیفیت عالی، متحمل به آتشک، نسبتاًپررشد High quality, tolerant to fire blight, relatively high growth

جوانه‌ها تحت شرایط استریل، ابتدا به مدت یک دقیقه در الکل ۷۰ درصد و سپس ۱۵ دقیقه در محلول سفید کننده تجاری با ۵ درصد ماده فعال هیپو کلریت سدیم ضد عفونی سطحی گردیدند. به منظور حذف مواد ضد عفونی کننده، سه بار آب‌شویی با آب مقطر استریل در زمان مناسب نیز انجام گرفت. ریز نمونه‌های ضد عفونی شده در زیر هود لامینار پس از خشک شدن بر روی کاغذ صافی استریل، بر روی محیط کشت MS هورمون‌دار استقرار یافتند. گیاهچه‌های استقرار یافته سپس در محیط کشت QL (Quoirin & Lepoiver, 1977) تغییر یافته

تکثیر شدند. کشت‌های درون شیشه‌ای مستقر شده در اتاق رشد به مدت یک ماه و نیم تحت شرایط معمولی ۲٤-۲۲°C و با ۱٦ ساعت روشنائی و ۸ ساعت تاریکی نگهداری شدند. در کشت‌های درون شیشه‌ای ارقام گلابی، صفات رشد شامل تعداد برگ، تعداد شاخساره و ارتفاع گیاه یادداشت برداری گردید.

در آزمون ریشه‌زایی شاخساره‌های ریزازدیادی شده رقم‌های گلابی شاه میوه، نطنزی، سردرودی و قوسی روی محیط کشت QL تغییر یافته (جدول ۲) حاوی تنظیم کننده‌های ریشه‌زایی IBA[1] (SIGMA) با غلظت‌های ۰/۵، ۱ و ۲ میلی‌گرم بر لیتر منتقل شدند. به طوری‌که شاخساره‌ها ابتدا به مدت ۷ تا ۱۰ روز در محیط تاریکی قرار داده شده و سپس همزمان با آغاز کالوس‌های تازه و سفید رنگ در انتهای آنها، به محیط عاری از تنظیم کننده رشد IBA منتقل شدند و به مدت ۳۵ روز در این محیط رشد یافتند. در طی این مدت صفات رشد ریشه، هفته‌ای یک بار شامل تعداد ریشه، طول ریشه و درصد ریشه‌زایی در هر شاخساره یادداشت‌برداری گردید. آزمایش‌ها در مرحله استقرار و تکثیر در قالب طرح کاملا"تصادفی (CRD) در ٤ تکرار و در مرحله ریشه‌زایی اثرات رقم و میزان تنظیم کننده رشد IBA به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی (CRD) با سه تکرار انجام شد. تجزیه واریانس داده‌های صفات مختلف با نرم افزارSAS (Version 9.1) انجام شد. مقایسه میانگین‌ها بر اساس آزمون دانکن در سطح احتمال خطای ۵ و ۱ درصد صورت گرفت. همبستگی دو به دو صفات رشد درون شیشه‌ای، به روش پیرسون بدست آمد.

نتایج و بحث

استقرار در محیط کشت

نتایج تجزیه واریانس نشان داد که اثر ارقام مختلف گلابی بر صفت تعداد برگ گیاه، روز تا القاء رشد و طول شاخساره استقرار یافته بسیار معنی‌دار ($P<0.01$) بود (جدول ۳). نتایج مقایسه میانگین نشان داد که بین ارقام مختلف گلابی در صفت روز تا القاء رشد تفاوت معنی‌دار وجود دارد القا رشد در برخی ارقام طولانی و در بعضی ارقام سریع‌تر اتفاق می‌افتند به‌طوری که بر اساس مقایسه میانگین زمان القا در ارقام مختلف، دیرترین زمان القاء رشد در رقم خوج با میانگین ۲۰/۷۵ روز در گروه a و زودترین زمان القاء رشد در ارقام نطنزی و قوسی با میانگین ٤/۷۵ روز در گروه h حاصل شده است (شکل ۱). همچنین رقم قوسی پس از گذشت ۳ هفته از کشت ریز نمونه‌ها دارای بیش‌ترین میانگین تعداد برگ (٤/۲۵ عدد) و ارتفاع گیاه (۹/۲۵ سانتی‌متر) در گروه a نسبت به بقیه ارقام در مرحله استقرار نشان داد.

