Archive of SID

"نهال و بذر"
جلد ۱۸، شماره ۳، آذر ۱۳۸۱

بررسی ازدیاد درون‌شیشه‌ای برخی از ارقام گلابی آسیایی (*Pyrus serotina* Rehd.)*

Study on *in vitro* Propagation of some Asian Pear (*Pyrus serotina* Rehd.) Cultivars

محمودرضا روزبان، کاظم ارزانی و احمد معینی

دانشکده کشاورزی دانشگاه تربیت مدرس

تاریخ دریافت: ۸۰/۸/۲۰

چکیده

روزبان، م.ر.، ارزانی، ک.، و معینی، ا. ۱۳۸۱. بررسی ازدیاد درون‌شیشه‌ای برخی از ارقام گلابی آسیایی (*Pyrus serotina* Rehd) نهال و بذر ۱۸: ۳۶۱-۳۴۸.

آزمایش‌هایی به منظور بررسی ازدیاد درون‌شیشه‌ای ۹ رقم از ارقام اصلاح شده گلابی آسیایی (*Pyrus serotina* Rehd.) به نام‌های 'KS$_6$'، 'KS$_7$'، 'KS$_8$'، 'KS$_9$'، 'KS$_{10}$'، 'KS$_{11}$'، 'KS$_{12}$'، 'KS$_{13}$' و 'KS$_{14}$'، انجام و اثر محیط‌های کشت و تنظیم‌کننده‌های رشد بر ریزازدیادی آن‌ها بررسی شد. بدین منظور، ریزنمونه‌های تک‌گره‌ای از شاخه‌های رشد فصل بهار پس از برداشت و ضدعفونی سطحی، روی سه محیط کشت پایه MS، MS نیم غلظت نمک‌ها (MS $\frac{1}{2}$) و WPM همراه با یک میلی‌گرم در لیتر بنزیل آمینوپیورین (BAP) کشت شدند. در فاز استقرار، رشد و پرآوری ریزنمونه‌های ارقام مورد آزمون، تنها در ۵ رقم 'KS$_7$'، 'KS$_8$'، 'KS$_{12}$'، 'KS$_{13}$'، 'KS$_{14}$' حاصل شد و بهترین محیط کشت برای رشد ریزنمونه‌ها، محیط WPM بود. در فاز تکثیر، شاخاره‌های تولید شده در شرایط درون‌شیشه‌ای، چهار بار به فاصله زمان‌های یک ماهه روی محیط‌های کشت پایه حاوی غلظت‌های مختلف BAP (صفر، ۱ و ۲ میلی‌گرم در لیتر) زیر کشت شدند که بالاترین میزان پرآوری در غلظت $2\ mg\ l^{-1}$ BAP به دست آمد. ضمن آنکه به موازات افزایش غلظت BAP در این فاز، از طول شاخاره‌های پرآور شده کاسته و به درصد شاخاره‌های شیشه‌ای شده افزوده شد. بهترین محیط کشت برای پرآوری شاخاره‌های رقم 'KS$_7$'، محیط WPM بود در حالی که تفاوت معنی‌داری بین محیط‌های کشت پایه در میزان پرآوری شاخاره‌های ارقام دیگر (به جز رقم 'KS$_{14}$' که پرآوری آن در محیط کشت WPM نسبت به محیط MS $\frac{1}{2}$ برتری داشت) مشاهده نشد. به علاوه، به موازات افزایش تعداد زیرکشت در این فاز، به میزان پرآوری شاخاره نیز افزوده شد. به منظور ریشه‌زایی شاخاره‌ها، از محیط کشت MS $\frac{1}{2}$ همراه با غلظت‌های مختلف ایندول بوتیریک اسید (IBA) استفاده شد بدین صورت که شاخاره‌ها ابتدا برای زمان‌های مختلف روی محیط کشت مذکور کشت شدند و سپس به محیط کشت MS کامل بدون هورمون منتقل شدند. پس از گذشت دو ماه، ریشه‌زایی شاخاره‌های ریزازدیاد شده در هیچ یک ارقام مشاهده نشد.

واژه‌های کلیدی: گلابی آسیایی؛ محیط کشت؛ ریزازدیادی؛ کشت بافت.

* مواد گیاهی این پژوهش از طریق پروژه تحقیقات ملی (شورای پژوهشهای علمی کشور) به شماره ۴۲۲۵ که در گروه باغبانی دانشگاه تربیت مدرس در حال اجراست تأمین گردیده است و مقاله حاضر قسمتی از پایان‌نامه کارشناسی ارشد نگارنده اول می‌باشد که به دانشگاه تربیت مدرس ارائه شده است.

