زیست‌شناسی گیاهی ایران، سال هشتم، شماره بیست و نهم، پاییز ۱۳۹۵، صفحه ۷۷-۹۰
تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۴/۱۲/۲۲
تاریخ بررسی مجدد: ۱۳۹۵/۰۳/۰۹
تاریخ پذیرش نهایی: ۱۳۹۵/۰۵/۱۰

بررسی اثر تنظیم‌کننده‌های رشد (BAP و IBA) بر باززایی، پرآوری و ریشه‌زایی گیاه گلابی نطنز با روش کشت در شیشه

عباس صفرنژاد [۱]*، سیده بی‌بی لیلا علمداری [۲]، هادی درودی [۲] و مرضیه دلیر [۲]
[۱] مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی خراسان رضوی یا شعبه مشهد، پژوهشکدهٔ بیوتکنولوژی کشاورزی ایران، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، مشهد، ایران
[۲] بخش تحقیقات کشت بافت، شعبه مشهد، پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی ایران، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، مشهد، ایران

چکیده

گلابی یکی از مهمترین درختان میوهٔ مناطق معتدل و سردسیر محسوب می‌شود که به سبب طعم مناسب و ارزش اقتصادی بالای آن، سال‌های متمادی است که در ایران پرورش می‌یابد. هدف از انجام پژوهش حاضر، تعیین محیط بهینه برای تکثیر سریع گیاه گلابی سالم از طریق کشت بافت است. ابتدا نمونه‌های گلابی از باغ آستان قدس رضوی، جمع‌آوری و از جوانه‌های انتهایی و جانبی برای ریزنمونه استفاده شد. بهترین تیمار برای استریل‌سازی جوانه‌ها محلول ۰/۱ درصد کلرید جیوه به مدّت سه دقیقه و اتانول ۷۰ درصد به مدّت یک دقیقه شناخته شد. آزمایش بر اساس طرح کاملاً تصادفی در سه تکرار انجام شد. نتایج نشان داد بهترین محیط برای باززایی (Regeneration)، محیط MS (Murashige and Skoog) همراه با سه میلی‌گرم در لیتر BAP (6-Benzylaminopurine) و ۰/۰۱ میلی‌گرم در لیتر IBA (Indole-3-Butyric Asid) است. بهترین محیط برای پرآوری (Proliferation)، محیط MS همراه با پنج میلی‌گرم در لیتر BAP و ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر IBA است. بیشترین طول شاخه در محیط، سه میلی‌گرم در لیتر BAP و ۰/۰۱ میلی‌گرم در لیتر IBA تشخیص داده شد. نتایج تحلیل واریانس نشان داد که تفاوت معنی‌داری بین تیمارهای ریشه‌زایی وجود نداشت. گیاهچه‌های ریشه‌دارشده برای سازگاری به جیفی‌پات و سپس به خاک منتقل شدند.

واژه‌های کلیدی: کشت بافت، گلابی، هورمون‌های گیاهی.

مقدمه

گلابی *Pyrus* sp. به خانوادهٔ Rosaceae و زیرخانوادهٔ *Pomoidea* با ۱۷ جفت کروموزوم (۲*n*=۲*x*=۳۴) متعلّق است (Jakson, 2003). بیش از ۲۲ گونه از *Pyrus* وجود دارد که ۱۶ گونهٔ آن از آسیا منشأ گرفته است (Nee *et al.*, 2002). گلابی یکی از

* نگارنده مسؤول: نشانی پست الکترونیک: sebre14@abrii.ac.ir، شماره تماس: ۰۵۱۳۸۵۹۰۳۰۰

Copyright©2016, University of Isfahan. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (http://creativecommons.org/licenses/BY-NC-ND/4.0), which permits others to download this work and share it with others as long as they credit it, but they cannot change it in any way or use it commercially.

مهمترین درختان میوهٔ مناطق معتدل و سردسیر محسوب می‌شود که به سبب طعم مناسب و ارزش اقتصادی بالای آن، سال‌های زیادی است که در ایران پرورش می‌یابد. از ارقام گلابی بومی ایران می‌توان به رقم‌های تاشکندی، درگزی، دمکج، سبری، شکری، سردرودی، سه‌فصله، سیف تبریز، شاهک، شاه‌میوه، فلسطینی، قوسی، محمدعلی و نطنزی اشاره کرد (Tahzibi Hagh *et al*., 2011).

بر اساس آمار سازمان خوار و بار جهانی (FAO, 2011)، کشور چین با تولید ۱۵/۹ میلیون تن مقام اول، ایتالیا با تولید ۹۲۶ هزار تن، مقام دوم و آمریکا با ۸۵۰ هزار تن، مقام سوم تولید گلابی را در جهان به خود اختصاص داده‌اند. در این میان ایران با تولید ۱۴۵ هزار تن در مقام بیستم تولید این محصول در دنیا قرار دارد.

یکی از مشکلات اصلی پرورش ارقام بومی ایران، مشکل دیرباروری آن‌ها روی پایه‌های بذری و ناسازگاری آن‌ها روی پایه‌های کوئینز است (Davarynejad *et al*., 2007). طبق نظر Zhu و همکاران (۲۰۰۳)، پایه‌های کوئینز به خاک‌های قلیایی حساسیت دارند و استقرار مناسبی ندارند. از آن‌جا که بیشتر مناطق ایران که مستعدّ کاشت گلابی است، خاک‌های قلیایی دارد در نتیجه محدودیت بیشتری در تولید این محصول در ایران ایجاد شده است. علایم ناسازگاری‌های مشاهده‌شده در انواع نهال‌های پیوندی عبارتند از: ناپیوستگی پوست درخت، اختلالات کامبیومی و تجمّع نشاسته در محلّ پیوند. این موضوع تأخیر در باردهی درخت را موجب می‌شود (Ermel *et al*., 1999؛ Davarynejad *et al*., 2007). علاوه بر این، به علّت ضعف عمومی درخت، میوه‌های حاصل نیز کیفیت مطلوبی ندارند. به‌کارگیری سایر روش‌های ازدیاد غیر جنسی که به تولید درختان خودریشه منجر می‌شود، می‌تواند راه حلّ مناسبی برای مشکلات ذکر شده باشد. استفاده از ریزازدیادی (Micropropagation) در تکثیر و تولید گیاهان، سال‌هاست که توجّه پژوهشگران را به خود جلب کرده است. این شاید به آن دلیل است که کاربرد شیوه‌های سنّتی در تکثیر گیاهان به‌ویژه گیاهان کلونی، علاوه بر طولانی‌بودن، می‌تواند گسترش بیماری‌ها را موجب شود. بنابراین برای تولید گیاهان سالم، یکدست و یکنواخت در مدّت زمان اندک، استفاده از روش‌های کشت بافت لازم است (Baghery and Safari, 2004). روش کشت درون شیشه جاذبهٔ تجاری بالایی دارد؛ زیرا امکان رشد سریع گیاهان و تولید گیاهان با کیفیت بالا را فراهم می‌کند و ابزار مناسبی برای رسیدن به اهدافی است که در شرایط کشت در محیط طبیعی، دست‌یابی به آن‌ها دشوار است (Lambardi and Rugini, 2003). تکثیر گلابی به روش‌های مختلف امکان‌پذیر است، ولی معرّفی عملی‌ترین و اقتصادی‌ترین روش تکثیر آن مستلزم شناخت همهٔ روش‌های ازدیاد از جمله تکثیر درون شیشه‌ای است. ارقام مختلف گلابی به سبب قابلیت بالای هتروزیگوسی از طریق بذر به‌خوبی قابل تکثیر نیستند (Shibli *et al*., 1997). کارهای بسیاری در رابطه با کشت بافت گلابی در دنیا انجام شده است. تکثیر درون شیشه‌ای، این امکان را فراهم می‌کند که در طول سال برای استفاده در دسترس باشند و همچنین ژرم‌پلاسم گلابی تکثیرشده در محیط استریل به سبب نداشتن عوامل بیماری‌زا با اطمینان کامل از سدهای قرنطینهٔ