[1]- Indolyl butyric acid

جدول ۲- ترکیبات محیط کشت QL تغییر یافته

Table 2. Composition of modified QL medium

ماده شیمیائی	غلظت ماده در محیط (mg/l)
عناصر اصلی Macro-elements	
$CaCl_2$-$2H_2O$	578.92
KNO_3	1800
KH_2PO_4	270
$MgSO_4$-$7H_2O$	175.79
NH_4NO_3	0
عناصر ریز مغذی Micro-elements	
$CoCl_2$-$6H_2o$	0.025
$CuSO_4$-$5H_2O$	0.025
Fe Na-EDTA	36.70
H_3BO_3	6.20
KI	0.08
$MnSO_4$-H_2O	0.76
Na_2MoO_4-$2H_2O$	0.25
$ZnSO_4$-$7H_2O$	8.60
ویتامین‌ها و اسیدهای آمینه Vitamins and amino acids	
Thiamin_HCl	0.8
Pyridoxine-HCl	1.00
Nicotinic-HCl	1.00
Glycine	4.00
Myoinositol	100.00

بعد از آن رقم نطنزی با تعداد ۳/۲۵ برگ، ارتفاع گیاه (٦/٥ سانتی‌متر) در این مرحله جایگاه دوم در گروه b را به خود اختصاص داده است. ارقام شاه میوه، تاشکندی، سبری، خوج و بیروتی با داشتن کم‌ترین تعداد برگ (۲/۲۵) در گروه آخر (گروه C) قرار داشتند (شکل ۱).

به عبارت دیگر تعداد برگ در رقم قوسی در مرحله استقرار نزدیک به دو برابر بعضی از ارقام دیگر بوده است که این نتایج با گزارش وست وود (Westwood, 1993) در انطباق است.

جدول ۳- تجزیه واریانس صفات ارقام مختلف گلابی در مرحله استقرار.

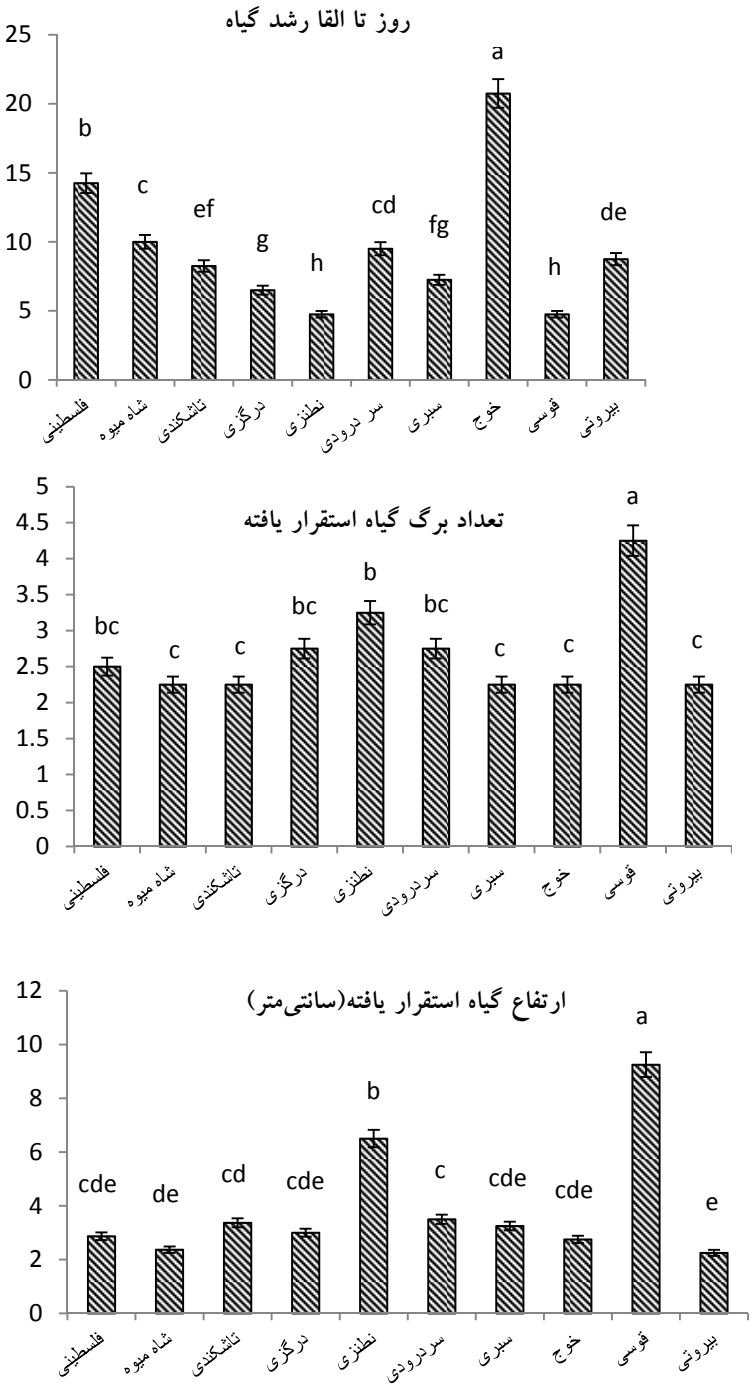
Table 3- Analysis of variance for growth traits of pear cultivars.