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

استفاده از شیوه‌های کشت بافت به منظور تکثیر تجاری ارقام درختان میوه، از چند دهه اخیر آغاز شده و در حال حاضر در بسیاری از گونه‌ها، مکمل شیوه‌های مرسوم ازدیاد بشمار می‌آید. دلایل بسیاری برای توسعه روش ریزازدیادی در درختان میوه وجود دارد از جمله این که امکان تولید نهال در تمام طول سال، در کوتاه‌ترین زمان و در کمترین فضای رشد امکان‌پذیر می‌شود و به تبع آن، هزینه تولید نهال کاهش می‌یابد. ضمن آن که به ازدیاد سریع ارقام گیاهی وارداتی، پس از خروج آن‌ها از دوره‌قرنطینه کمک می‌کند (Bhojwani *et al.*, 1984).

گلابی یکی از مهم‌ترین درختان میوه مناطق معتدله محسوب می‌شود که به دلیل طعم مناسب و ارزش اقتصادی بالای آن، سالیان متمادی است که در ایران پرورش می‌یابد (خوشخوی و همکاران، ۱۳۷۳). با وجود این، صنعت میوه‌کاری ایران هنوز کشت و پرورش ارقام گلابی آسیایی (*Pyrus serotina* Rehd.) را تجربه نکرده است (ارزانی، ۱۳۷۹؛ Arzani, 2000). گلابی آسیایی، یکی از گونه‌های قدیمی گلابی است که از دو دهه گذشته، علاقمندی به پرورش ارقام اصلاح شده آن در جهان رو به تزاید گذاشته است (Rossi *et al.*, 1991).

ازدیاد ارقام گلابی معمولا توسط پیوند روی پایه بذری گلابی معمولی (*Pyrus communis*) یا پایه کلونی به (*Cydonia oblonga* L.) و یا گونه‌های دیگر گلابی که خود توسط قلمه یا خوابانیدن تکثیر می‌شوند، صورت می‌گیرد (Al-Maarri *et al.*, 1994؛ Hartmann *et al.*, 1990). این فرایند علی‌رغم وابسته بودن به فصول خاصی از سال، نیازمند صرف زمان طولانی، تسهیلات خزانه‌ای زیاد و مهارت‌های فردی ویژه می‌باشد (Al-Maarri *et al.*, 1994) از طرفی گزارش شده است که ریشه‌زایی قلمه‌های چوب سخت یا نرم گلابی با وجود اعمال تیمارهای هورمونی مختلف، به سختی صورت می‌گیرد (Arzani 2002b; Fadl and Hartmann, 1967) و یا اصلا امکان‌پذیر نیست (Shibli *et al.*, 1997). با توجه به محدودیت‌های فوق، استفاده از شیوه نوین ریزازدیادی (Micropropagation) به منظور تکثیر انبوه ارقام برتر اجتناب‌ناپذیر به نظر می‌رسد. در حال حاضر، گزارش‌هایی در مورد استفاده از روش ریزازدیادی برای تکثیر پایه‌های گلابی موجود است (Rossi *et al.*, 1991؛ Yeo and Reed, 1995؛ Berardi *et al.*, 1993) که در عموم آنها، ریزازدیادی تحت تأثیر نوع محیط کشت و غلظت تنظیم‌کننده‌های رشد قرار گرفته است. اما استفاده از این روش برای ارقام گلابی به ویژه ارقام گلابی آسیایی، کمتر توسعه یافته است (Sansavini, 1994؛ Bhojwani *et al.*, 1984) در این راستا، پژوهش حاضر با هدف بررسی

www.SID.ir

Archive of SID

امکان ریزازدیادی ۹ رقم از ارقام اصلاح شده گلابی آسیایی و در صورت امکان، بهینه‌سازی این روش در راستای دست‌یابی به یک پروتکل مناسب جهت تکثیر انبوه آن‌ها از طریق تعیین اثر محیط‌های کشت و تنظیم‌کننده‌های رشد بر مراحل ریزازدیادی آن‌ها صورت گرفت.