کشاورزی کشورهای مختلف قابل تبادل هستند (Songül and Yucel, 1998).

آزمایش‌های Previati و همکاران (۲۰۰۲) برتری محیط پایهٔ QL (Quoirin and Lepoivre) را نسبت به محیط MS برای ریزازدیادی (Micropropagation) هیبریدهای گلابی نشان داده است. Abdollahi و همکاران (۲۰۰۶) در ریزازدیادی ارقام گلابی، محیط رشدی دربردارندهٔ نمک‌های پایهٔ QL تغییریافته، غنی‌شده با ۰/۳ ساکاروز، یک میلی‌گرم در لیتر BAP، یک میلی‌گرم در لیتر ۲ip (N6-2-Isopentenyladenine) و ۰/۵ درصد پکتین خوشهٔ انگور را توصیه کرده‌اند. Nosrati و همکاران (۲۰۰۹) برای بررسی ریزازدیادی چهار رقم گلابی، سه آزمایش جداگانه انجام داده‌اند. نتایج آن‌ها نشان داده‌است که محیط کشت MS/2 و MSN/2 به‌ترتیب بیشترین میزان پرآوری شاخه و بلندترین شاخه‌ها را تولید کرده‌اند. گونه‌های شاه‌میوه و درگزی در غلظت دو میلی‌گرم در لیتر و گونه‌های ویلیامز و نطنزی در غلظت سه‌میلی‌گرم در لیتر BA، بیشترین میزان پرآوری شاخه را نشان داده‌اند. غلظت یکسان IBA و NAA (Naphthalene) (Acetic Acid ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر) در ترکیب با BAنشان داده است که اثر IBA بر طول شاخه بیشتر ازNAA بوده است. Khodaee Chghani و همکاران (۲۰۱۱) برای تکثیر درون شیشه‌ای دو پایهٔ هم‌گروه گلابی OH×F69 وOH×F333، چهار آزمایش جداگانه انجام داده‌اند. نتایج آن‌ها نشان داده است که برای ریزازدیادی این دو پایهٔ گلابی و بقای مطلوب ریزشاخه‌ها، محیط رشدی دربردارنده نمک‌های پایهٔ QL تغییریافتهٔ غنی‌شده با ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر ۲ip و یک میلی‌گرم در لیتر BAP برای بهبود پرآوری شاخه و تیمار کوتاه‌مدّت با دومیلی‌گرم در لیتر IBA برای ریشه‌زایی این پایه‌ها لازم است. D`Amico و همکاران (۲۰۰۲) در ریزازدیادی (Micropropagation) چهار گونه گلابی اروپایی، سه روش کشت در محیط‌کشت جامد، مایع و تکنیک غوطه‌ورسازی موقّت را استفاده کرده‌اند. در پژوهش حاضر، محیط‌های مایع، شیشه‌ای‌شدن ریزنمونه‌ها را موجب شده است. Reed و همکاران (۲۰۱۳) برای ریزازدیادی گلابی بیان کرده‌اند که ضریب رشد ساقه در محیط‌کشت MS با غلظت بالایی از کلرید کلسیم، فسفات پتاسیم و سولفات منیزیم و ۴/۴ میکرومولار BAP افزایش پیدا کرده است و رشد شاخه‌ها بیشتر از رشد ریشه‌ها بوده است. در آزمایشی برای ریزازدیادی گلابی *Pyrus pyrifolia*، بهترین پرآوری (Proliferation) در محیط‌کشت MS با ۲/۲ میلی‌گرم در لیتر هورمون BAP و یک میلی‌گرم در لیتر کینتین پس از چهار هفته به دست آمده است. بهترین پاسخ ریشه‌دهی نیز در محیط‌کشت MS که مقدار نمک‌های آن نصف شده است و با ترکیب ۰/۲۵ میلی‌گرم در لیتر هورمون (IBA+NAA) به دست آمده است Zafrul (and Kaloo 2010). کشت بافت گلابی با اهداف گوناگون از جمله تکثیر انبوه گیاهان سالم و بدون بیماری و تولید انبوه گیاهان یکنواخت از نظر ژنتیکی انجام شده است. به‌ویژه در سال‌های گذشته به علّت بیماری آتشک، همهٔ باغ‌های گلابی آستان قدس رضوی یا در معرض نابودی قرار گرفته‌اند یا نابود شده‌اند. بنابراین برای توسعه و اصلاح باغ‌های گلابی، حفظ ژنوتیپ‌هایی که در سال‌های طولانی جمع‌آوری

شده است، اهمّیت ویژه‌ای دارد و استفاده از روش کشت بافت در تکثیر انبوه گیاهان سالم و بدون بیماری و حفظ ژرم‌پلاسم موجود، مناسب و ضروری به نظر می‌رسد. از این رو پژوهش حاضر برای دست‌یابی به روش مناسب و موفّقیت‌آمیز تکثیر انبوه و بهبود میزان ریشه‌زایی این گونهٔ ارزشمند اقتصادی انجام شد. در این پژوهش، میزان و نوع هورمون‌ها بر اساس نتایج بررسی‌های قبلی روی گونه‌های دیگر گلابی انتخاب شده است. با توجّه به این که با استفاده از دو هورمون ذکرشده نتایج مناسبی حاصل شد و هزینه‌های این دو هورمون نیز نسبتاً پایین است، غلظت‌های مختلف این دو هورمون بررسی شد.

مواد و روش‌ها

در پژوهش حاضر از ریزنمونه های گلابی رقم نطنز جمع‌آوری‌شده از باغ آستان قدس رضوی استفاده شد که جوانه‌های انتهایی و جوانه‌های جانبی را شامل می‌شدند. شاخه‌های تهیّه‌شده به طول ۲۰-۱۵ سانتی‌متر به آزمایشگاه منتقل، برگ‌های آن حذف و شاخه‌ها به قطعات کوچک تقسیم شدند که هریک به طول ۱ تا ۱/۵ سانتی‌متر بودند و در هر قطعهٔ برش‌خورده حداقل یک جوانه وجود داشت.