منابع تغییرات SOV	درجه آزادی Degrees of freedom	میانگین مربعات (Mean of Squares)		
		تعداد برگ Number of leaves	ارتفاع Height	روز تا القاء Days to growth induction
ژنوتیپ Genotype	9	1.669**	19.764**	93.636**
اشتباه آزمایشی Error	30	0.258	0.418	0.641
ضریب تغییرات (٪) Coefficient of variation		19.01	16.53	8.45

**معنی‌دار در سطح احتمال ۱٪

** Significant difference at 1% level

همچنین کم‌ترین ارتفاع گیاه در این مرحله در رقم بیروتی (۲/۲۵ سانتی‌متر) در گروه e حاصل شد. به عبارت دیگر در رقم قوسی ارتفاع گیاه تقریباً سه برابر بیشتر از رقم بیروتی در مرحله استقرار گردید. افزایش ارتفاع گیاهان در تکنیک کشت بافت دارای مزایایی می‌باشد که از جمله می‌توان به افزایش ضریب تکثیر، قوی‌تر شدن گیاهچه و استقرار مناسب آن در گلخانه اشاره کرد. بنابراین برای یک پروژه ریزازدیادی ارقام قوسی و نطنزی دارای ضریب تکثیر بیشتری در مقایسه با رقم بیروتی است که به تبع این موضوع هزینه ریز-ازدیادی آن نیز کاهش می‌یابد. ارقام گیاهی از نظر مرفولوژیکی و فیزیولوژیکی در پاسخ به محیط اطراف خود بسیار انعطاف پذیرند و این مسئله منجر به بروز پاسخ‌های متفاوتی از سوی گیاهان خواهد شد. به نظر می‌رسد این ارقام در محیط کشت مورد استفاده نسبت به دیگر ارقام واکنش بهتری را به این صفات داشته‌اند (Kroff and Vanlaer, 1993).



شکل ۱- مقایسه میانگین اثر ارقام مختلف گلابی بر صفات روز تا القاء رشد، تعداد برگ و ارتفاع گیاهچه‌ها بر روی محیط کشت MS با استفاده از آزمون دانکن در سطح احتمال ۱٪

Figure 1- Time to growth induction of pear leaf number on plantlet and height planlet cultivars on MS medium, compared base on Duncan multiple ranges test at p<0.01.

تکثیر درون شیشه‌ای

بر اساس نتایج تجزیه واریانس اثر ارقام مختلف گلابی بر صفات رشد گیاهچه‌های تکثیر یافته درون شیشه‌ای بسیار معنی‌دار ($P<0.01$) بود (جدول ٤).

مقایسه میانگین ارقام مختلف گلابی نشان داد که در صفات ارتفاع گیاهچه تکثیر یافته، تعداد برگ تکثیری و تعداد شاخساره تکثیری به ترتیب ارقام قوسی (٤/۲۷) ، قوسی و نطنزی (۳/۷۵)، نطنزی (۵/۵) در (گروه a) دارای بیش‌ترین میزان بودند (شکل۲)