مواد و روش‌ها

قطعات گره‌ای (Nodal segments) ۹ رقم اصلاح شده گلابی آسیایی به نام‌های 'KS_6'، 'KS_7'، 'KS_8'، 'KS_9'، 'KS_{10}'، 'KS_{11}'، 'KS_{12}'، 'KS_{13}' و 'KS_{14}' که در فصل بهار از شاخه‌های در حال رشد ارقام مذکور برداشت شده بود، به عنوان مواد گیاهی آزمایش، مورد استفاده قرار گرفت (Arzani 2002a and b). پس از گرفتن نمونه‌های گیاهی از نهال‌های دو ساله پیوندی در گلخانه گروه باغبانی دانشگاه تربیت مدرس و انتقال آن‌ها به آزمایشگاه، ابتدا برگ‌های آن‌ها حذف شد و به منظور زدودن گرد و غبار از روی آن‌ها، با استفاده از مایع دست‌شویی "گلرنگ" شستشو شدند. به منظور ضدعفونی سطحی، ابتدا نمونه‌های گیاهی در اتانول ۷۰٪ حجمی به مدت ۳۰ ثانیه غوطه‌ور و سپس ۲۰ دقیقه در محلول هیپوکلریت سدیم (NaCl) ۲٪ وزنی، که ۰/۱٪ حجمی توین ۲۰ (Tween 20) نیز به آن افزوده شده بود، خیسانده و در انتها سه مرتبه با آب مقطر استریل شده آبکشی شدند. در این مرحله با حذف مقداری از دو انتهای هر ریزنمونه (Explant)، آن‌ها به قطعات تک‌گره‌ای به طول ۱۲-۸ mm تفکیک شدند و سپس در لوله‌های آزمایش روی محیط‌های غذایی کشت گردیدند و به اتاق رشد انتقال داده شدند. شرایط اتاق رشد عبارت بود از دمای 25 ± 1 °C و دوره نوری ۱۶ ساعت که با لامپ‌های فلورسنت ۴۰ وات تأمین می‌شد.

محیط‌های کشت پایه مورد استفاده شامل سه محیط کشت MS (Murashige and Skoog, 1962)، محیط کشت MS نیم غلظت نمک‌ها ($\frac{1}{2}$MS) و محیط کشت گیاهان چوبی یا WPM (Lloyd and McCown, 1980) بود که به ترتیب ۳٪، ۳٪ و ۲٪ سوکروز، $6\ gl^{-1}$ آگار- آگار (Agar-agar) و $1\ mg\ l^{-1}$BAP به آن‌ها افزوده، و به ترتیب بر روی PH ۵/۸، ۵/۸ و ۵/۶ تنظیم شدند. سپس ۱۰ml از محلول‌های فوق در لوله‌های آزمایش با ابعاد ۱۵۰ mm × ۲۵ توزیع و به مدت ۲۰ دقیقه در اتوکلاو (دمای ۱۲۱ °C و فشار بخار ۱/۲ بار) استریل گردیدند.

یکی از مشکلات فاز استقرار که در کشت مقدماتی ریزنمونه‌ها مشاهده شد، قهوه‌ای شدن (Browning) بافت آن‌ها در اثر ترشح مواد فنلی بود که باعث از دست رفتن تعداد قابل توجهی از ریزنمونه‌های اولیه می‌شد. به منظور مقابله با این معضل و با هدف افزایش میزان بقای ریزنمونه‌ها در محیط‌های کشت مذکور، تیمارهای شیمیایی مختلفی در طی دو هفته

www.SID.ir

Archive of SID

ابتدایی کشت ریزنمونه‌ها در قالب یک آزمایش فاکتوریل روی ترکیب هر سه محیط کشت پایه اعمال شد که شامل حذف عنصر مس (سولفات مس) از ترکیب محیط‌های کشت، افزودن مواد آنتی‌اکسیدانت ($100 mg\ l^{-1}$ اسید آسکوربیک + $150\ mg\ l^{-1}$ اسید سیتریک) و جاذب ترشحات ($2/5\ g\ l^{-1}$ زغال فعال و $0/1\ g\ l^{-1}$ پلی‌وینیل پیرولیدون (PVP)) به محیط‌های کشت بود. لازم به ذکر است به منظور استریلیزاسیون مواد حساس به گرما، از صافی‌هایی با منافذ ۰/۲۲ میکرون استفاده شد، بدین ترتیب که ابتدا مقدار مورد نیاز این مواد در حجم مشخصی از آب مقطر حل شده، پس از تنظیم pH و گذر از صافی، در شرایط استریل به باقی ترکیبات محیط کشت که بعد از خروج از اتوکلاو تا دمای $40-30^{\circ}C$ خنک شده بودند، افزوده شد.

پس از کشت ریزنمونه‌ها روی محیط‌های کشت حاوی هر یک از ترکیبات تیماری فوق، ظروف کشت در شرایط تاریکی در اتاق رشد قرار گرفت. در پایان هفته دوم کشت ریزنمونه‌ها، تعداد ریزنمونه‌های سالم هر ترکیب تیماری یادداشت شد. سپس کشت‌های صدمه دیده یا آلوده شده به سرعت حذف و ریزنمونه‌های سالم به طور ماهانه به محیط کشت جدید و شرایط نوری اتاق رشد انتقال داده شدند. پس از گذشت ۴۵-۳۰ روز از کشت، ریزنمونه‌ها به تدریج شروع به رشد نمودند. فاز استقرار کشت در حدود سه ماه ادامه یافت. شاخساره‌های به دست آمده در پایان این مرحله، طولی در حدود 1/5-1 cm همراه با برگ‌های کاملا توسعه یافته داشتند. در انتهای این فاز، درصد ریزنمونه‌های ارقام مختلف که روی هر یک از محیط‌های کشت، تولید شاخساره کرده بودند محاسبه شد. به منظور افزایش مواد گیاهی برای ادامه آزمایش، شاخساره‌های درون‌شیشه‌ای (*in vitro* shoots) فوق به قطعات گره‌ای (به طول 10-8 mm) تقسیم و به طور ماهانه و به مدت دو ماه بر روی سه محیط کشت پایه اولیه حاوی $1\ mg\ l^{-1}$ BAP زیر کشت (Subculture) شدند.