ضدّ عفونی ریزنمونه‌ها: ریزنمونه‌ها مهمترین منبع آلودگی در کشت بافت هستند. این مرحله برای حذف بیشترین میزان آلودگی باکتریایی و قارچی از ریزنمونه‌ها انجام می‌شود. قطعات شاخه‌های جوانه‌دار پس از شست‌وشو با آب جاری به قطعات کوچکتر (هر قطعه دارای یک عدد جوانه) تقسیم شد و برای استریل‌کردن از محلول‌های مختلف ضدّ عفونی استفاده شد (جدول ۱).

جدول ۱- تیمارهای ضدّ عفونی به‌کاربرده‌شده در آزمایش

ردیف	تیمارهای ضدّ عفونی
۱	کلرید جیوه ۰/۰۲ درصد (۲ دقیقه) + اتانول ۷۰ درصد (۲ دقیقه) + هیپوکلریت ۱/۵ درصد (۱۵ دقیقه)
۲	هیپوکلریت سدیم ۲ درصد (۲۰ دقیقه) + اتانول ۷۰ درصد (۳۰ ثانیه)
۳	کلرید جیوه ۰/۱ درصد (۳ دقیقه) + اتانول ۷۰ درصد (۱ دقیقه)
۴	هیپوکلریت سدیم ۳ درصد (۱۵ دقیقه)

بازززایی مستقیم (Direct Regeneration): ریزنمونه‌ها از سرشاخه‌های ضدّ عفونی شده به اندازهٔ ۱ تا ۱/۵ سانتی‌متر جدا شدند و به ظروف شیشه‌ای محیط‌کشت باززایی مستقیم (جدول ۲) منتقل شدند و شرایط محیطی لازم برای رشد آماده شد. دمای اتاق رشد، ۲±۲۵ درجهٔ سانتی‌گراد و شدّت نور در حدود ۵۰۰۰ میکرومول فوتون بر متر مربّع بر ثانیه تنظیم شد. دورهٔ نوری اتاق رشد، ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی بود. در دو هفتهٔ اول، ریزنمونه‌های آلوده حذف شدند. نخستین باززایی پس از یک هفته ظاهر شد.

جدول ۲- محتوای هورمونی مربوط به محیط کشت باززایی مستقیم

تیمار	محتوای هورمونی
T1	MS
T2	MS+ 0.2 mg/l BAP
T3	MS+ 0.5 mg/l BAP
T4	MS+ 1 mg/l BAP
T5	MS+ 2 mg/l BAP
T6	MS+ 3 mg/l BAP
T7	MS+ 0.2 mg/l BAP+0.1 mg/l IBA
T8	MS+ 0.5 mg/l BAP+0.1 mg/l IBA
T9	MS+ 1 mg/l BAP+0.1 mg/l IBA
T10	MS+ 3 mg/l BAP+0.1 mg/l IBA
T11	MS+ 5 mg/l BAP + 0.1 mg/l IBA
T12	MS+ 3mg/l BAP+0.01 mg/l IBA

پرآوری (Proliferation) مـواد گیـاهی: در پایـان هـر مـاه، شاخسـاره‌هـای جدیـد جـدا شـدند و بـه محیط کشت جدید منتقل شـدند. بـه ایـن ترتیـب تعـداد نمونه‌ها به صورت تصاعدی افزایش یافت. ایـن کـار تـا زمانی انجام شد که شاخسارهٔ کافی بـرای آزمـایش‌هـای ریزازدیادی (Micropropagation) به دست آمد.

ریشه‌زایی: پس از به‌دست‌آمدن بهترین تیمار برای شاخه‌زایی، شاخه‌هایی با طول دو تا سه سـانتی‌متـر بـرای ریشه‌زایی در محیط MS دربردارنـدهٔ ۰/۵، ۱، ۲، ۳، و ۵ میلی‌گرم در لیتر **IBA** و محیط نصف MS دربردارنـدهٔ ۲ میلی‌گرم در لیتر IBA واکشت شدند.

جدول ۳- مقادیر هورمونی مربوط به محیط ریشه‌زایی

تیمار	محتوای هورمونی
T1	MS +0.5 mg/l IBA
T2	MS+1 mg/l IBA
T3	MS+2 mg/l IBA
T4	MS+3 mg/l IBA
T5	MS+5mg/l IBA
T6	MS/2+2mg/l IBA

تجزیه و تحلیل آماری: آزمایش‌های مربوط بـه کشت بافت در قالب طرح کاملاً تصادفی بـا سـه تکـرار انجام شد. داده‌ها در نرم‌افزار Excel وارد و بـا نـرم‌افـزار آماری SAS تجزیه شدند. مقایسهٔ میـانگین‌هـا بـا روش دانکن و در سطح احتمال ۵ درصد انجام شد.

نتایج و بحث

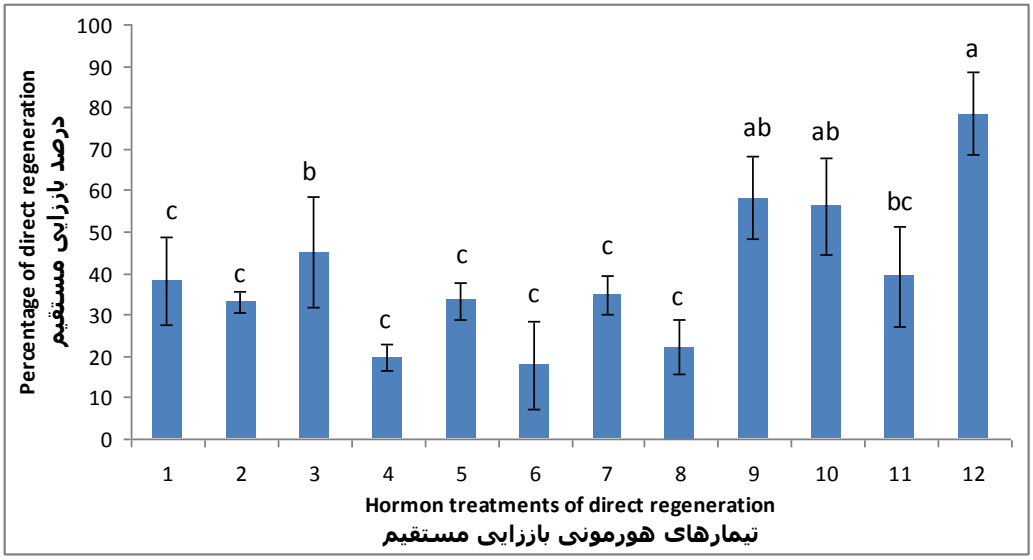
ضدّ عفونی ریزنمونه‌ها: برای کاهش آلودگی و بهینـه‌سـازی روش اسـتریل‌سـازی از تیمارهـای مختلـف برای به‌دست‌آوردن بهتـرین روش ضـدّ عفـونی اسـتفاده شد. نتایج حاصل نشان داد کـه تیمـار سـه یعنـی کلریـد جیوهٔ ۰/۱ درصد (۳ دقیقه) + اتانول ۷۰ درصد (۱ دقیقه) کمترین میزان آلودگی را دارند (جدول ۴).