جدول ٤- تجزیه واریانس مربوط به صفات ارقام مختلف گلابی در مرحله تکثیر

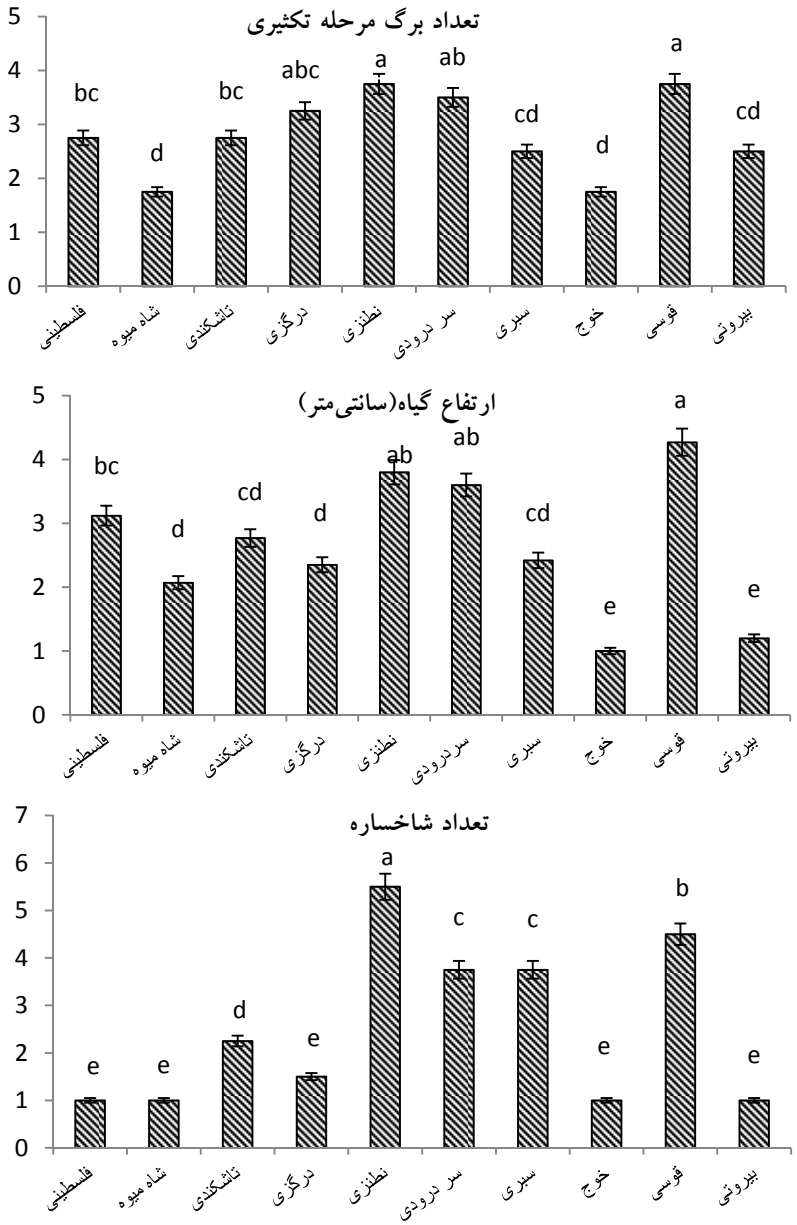
Table 4- Variance analysis for growth traits of Micropropagated pear cultivars

منابع تغییرات SOV	درجه آزادی Degrees of freedom	میانگین مربعات (Mean of Squares)		
		ارتفاع گیاه plant height	تعداد برگ Leaves	تعداد شاخساره Shoot
ژنوتیپ Genotype	9	4.622**	2.169**	11.636**
اشتباه آزمایشی Error	30	0.228	0.275	0.241
ضریب تغییرات (٪) Coefficient of variation		17.97	18.56	19.46

**معنی‌دار در سطح احتمال 1٪.

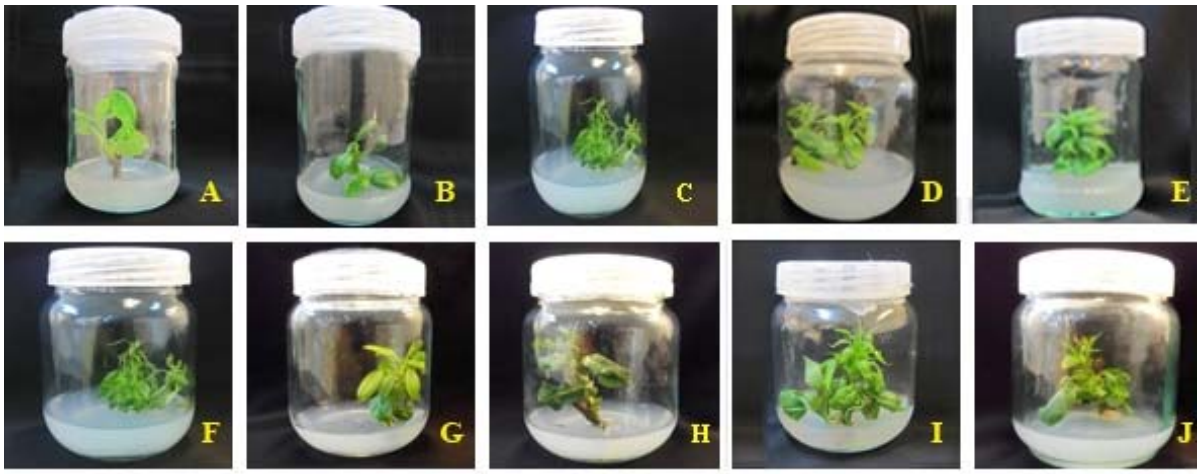
significant difference at 1% level respectively.

در مجموع مراحل استقرار و تکثیر می‌توان به این نتیجه رسید که ارقام قوسی و نطنزی از نظر صفات تعداد برگ، ارتفاع تکثیر یافته، القاء رشد و تعداد شاخساره تشکیل شده دارای بالاترین راندمان می‌باشند و می‌توان این ارقام را در برنامه‌های تکثیری درون شیشه‌ای استفاده نمود (شکل ۳).



شکل ۲- مقایسه میانگین اثر ارقام مختلف گلابی بر صفات ارتفاع گیاه، تعداد برگ و تعداد شاخساره مرحله تکثیری در ارقام مختلف گلابی بر روی محیط کشت QL تغییر یافته با استفاده از آزمون دانکن در سطح احتمال ۱٪.

Figure 2- Mean comparisons of plant height, Number of leaves in different and number of branches in Multiplication phase Micropropagated pear cultivars on modified QL culture Medium, compared based on Duncan Multiple ranges at p<0.01.



شکل ۳- مقایسه رشد و تکثیر درون شیشه‌ای ارقام گلابی بومی ایران شامل: (A) فلسطینی، (B) شاه میوه، (C) تاشکندی، (D) درگزی، (E) نطنزی، (F) سردرودی، (G) سبری، (H) خوج،(I) قوسی، (J) بیروتی در محیط کشت QL تغییریافته پس از ۳۰ روز واکشت.

Figure 3- Comparison of *in vitro* growth and multiplication of Iranian pears cultivars: (A) Felestini, (B) Shahmiveh, (C) Tashkandi, (D) Dargazi, (E) Natanzi, (F) Sardroodi, (G) Sebri, (H) Khoj , (I) Ghosi, (J) Beiruti on QL modified culture medium after 30 days Subculture.

همچنین رقم سردرودی اگرچه در مرحله استقرار با رشد کندی مواجه بود ولی در مرحله پرآوری با سازگار شدن به شرایط محیطی جدید، رشد بیشتری از خود نشان داد. تفاوت در واکنش ژنوتیپ‌ها در محیط کشت درون شیشه همانند رفتار آنها در پاسخ به محرک‌های محیط طبیعی ژنتیکی است، به طوری که توان تولید یک ژنوتیپ در محیط درون شیشه ممکن است همبستگی مستقیم با توان تولید آن در شرایط طبیعی نداشته باشد. اگرچه رقم سردرودی با رشد کندی در محیط کشت MS مواجه بود ولی در محیط کشت QL رشد بهتری نشان داد. این موضوع در مطالعات قبلی نیز گزارش شده است. به طور مثال رشد شاخه‌های جانبی دو رقم بارتلت و بوره بوسک در محیط کشت QL بهتر از محیط کشت MS بود و همچنین در جدا کشت‌های برگی حاصل از پرآوری شاخه بر روی محیط کشت QL شاخه‌های نابجای بیشتری نسبت به محیط کشت MS تولید شده است (Bell *et al*., 2009). به نظر می‌رسد این ارقام در محیط کشت QL تغییر یافته نسبت به دیگر ارقام واکنش بهتری را داشته‌اند (Kroff and Vanlaer, 1993). در مجموع مراحل استقرار و تکثیری می‌توان به این نتیجه رسید که ارقام قوسی و نطنزی از نظر صفات تعداد برگ،

ارتفاع تکثیر یافته و تعداد شاخساره تشکیل شده در بالاترین راندمان می‌باشند و می‌توان این ارقام را براحتی با استفاده از سیستم درون شیشه‌ای تکثیر نمود. نتایج همبستگی بین صفات نشان داد (جدول ۵) که صفت تعداد برگ استقرار یافته با صفت ارتفاع گیاه (r=۰/۸۵) همبستگی مثبت و بسیار معنی‌دار (P<0.01) دارد به عبارتی با افزایش تعداد برگ، صفت ارتفاع گیاه نیز افزایش یافته است.

جدول ۵- همبستگی مراحل استقرار و تکثیر ارقام مختلف گلابی برای صفات رشد.

Table 5-The correlation among growth traits of pear cultivars on the establishment and proliferation stages.