جدول ۴- درصد آلودگی تیمارهای ضدّ عفونی

ردیف	تیمارهای ضدّ عفونی	درصد آلودگی
۱	کلرید جیوه ۰/۰۲ درصد (۲ دقیقه) + اتانول ۷۰ درصد (۲ دقیقه) + هیپوکلریت ۱/۵ درصد(۱۵ دقیقه)	۲۱
۲	هیپوکلریت‌سدیم ۲ درصد (۲۰ دقیقه) + اتانول ۷۰ درصد (۳۰ ثانیه)	۷/۵
۳	کلرید جیوه ۰/۱ درصد (۳ دقیقه) + اتانول ۷۰ درصد (۱ دقیقه)	۳/۵
۴	هیپوکلریت‌سدیم ۳ درصد (۱۵ دقیقه)	۵/۶

بازازایی مستقیم (Direct Regeneration): پس از انتقال ریزنمونه‌ها به محیط‌های مختلف هورمونی برای بازازایی، جوانه‌ها شروع به رشد کردند و پس از حدود یک هفته، شاخه تشکیل شد (شکل ۱). نتایج تجزیهٔ واریانس نشان داد که اختلاف معنی‌داری بین تیمارهای هورمونی بازازایی وجود دارد. بهترین محیط برای بازازایی محیط MS + 3 mg/l BAP + 0.01 mg/l IBA شناخته شد (شکل ۲).

شکل ۱- بازازایی و گل‌دهی گلابی



شکل ۲- مقایسهٔ میانگین تیمارهای بازازایی مستقیم

۱: MS, ۲: MS+ 0.2 mg/l BAP, ۳: MS+ 0.5 mg/l BAP, ۴: MS+ 1 mg/l BAP, ۵: MS+ 2 mg/l BAP, ۶: MS+ 3 mg/l BAP, ۷: MS+ 0.2 mg/l BAP+0.1 mg/l IBA, ۸: MS+ 0.5 mg/l BAP+0.1 mg/l IBA, ۹: MS+ 1 mg/l BAP+0.1 mg/l IBA, ۱۰: MS+ 3 mg/l BAP+0.1 mg/l IBA, ۱۱: MS+ 5 mg/l BAP + 0.1 mg/l IBA, ۱۲: MS+ 3mg/l BAP+0.01 mg/l IBA

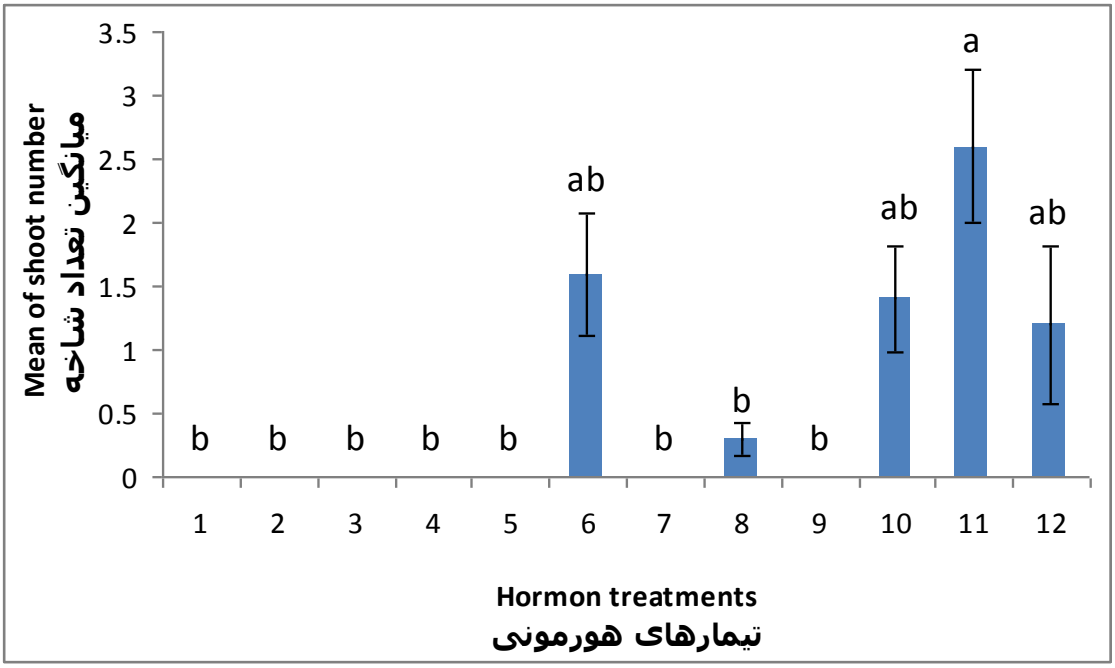
داده‌ها میانگین ۵ تکرار±انحراف معیار، حروف یکسان، بیان‌کنندهٔ نبودن اختلاف معنی‌دار با استفاده از آزمون دانکن است.