ارتفاع گیاه تکثیری height of multiplication	تعداد برگ گیاه تکثیری leaf number of multiplication	ارتفاع گیاه استقرار یافته height of established plant	تعداد برگ گیاه استقرار یافته leaf number of established plant	منابع تغییرات S.O.V
		1	0.81**	ارتفاع گیاه استقرار یافته height of established plant
	1	0.25	0.33	تعداد برگ گیاه تکثیری leaf number of multiplication
1	0.56	0.71*	0.85**	ارتفاع گیاه تکثیری height of multiplication

*** و ** اختلاف معنی‌دار به ترتیب در سطح احتمال ۵٪ و ۱٪.**

*** and ** Significant difference at 5% and significant difference at 1% level respectively.**

ریشه‌زایی گیاهچه‌های تکثیر یافته درون شیشه‌ای

در بررسی اثر غلظت‌های مختلف تنظیم کننده ایندول بوتیریک اسید (IBA) بر ریشه‌زایی ارقام منتخب گلابی نتایج تجزیه واریانس نشان داد که غلظت‌های مختلف IBA (۰/۵، ۱ و ۲ میلی‌گرم در لیتر) برای تمام صفات طول ریشه، تعداد ریشه و درصد ریشه‌زایی بسیار معنی‌دار بود اما اثرات متقابل غلظت هورمون و رقم بر صفت درصد ریشه‌زایی معنی‌دار نبود در حالیکه برای صفات طول ریشه و تعداد ریشه معنی‌دار بود و نشان داد که هر یک از ارقام ممکن است در یک سطح غلظت هورمون، بیش‌ترین ریشه‌زایی را داشته باشند (جدول ٦).

جدول ٦- تجزیه واریانس صفات ریشه‌زایی ارقام گلابی در غلظت‌های مختلف IBA.

Table 6- Analysis of variance of rooting trait in different concentrations of IBA in pear cultivars.

منابع تغییرات SOV	درجه آزادی Degrees of freedom	میانگین مربعات (Mean of Squares)		
		تعداد ریشه‌چه The number of rootlets	طول ریشه Root length	درصد ریشه‌زایی Rooting percentage
غلظت هورمون Hormone concentration	2	46.69**	84.73**	36417.36**
رقم (Variety)	3	4.54**	2.19**	6.10 ns
اثر متقابل (H*V) Corresponding effect	6	4.54**	2.19**	6.10 ns
اشتباه آزمایشی Experimental error	24	0.08	0.005	5.08
ضریب تغییرات (٪) Coefficient of variation		21.34	5.03	7.08

ns غیر معنی‌دار * و ** اختلاف معنی‌دار به ترتیب در سطح احتمال 5٪ و 1٪.

Ns, * and ** indicating non-significant, significant difference at 5% and significant difference at 1% level respectively.

نتایج مقایسه میانگین اثرات متقابل بین تیمارهای غلظت تنظیم کننده رشد و رقم بر روی صفت تعداد ریشه (جدول ۷) نشان داد که هیچ‌گونه ریشه‌ای در غلظت ۰/۵ و ۲ میلی‌گرم در لیتر IBA در ارقام مشاهده نشد ولی در غلظت ۱ میلی‌گرم در لیتر رقم قوسی با تعداد ریشه ٦/۳۳ بیش‌ترین و بعد از آن رقم شاه میوه با تعداد ریشه ۳/٦٦ و در پایان ارقام نطنزی و سردرودی با تعداد ریشه ۲ و ۱/٦٦ قرار گرفتند. نتایج حاصل با نتایج (Diaz-Sali *et al*, 1990) و همچنین (Nuri Nas and Read, 2003) مشابهت داشت.

جدول ۷ – نتایج مقایسه میانگین اثر غلظت‌های مختلف IBA در محیط کشت بر برخی صفات ارقام گلابی

Table 7 - Results Mean comparisons of different concentrations of IBA in the medium on some trait peaer cultivars.

ارقام (cultivars)	قوسی Ghosi			نطنزی Natanzi			سردرودی Sardroodi			شاه میوه Shahmiveh		
غلظت (mg/l) IBA Concentrations of IBA	0.5	1	2	0.5	1	2	0.5	1	2	0.5	1	2
تعداد ریشه The number of roots	0.00e	6.33a	0.00e	0.00e	2.00c	0.00e	0.00e	1.66d	0.00e	0.00e	3.66b	0.00e
طول ریشه Root length	0.00e	2.98b	0.00e	0.00e	5.46ab	0.00e	0.00e	3.05b	0.00e	0.00e	5.68a	0.00e

حروف مشترک در هر ردیف بیانگر عدم وجود اختلاف معنی‌دار در آزمون دانکن می‌باشد.

Common letters in each row represents is the lack of significant differences in Duncan test.

آنها در تحقیقات خود بر روی گلابی گزارش کردند که شاخساره‌های گلابی را می‌توان با فرو بردن قسمت انتهایی آنها در غلظت ۱ میلی‌گرم در لیتر هورمون IBA به مدت ۱۰ ثانیه و کشت در محیط کشت MS عاری از هورمون در مدت ۲۰ روز ریشه‌زا کرد. این نتایج با گزارش‌های اخیر مطابقت داشت که ریشه‌زائی کامل در تمامی شاخه‌های گلابی را گزارش کردند لیکن پایه‌های گلابی در محیط کشت MS همراه با ۱ میلی‌گرم در لیتر IBA از نظر صفات تعداد ریشه و طول ریشه بهترین پاسخ را نشان دادند (Abdollahi *et al*., 2014). اکسین‌ها در تشکیل و طویل شدن ریشه‌ها مؤثر هستند. مناسب‌ترین اکسین‌های ریشه‌زایی برای گلابی NAA و IBA گزارش شده است. بنابراین ریشه‌زایی با هورمون‌هایی که در جوانه‌ها و برگ‌های جوان ساخته می‌شوند و سپس به انتهای قلمه انتقال می‌یابند، افزایش می‌یابد (Omidi, 2012 & Seyed Tabatabaei). در رقم قوسی که بیش‌ترین تعداد ریشه را ایجاد نمود رشد طولی ریشه قابل توجه نبوده و کمترین رشد طولی را داشت (شکل ٤). به نظر می‌رسد تولید زیاد ریشه در این رقم مانع از دیگر اثرات IBA از جمله افزایش طولی سلول‌ها و در نتیجه گسترش طول ریشه بوده است. در گیاهان با توجه به ژنوتیپ، سن گیاه، عوامل محیطی و نوع تغذیه اثرات IBA تغییر می‌کند (Seyed Tabatabaei and Omidi, 2012).

0.5 mg/l 1 mg/l 2 mg/l

شکل ٤- مقایسه اثر غلظت‌های مختلف اکسین IBA رشد بر ریشه‌زایی گلابی رقم قوسی

Figure 4- Comparision of the different Auxin IBA concentrations on rooting trait in pear cultivar Ghosi.

سپاسگزاری

از مؤسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر و از ریاست محترم بخش تحقیقات ژنتیک و بانک ژن گیاهی ملی ایران جناب آقای دکتر سرخی و همچنین از جناب آقای دکتر عباسی مقدم و سرکار خانم مهندس طاهری اردستانی و تمامی همکاران محترم این بخش تشکر و قدردانی می‌شود.

منابع

Abdollahi H (2014). Guidebook of Pome Fruits: (Apple, Pear and Quince); Cultivation and Growing. Agricultural Extension and Education Publications Ministry of Jihad-e-Agriculture. Tehran, Iran (In Persian).

Abdollahi H (2015). Pear Botany Cultivars and Rootstocks. Agricultural Extension and Education Publications Ministry of Jihad-e-Agriculture.Tehran, Iran (In Persian).

Ahmed M, Anjum A (2010). *In vitro* preservation of Pyrus germplasm with minimal growth using different temperature regimes. Pakistan Journal of Botany, 42: 1639-1650.

Bell RL, Srinivasan C, Lomberk D (2009). Effect of nutrient media on axillary shoot proliferation and preconditioning for adventitious shoot regeneration of pears. In Vitro Cellular and Developmental. Biology. Plants DOI 10.1007/s11627-009-9196-8.

Diaz-sala C, Rey M, Rodriguez R (1990). In vitro establishment of chain from nodal segment and apical buds of pear, plant cell, Tissu and Organ Culture 23: 151-157.

FAO. Stat (2013). www.Fao.org.

Kroff MJ, Vanlaer HH (1993). Modeling crop Seed Interactions. CAB International Walling ford. Pp. 33-61.

Moradi D (2010). Provide a suitable method of Micropropagation and *in vitro* conservation tarragon (Artimisia draunccunlus). Agricultural Biotechnology. Master's thesis. Payam Noor university of Tehran, Iran (In Persian).

Murashinge T, Skoog F (1962). A revised medium for rapid growth and biossaay with tobacco tissue cultures. Physiologya Plantarum 15: 437-479.