تنظیم‌کننده‌های گیاهی معمولاً در باززایی (Regeneration) گیاهان جایگاه مهمی دارند و در مرحلهٔ باززایی، غلظت سیتوکینین‌ها از اکسین‌ها بیشتر است. دربارهٔ گونهٔ بررسی‌شده در پژوهش حاضر نیز بهترین باززایی در محیط MS + 3 mg/l BAP + 0.01 mg/l IBA شناخته شد. در این رابطه بیان شده است که بیشترین ترکیب تنظیم‌کنندهٔ رشد مورد استفاده در مرحلهٔ استقرار کشت درون شیشه‌ای گلابی، یک میلی‌گرم در لیتر BA و ۰/۰۱ میلی‌گرم در لیتر NAA یا IBA بوده است. Shibli و همکاران (۱۹۹۷) و Reed و همکاران (۲۰۱۳) برای ریزازدیادی (Micropropagation) گلابی بیان کرده‌اند که ضریب رشد ساقه در محیط کشت MS با غلظت بالایی از کلرید کلسیم، فسفات پتاسیم و سولفات منیزیم و ۴/۴ میکرومولار N۶-بنزیل آدنین افزایش پیدا کرده است و رشد شاخه‌ها بیشتر از رشد ریشه‌ها بوده است. با این حال، اضافه‌کردن شیب تیماری ۵ تا ۱۰ میلی‌لیتر نفتالن استیک اسید قبل از کشت در محیط پایهٔ MS بدون تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی برای رشد بسیاری از ژنوتیپ‌ها مؤثّر است. Safarnejad (۲۰۱۵) در بررسی روی عنّاب نشان داده است که بیشترین میزان باززایی (Regeneration) در محیط‌کشت MS دربردارندهٔ 2 mgl^{-1} BAP + 0.01 mgl^{-1} IBA به میزان ۹۶/۶ درصد به دست آمده است. Saeedi Heidari و Safarnejad (۲۰۱۵) در بررسی روی افرا کیکم گزارش کرده‌اند که بهترین محیط برای باززایی، دربردارندهٔ ۰/۰۰۰۲ میلی‌گرم در لیتر TDZ (Thidiazuron) و ۵ میلی‌گرم در لیتر BAP و ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر IBA بوده است. Karami و همکاران (۲۰۱۳) در پژوهشی روی بهینه‌سازی شرایط باززایی گیاه لوبیا (*Phaseolus vulgaris* L.) نشان داده‌اند که در فرایند ساقه‌زایی با افزایش غلظت هورمون بنزیل آمینو پورین، درصد ساقه‌زایی تا غلظت ۲ میلی‌گرم در لیتر افزایش و پس از آن کاهش یافته است. Modarres و همکاران (۲۰۱۲) در بررسی روی گیاه نوروزک نشان داده‌اند که ترکیب BAPو IBA نتیجهٔ مناسب‌تری در ارتباط با ساقه‌زایی به ازای هر ریزنمونه داشته است و BAP در غلظت ۲ میلی‌گرم در لیتر همراه با IBA در غلظت ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر بهترین تیمار ساقه‌زایی بوده است. نتایج Goleyjani Moghaddaam و همکاران (۲۰۱۲) در پژوهش روی بهینه‌سازی شرایط باززایی (Regeneration) و تراریختی گیاه کلزا، رقم‌های Hyola 308 و RGS003 نشان داده است که در غلظت ۳/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP، میزان باززایی رقم Hyola 308به ۱۱۲ درصد و رقم RGS003 به ۱۲۰ درصد افزایش یافته است.

پرآوری (Proliferation): پس از کشت جوانه‌ها در محیط‌های دارندهٔ غلظت‌ها و ترکیبات مختلف هورمونی، شاخه‌زایی انجام شد (شکل ۳). نتایج تجزیهٔ واریانس نشان‌دهندهٔ تفاوت معنی‌دار بین تیمارهای

پرآوری بود. در برخی ریزنمونه‌ها تعدادی شاخه به وجود آمد. با بررسی تیمارهای هورمونی مختلف، مشخّص شد که بهترین محیط برای شاخه‌زایی، محیط MS دربردارندهٔ پنج میلی‌گرم بر لیتر BAP و ۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر IBA بود (شکل۴).

شکل ۳- مرحلهٔ پرآوری گلابی

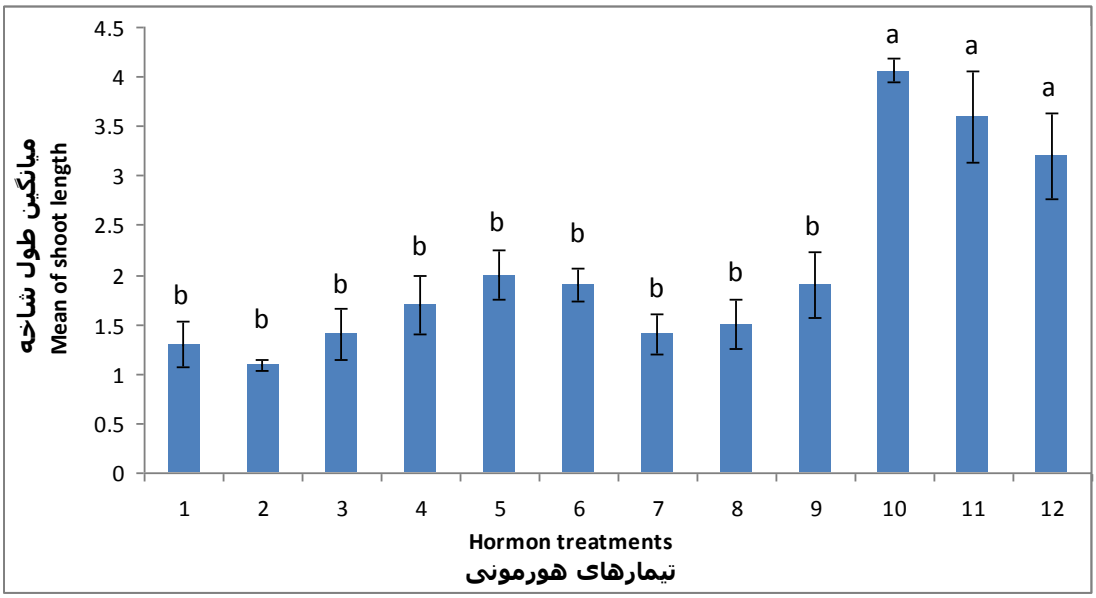


شکل ۴- مقایسهٔ میانگین تعداد شاخه

۱: MS, ۲: MS+ 0.2 mg/l BAP, ۳: MS+ 0.5 mg/l BAP, ۴: MS+ 1 mg/l BAP, ۵: MS+ 2 mg/l BAP, ۶: MS+ 3 mg/l BAP, ۷: MS+ 0.2 mg/l BAP+0.1 mg/l IBA, ۸: MS+ 0.5 mg/l BAP+0.1 mg/l IBA, ۹: MS+ 1 mg/l BAP+0.1 mg/l IBA, ۱۰: MS+ 3 mg/l BAP+0.1 mg/l IBA, ۱۱: MS+ 5 mg/l BAP + 0.1 mg/l IBA, ۱۲: MS+ 3mg/l BAP+0.01 mg/l IBA

داده‌ها میانگین ۵ تکرار± انحراف معیار است. حروف یکسان نشان‌دهندهٔ نبودن اختلاف معنی‌دار با استفاده از آزمون دانکن است.

همچنین نتایج مقایسهٔ میانگین طول شاخه در نمونه‌ها نشان داد که بیشترین طول شاخه در محیط سه میلی‌گرم بر لیتر BAP و ۰/۰۱ میلی‌گرم بر لیتر IBA مشاهده می‌شود (شکل۵).



شکل ۵- مقایسهٔ میانگین طول شاخه

۱: MS, ۲: MS+ 0.2 mg/l BAP, ۳: MS+ 0.5 mg/l BAP, ۴: MS+ 1 mg/l BAP, ۵: MS+ 2 mg/l BAP, ۶: MS+ 3 mg/l BAP, ۷: MS+ 0.2 mg/l BAP+0.1 mg/l IBA, ۸: MS+ 0.5 mg/l BAP+0.1 mg/l IBA, ۹: MS+ 1 mg/l BAP+0.1 mg/l IBA, ۱۰: MS+ 3 mg/l BAP+0.1 mg/l IBA, ۱۱: MS+ 5 mg/l BAP + 0.1 mg/l IBA, ۱۲: MS+ 3mg/l BAP+0.01 mg/l IBA

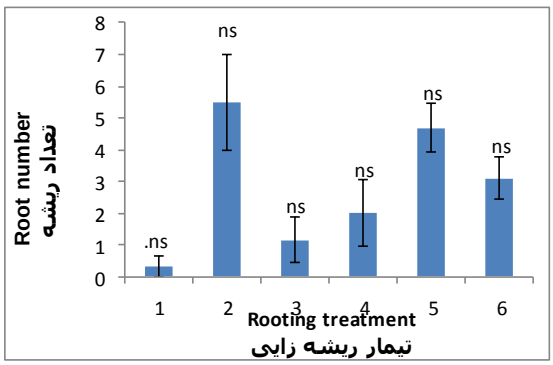
داده‌ها میانگین ۵ تکرار± انحراف معیار است. حروف یکسان نشان‌دهندهٔ نبودن اختلاف معنی‌دار با استفاده از آزمون دانکن است.

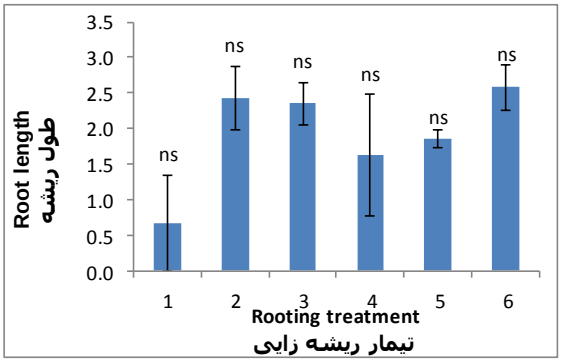
یکی از مهمترین مراحل کشت بافت، مرحلهٔ پرآوری (Proliferation) است که در آن به تکثیر ساقه‌های گیاهچه اقدام می‌شود. در مرحلهٔ پرآوری معمولاً نسبت سیتوکینین‌ها به اکسین‌ها بیشتر است. در پژوهش حاضر نیز از هورمون BAP جهت پرآوری استفاده شد. Shibli و همکاران (۱۹۹۷) برای پرآوری گلابی *P. syrica* بهترین رشد را روی محیط ۱/۵ تا دو میلی‌گرم در لیتر BAP و Freire و همکاران (۲۰۰۲) در ریزازدیادی گلابی (Rocha)، غلظت بالای BAP را موجب افزایش تعداد شاخه بیان کرده‌اند که یافته‌های حاصل از این بررسی را تأیید می‌کند. Berardi و همکاران (۱۹۹۲) گزارش کرده‌اند که غلظت بهینهٔ BA برای تولید شاخسارهٔ *P. calleryana*، ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر است. Saadat و همکاران (۲۰۱۳) در پژوهشی روی ریزافزایی گلابی خودروی گونهٔ *Pyrus syriaca* بیان کرده‌اند که محیط MS دارای ۰/۸ تا ۱ میلی‌گرم در لیتر BA مناسب شاخساره‌زایی است. در پژوهشی بیان شده است که افزایش یک میلی‌گرم در لیتر BA به محیط کشت برای تولید شاخساره در گلابی کافی است، اما مقدار آن بر اساس نوع گونه و رقم گلابی می‌تواند تغییر یابد (Morreti *et al.*, 1991). Moghimi و Safarnejad (۲۰۱٤) در بررسی روی زالزالک، بهترین محیط برای پرآوری (Proliferation) محیط MS همراه با ۱ میلی‌گرم در لیتر BA و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر IAA (Indole-3- Acetic Acid) به دست آورده‌اند. همچنین در پژوهش دیگری اثر سایتوکینین‌های مختلف را روی رقم‌های گلابی ژاپنی متعلّق به گونهٔ *P.pyrifolia* بررسی کردند و بالاترین میزان

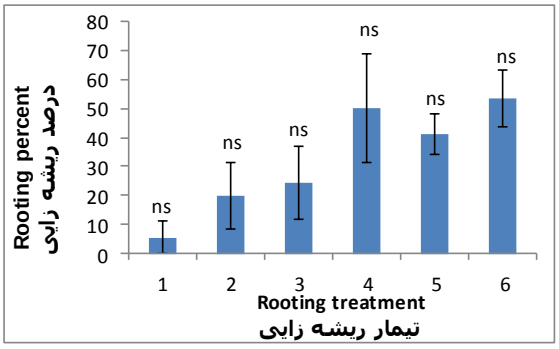
پرآوری را در غلظت ۲/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP مشاهده کرده‌اند (Kadota and Niimi, 2003). Saboora و Shokri (۲۰۱۳) در بررسی روی گیاه دارویی برازمبل نتیجه گرفته‌اند که بیشینهٔ میانگین تعداد نوشاخه‌های تشکیل‌شده با کاربرد ۲/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP به‌تنهایی حاصل شده بود. Karami و همکاران (۲۰۱۳) در پژوهشی روی گیاه لوبیا نتیجه گرفته‌اند که در فرایند ریشه‌زایی با افزایش غلظت هورمون آلفا-نفتالین استیک اسید، ریشه‌زایی افزایش یافته است.

ریشه‌زایی: نتایج حاصل از تحلیل داده‌های ریشه‌زایی نشان داد که بین تیمارهای استفاده‌شده از نظر درصد ریشه‌زایی، طول ریشه و تعداد ریشه تفاوت معنی‌داری وجود ندارد.

مقایسهٔ میانگین درصد ریشه‌زایی با آزمون دانکن نشان داد که درصد ریشه‌زایی در اثر تیمارهای مختلف، تفاوت معنی‌داری از خود نشان نداد (شکل ۶). درصد ریشه‌زایی مربوط به تیمار ۴ و ۶ (به‌ترتیب MS + 3 mg/l IBA و MS/2 + 2 mg/l IBA)، ۵۰ و ۵۳ درصد ریشه‌زایی به دست آمد.







شکل ۶- مقایسهٔ میانگین تیمارهای مختلف ریشه‌زایی از جنبهٔ صفات مختلف از طریق آزمون دانکن

۱: MS +0.5 mg/l IBA, ۲: MS+1 mg/l IBA, ۳: MS+2 mg/l IBA, ۴: MS+3 mg/l IBA, ۵: MS+5mg/l IBA, ۶: MS/2+2mg/l IBA

داده‌ها میانگین ۵ تکرار± انحراف معیار است. حروف یکسان نشان‌دهندهٔ نبودن اختلاف معنی‌دار با استفاده از آزمون دانکن است.