Nosrati S, Zamani Z (2010). Micropropagation of four varieties of pears (Dargazi, Natanzi, Shahmiveh, Williams). Iranian journal Horticultural Science 2: 83-91

Nuri Nas M, Read PE (2003). Ex vitro Survival of pear shoots produced in vitro, Acta Horticultural, ISHS, 616 pages.

NurMohammadi N, Abdollahi H, Moeini A, Ruholamin E (2015). Effect of Growth Media and Fe Source on Micropropagation and Rooting of Semi-Dwarf pear Rootstocks, pyrodwarf and OH × F87. Seed and Plant Improvement Journal 31: 265-278.

Quoirin M, Lepoivre P (1977). Etude de mileux adaptes aux cultures in vitrode *Prunus*. Acta Horticultural 78: 437-442.

Rossi V, Depaoli G, Dal Pozzo P (1991). Propagation of Pyrus by *in vitro* culture. Acta Horticulturae 300: 145-148.

Seyed Tabatabaei B, Omidi M (2012) . Plant cell and tissue culture. Publication of Tehran University 367 pages.

Thakur V, Kanwar JS (2008). Micropropagation of 'wild pear' *Pyrus pyrifolia* (Burm F.) Nakai.l. Explant Establishment and Shoot Multiplication. Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca 36: 104111.

Viseur J (1987). Micropropagation of pear, *Pyrus communis* in a double phase Vitro. Journal of Horticultural Science, 69: 833,839.

Westwood MN (1993).Temperate Zone pomology. Timber press, Portland, Oregon, USA. 523 pp.

A study on growth, propagation and rooting of Iranian native pears for developing *in vitro* conservation system

Bakhtiari F.[1], Mozafari J.[2*], Abdollahi H.[3]

[1] MSc. Student, Horticultural Science Department, Karaj Branch, Islamic Azad University, Karaj, Iran.
[2] Professor, Department of Genetics and National Plant Gene Bank, Seed and Plant Improvement Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization, Karaj, Iran.
[3] Associate Professor, Horticulture Research Institute, Agricultural, Research, Education and Extension Organization, Karaj, Iran.

Abstract

Multiplication of pear cultivars using conventional vegetative propagation techniques such as soft or hard wood cuttings is difficult. Therefore, the possibility of micro-propagating 10 Iranian native pear cultivars and the establishment of their *in vitro* collection were studied. *In vitro* cultures of these cultivars, established using single node soft cuttings on MS Medium supplemented with BAP (1 mg/l) and NAA (0.1 mg/l), were evaluated for growth characteristics. At this stage, time to shoot induction in cvs Ghosi and Natanzi with the mean of 4.75 days was the shortest and in cv Khooj with 20.75 days was the longest, among all cultivars examined in this study. Cultivars Ghosi and Natanzi also produced the highest number of leaves (4.25 and 3.25, respectively) and the highest shoot height (9.25 and 6.5 cm, respectively). Micropropagation of *in vitro* grown plantlets were then studied by assessing 21 days old Micropropagated plantlets on the modified QL medium containing growth regulator combination of BAP (1mg/l), NAA (0.1 mg/l), Zeatin (1mg/l) and 2ip (1mg/l). Cultivar Ghosi produced plantlets with an average of 3.75 leaves and the average height of 4.27 cm, showing the highest growth rate. On the other hand, plantlets of cvs Beiruti and Shahmiveh with an average shoot height of 1 cm showed the lowest growth among the cultivars examined. Modified QL media supplemented with different concentrations of Auxin, IBA, were used for rooting of four selected pear cultivars. NO roots was observed on any of the four cultivars, cultured on media with IBA concentrations of 0.5 and 2.0 mg/l, while all selected cultivars rooted on the medium containing IBA with concentrations of 1mg/l. The highest mean number of roots (6.33) was produced in cv Ghosi and the lowest in cv Sardroodi (1.66). Root length was the highest in cv Shahmiveh and lowest in cv Sardroodi. The results of this research work showed that Iranian native pear cultivars can easily be micopropagated under in vitro conditions, but their growth and multiplication characteristics is genotypic specific. This research also successfully established the first Iranian *in vitro* collection of native pear genetic resources.

Keywords: *pear, genetic resources, in vitro propagation, growth regulators, tissue culture.*

[*] *Corresponding Author: Mozafari J. Tel:09123763457 Email: Jmozafar@yahoo.com
Journal of Agricultural Biotechnology; Printing ISSN: 2228-6705, Electronic ISSN: 2228-6500