نتایج بررسی میانگین طول ریشه نیز نشان داد که تیمار MS/2 + 2 mg/l IBA، طول ریشه به اندازهٔ Cm ۲/۶ داشت. نتایج مقایسهٔ میانگین تعداد ریشهٔ نهال‌ها نشان داد که گیاهچه‌ها در اثر تیمار MS + 1 mg/l IBA، ۵/۷ عدد ریشه داشت. گیاهان ریشه‌دارشده پس از گذراندن مراحل مختلف سازگاری به خاک منتقل شدند (شکل ۷).

شکل ۷. نمونهٔ ریشه‌دارشده و گیاهچه‌های سازگارشدهٔ گلابی

در گیاهان معمولاً اکسین‌ها مسئول تحریک ریشه‌زایی هستند. یکی از متداول‌ترین اکسین‌های استفاده‌شده در کشت، بافت گیاهی IBA است. در مرحلهٔ ریشه‌زایی عمدتاً نسبت اکسین‌ها به سیتوکینین‌ها بیشتر است. در بررسی حاضر برای ریشه‌زایی از هورمون IBA استفاده شد و غلظت‌های ۲ و ۳ میلی‌گرم در لیتر، نتایج مناسب‌تری دربرداشتند. در پژوهشی، تیمار کوتاه‌مدّت با ۲ میلی‌گرم در لیتر IBA برای ریشه‌زایی پایه‌های گلابی توصیه شده است که با نتایج این پژوهش مطابقت دارد (Khodaee Chghani *et al.*, 2011). همچنین در آزمایشی برای ریزازدیادی (Micropropagation) گلابی *Pyrus pyrifolia*، بهترین پاسخ ریشه‌دهی در محیط‌کشت MS که مقدار نمک‌های آن نصف شده بود، مشاهده شد که یافته‌های پژوهش حاضر را تأیید می‌کند Zafrul and Kaloo, (2010). Darroudi و همکاران (۲۰۱۵) در بررسی روی قره‌قات نتیجه گرفته‌اند که بستر MS همراه با ۰/۵ یا ۲ میلی‌گرم در لیتر IBA برای القای ریشه‌زایی مطلوبتر بوده است. Poordad و همکاران (۲۰۱۴) در پژوهشی روی سماق گزارش کرده‌اند که بیشترین میزان ریشه‌زایی در محیط‌کشت MS کامل با غلظت ۱ میلی‌گرم در لیتر IBA رخ داده است. Saadat و همکاران (۲۰۱۳) بیان کرده‌اند، شاخساره‌های گلابی خودروی گونهٔ *Pyrus syriaca* کشت‌شده به مدّت ۲۴ ساعت در تاریکی روی محیط کشت ویژهٔ گردوی درایور و کانی یوکی (DKW) با نصف غلظت عناصر

ماکرو و با ۷۵ میلی‌گرم در لیتر IBA پس از انتقال به گلدان‌های جیفی، ۱۰۰ درصد ریشه‌دار شده‌اند. Shibli و همکاران (۱۹۹۷) ۷۲ درصد ریشه‌زایی را با استفاده از محیط کشت MS دارای ۳ میلی‌گرم در لیتر IBA در *Pyrus syriaca* نشان داده‌اند. Modarres و همکاران (۲۰۱۲) در بررسی روی گیاه نوروزک بیان کرده‌اند که برای ریشه‌زایی ساقه‌ها، وجود اکسین ضروری است. IBA در غلظت ۱ میلی‌گرم در لیتر، بهترین تیمار ریشه‌زایی بوده است.

با توجّه به نتایج به‌دست‌آمده، تیمار ۴ و ۶ (MS + 3 mg/l IBA و MS/2 + 2 mg/l IBA) به‌ترتیب ۵۰ و ۵۳ درصد ریشه‌زایی داشتند، ولی چون تیمار MS + 3 mg/l IBA علاوه بر ریشه‌زایی، القای کالوس فراوان را نیز موجب می‌شود، از سوی دیگر کالوس، آلودگی بستر پس از انتقال به شرایط خارج از شیشه را ایجاد می‌کند و تیمار MS/2 + 2 mg/l IBA دارای ریشه‌های قطورتر، متراکم‌تر و طویل‌تر است، بنابراین تیمار MS/2 + 2 mg/l IBA برای القای ریشه‌زایی مناسبتر به نظر می‌رسد.

نتیجه‌گیری کلّی

با توجّه به نتایج می‌توان گفت که غلظت‌های ۱ تا ۳ میلی‌گرم در لیتر هورمون BAP همراه با ۰/۰۱ تا ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر هورمون IBA، میزان باززایی (Regeneration) مطلوبتری نسبت به محیط‌های فاقد اکسین دارد. با افزایش غلظت سیتوکینین استفاده‌شده، میزان ضریب تکثیر بهبود می‌یابد و با توجّه به طول ساقهٔ گیاهچه‌ها و ضریب تکثیر آن، غلظت پنج میلی‌گرم در لیتر برای تکثیر گیاهچه‌ها مناسبتر است.

منابع

Abdollahi, H., Muleo, R. and Rugini, E. (2006) Optimization of regeneration and maintenance of morphogenic callus in pear (*Pyrus communis* L.) by simple and double regeneration techniques. Scientia Horticulturae 108: 352-358.

Baghery, A. and Safari, M. (2004) Plant Tissue Culture. Mashhad Ferdowsi University Publication, Mashhad (in Persian).

Berardi, G., Infante, R. and Neri, D. (1992) Micropropagation of *Pyrus calleryana* Dcn. from seedlings. Scientia Horticulturae 53: 157-165.

D`Amico, C., Frattarelli, A. and Giorgioni, M. (2002) Micropropagation of pear through temporary immersion. Acta Horticulturae 596: 425- 429.

Darroudi, H., Akbarinia, M., Safarnejad, A., Hosseini, S. M. and Hajian Shahri, M. (2015) Micropropagation of *Ribes khorasanicum* species by tissue culture. Iranian Journal of Rangelands Forests Plant Breeding and Genetic Research 23 (1): 65-76 (in Persian).

Davarynejad, GH., Hassanpour, H., Azizi, M. and Sgahriaree, F. (2007) Investigation on the possibility of reducing graft incopatibility in some Iranian pear cultivars on Quince A by inter stocks. Agriculture Sciences and Technology Journal 21(1): 45-55.

Ermel, F. F., Kervella, J., Catesson, A. M. and Poessel, J. L. (1999) Localized graft incompatibility in pear/quince (*Pyrus communis*/*Cydonia oblonga*) combinations: multivariate analysis of histological data from 5-month-old grafts. Tree Phsiology 19: 645-654.

Freire, I., Oelho, C. and Barros, M. (2002) Improved culture media for the *in vitro* establishment of pear from nodal cuttings. Acta Horticulturae 569: 457- 461.

Goleyjani Moghaddaam, R., Motallebi, M., Zamani, M. R. and Rezanejad, H. (2012) Optimization of regeneration and transformation of canola Hyola 308 and RGS003 lines. Iranian Journal of Plant Biology 4(11): 47-60 (in Persian).

Khodaee Chghani, F., Abdollahi, H., Ershadi, A. and Asna Ashari, M. (2011) Assessment micropropagation of pear OH×F69 and OH×F333. Seed and Plant Production Journal 27-2(3): 297-312 (in Persian).

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

Karami, M., Bagherieh-Najjar, M. B. and Aghdasi, M. (2013) Optimization of conditions suitable for bean (*Phaseolus vulgaris* L.) regeneration. Iranian Journal of Plant Biology 5(15): 1-14 (in Persian).

Lambardi, M. and Rugini, E. (2003) Micropropagation of Olive (Olea europaea L.), In: S. M. Jain and K. Ishii, Eds., Micropropagation of Woody Trees and Fruits. Kluwer Academic Publishers, The Netherlands pp 621-646.

Jakson, J. E. (2003) Biology of Apples and Pears. Cambridge: Cambridge University Press Cambridge.

Julesm, J. and James, N .M. (1996) Pears in Fruit breeding .Tree and Tropical Fruits 1: 441-514.

Modarres, M., Lahouti, M., Gangeali, A. and Asili, J. (2012) Study of micropropagation of *Salvia leriifolia* Benth using shoot tip. Iranian Journal of Plant Biology 4(14): 89-100 (in Persian).

Moghimi, Z. and Safarnejad, A. (2014) Assessment of micropropagation and flavonoid content of hawthorn through tissue culture. Iranian Journal of Rangelands Forests Plant Breeding and Genetic Research 22(2): 181-191 (in Persian).

Moretti, C., Scozzoli, A., Passini, D. and Pagannelli, F. (1991) *In vitro* propagation of pear cultivars. Acta Horticulturae 300: 115-122.

Nee, C. C., Tsai, C. H. and Anstine, D. D. (2002) Asian pears germplasm future trends and current research in the industry. Acta Horticulture 587: 61-69.

Nosrati, S. Z., Zamani, Z. and Babalar, M. (2009) Micropropagation of four cultivar of pear (*Pyrus communis* L.). Iranian Journal of Horticulture Science 40(2): 83-91.

Poordad, B., Safarnejad, A., Ebrahimi, M. A. and Bakhshi Khaniki, Gh. (2014) Investigation of effective factors on sumac *In vitro* propagation. Iranian Journal of Rangelands Forests Plant Breeding and Genetic Research 22(1): 25-33 (in Persian).

Previati, A., Darei, F., Bassi, D., Tagliavini, M. and Marangoni, B. (2002) Development of protocols for *in vitro* propagation of advanced selections of *Pyrus communis* rootstocks 69BIS. Acta Horticulturae 596: 505-508.

Reed, B. M., DeNoma, J., Wada, S. and Postman, J. (2013) Micropropagation of Pear (*Pyrus* sp.). Methods in Molecular Biology 11013: 3-18.

Saadat, Y. A., Mousavi, B. and Beheshti Rooy, S. H. (2013) Micropropagation of Wild Pear (*Pyrus syriaca*). Agricultural Biotechnology 11(2): 1-8 (in Persian).

Saboora, A. and Shokri, M. (2013) Effect of plant growth regulators on *in vitro* germination and micropropagation of Brazmbl (*Perovskia abrotanoides*), a medicinal plant. Iranian Journal of Plant Biology 5(18): 95-114 (in Persian).

Saeedi Heidari, A. and Safarnejad, A. (2015) Micropropagation of *Acer monospessulanum* through tissue culture. Iranian Journal of Rangelands Forests Plant Breeding and Genetic Research 23(2): 237-246 (in Persian).

Safarnejad, A. (2015) Effects of growth regulators on *in vitro* regeneration of *Ziziphus Jujube*. Iranian Journal of Rangelands Forests Plant Breeding and Genetic Research 23(1): 40-48 (in Persian).

Shibli, R. A., Ajlouni, M. M., Jaradat, A., Aljanabi, S. and Shatnawi, M. (1997) Micropropagation in wild pear (*Pyrus syrica*). Scientia Horticulturae 68: 237-242.

Songül, G. and Yucel, G. (1998) The effects of different sucrose, Agar and pH Levels on *In vitro* shoot production of Almond (*Amygdalus communis* L.) .Tr. Journal of Botany 22: 363-373.

Tahzibi Hagh, F., Abdolahi, H., Ghasemi, A. and Fathi, D. (2011) variation of vegetative traits in pear (*Pyrus communis* L.) native to Iran under weather condition of Karaj. Seed and Plant Improvement Journal 27(1): 37-55 (in Persian).

Zafrul, H. and Kaloo, Z. A. (2010). *In vitro* micropropagation of “sand pear”*Pyrus pyrifolia* (Burm. f.) Nakai. Frontiers of Agriculture in China 4(3): 358-361.

Zhu, L. H., Li, X. Y., Ahlman, A. and Welander, M. (2003) The rooting ability of the dwarfing pear rootstock BP 100030 (*Pyrus communis*) was significantly increased by introduction of the *rol*B gene. Plant Science 165: 829-853.

The effect of growth regulators (BAP and IBA) on regeneration, proliferation and rooting of Natanz pears plant using *in vitro* technique

Abbas Safarnejad [1]*, Seyedeh Bibi Leyla Alamdari [2], Hadi Darroudi [2] and Marzieh Dalir [2]
[1] Faculty member of Khorasan Razavi Agricultural and Natural Resources Research Center or Mashhad Branch, Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Mashhad, Iran.
[2] Tissue Culture Research Department, Mashhad Branch, Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Mashhad, Iran

Abstract
Pear (*Pyrus* sp.) is an important fruit growing in temperate and cold areas that due to suave and high economic value were cultured since ancient in Iran. The purpose of this study was to identify the best media for fast propagation of healthy plants of *Pyrus* sp. using tissue culture technique. At first, the pears samples were collected from the garden of Astan Quds Razavi and lateral and terminal buds were used as explants. For sterilization 0.1% mercuric chloride for 3 minutes, 70% ethanol for 1 minute was the best treatment. A Complete Randomized Design experiment was carried out with 3 replications. Results showed that Regeneration initiated on MS basal medium supplemented with 3 mg/l BAP + 0.01 mg/l IBA. The most multiplication was on MS medium supplemented with 0.1 mg/l IBA +3 mg/l BAP. The highest shoot length was observed in MS medium supplemented with 0.01 mg/l IBA +3 mg/l BAP. The results of ANOVA showed no significant differences between rooting treatment. The rooted plantlets transferred to Jf pot for adaptation and then transferred to soil.
Key words: Pear, Plant hormones, Tissue culture.

* sebre14@abrii.ac.ir

Copyright©2016, University of Isfahan. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (http://creativecommons.org/licenses/BY-NC-ND/4.0), which permits others to download this work and share it with others as long as they credit it, but they cannot change it in any way or use it commercially.