به منظور تعیین میزان پرآوری (شاخه‌زایی) شاخساره‌های پرآور شده از کشت تک‌گره، آن‌ها پس از جدا شدن از شاخساره مادری، روی همان سه محیط کشت پایه مرحله قبل اما با سه غلظت متفاوت BAP (صفر، ۱ و ۲ میلی‌گرم در لیتر) زیر کشت شدند. این عمل به طور ماهانه و تا چهار ماه ادامه یافت و میزان پرآوری شاخساره از زیر کشت چهارم تا هفتم تعیین شد. بدین صورت که در پایان هر ماه، تعداد شاخساره‌های جانبی پرآور شده (طویل‌تر از 5mm) روی هر شاخساره مادری، ابتدا شمارش و سپس آن‌هایی که دارای طولی در حدود 10-8mm بودند، مجددا روی محیط کشت تازه زیر کشت شدند اما به شاخساره‌هایی که طول کمتری داشتند، اجازه داده شد مدت بیشتری

www.SID.ir

Archive of SID

رشد کنند تا به اندازه مورد نظر برای زیرکشت برسند و پس از آن زیرکشت صورت می‌گرفت. توضیح این که جدا کردن شاخساره‌های منفردی که طولی کمتر از حد فوق را به هنگام هر زیر کشت دارا بودند، سودمند نبود و این شاخساره‌ها به طور قابل توجهی نیازمند مدت زمان بیشتری برای آغاز رشد مجدد نسبت به آن‌هایی که به شاخساره مادری متصل بودند یا طول بیشتری داشتند، بودند. آزمایش به کار رفته در این مرحله، به صورت فاکتوریل (سه فاکتوره) با طرح پایه بلوک‌های کامل تصادفی (RCBD) و شامل چهار تکرار بود که هر تکرار از سه ریزنمونه تشکیل شده بود. انتخاب طرح پایه بلوک به این سبب بود که بتوان اختلاف احتمالی بین میزان‌های پرآوری را در زیرکشت‌های مختلف از هم تمیز داد. به لحاظ طول نیز شاخساره‌های پرآور شده در این فاز در سه گروه شاخساره‌های ۷-۵ mm، ۱۰-۷ mm و شاخساره‌های طویل‌تر از ۱۰ mm طبقه‌بندی شدندو بدین ترتیب، اثر غلظت‌های مختلف BAP بر طول شاخساره‌های پرآور شده تعیین شد. همچنین در این مرحله، درصد شاخساره‌های‌شیشه‌ای شده (Vitrified shoots) روی هر محیط کشت و هر غلظت BAP نیز محاسبه شد.

به منظور تحریک رشد طولی شاخساره‌های پرآور شده که در این زمان طولی در حدود ۱/۵-۰/۵cm را دارا بودند، آن‌ها به محیط‌های کشت پایه عاری از تنظیم‌کننده رشد BAP منتقل گردیدند. در پایان ماه، شاخساره‌هایی که به طول ۳-۲ cm رسیده بودند، برای ریشه‌زایی روی محیط کشت ($\frac{1}{2}$MS) تحت ٤ تیمار قرار گرفتند. تیمارهای ریشه‌زایی به کار رفته شامل غلظت‌های ۱، ۲ و ۳ میلی‌گرم در لیتر IBA بدون زغال فعال شده و غلظت $3\ mg\ l^{-1}$ IBA همراه با $2\ g\ l^{-1}$ زغال فعال شده (به منظور تاریک شدن محیط کشت) بود. پس از انتقال شاخساره‌ها روی محیط‌های کشت حاوی تیمارهای چهارگانه ریشه‌زایی، ظروف کشت سه تیمار اول در سه دوره زمانی ٤، ۸ و ۱۲ روز در شرایط تاریکی در اتاق رشد قرار داده شدند (ظروف کشت تیمار ریشه‌زایی چهارم تحت همان سه دوره زمانی اما در شرایط نوری اتاق رشد قرار گرفتند). پس از طی این دوره، شاخساره‌ها به محیط کشت MS کامل عاری از هر گونه تنظیم‌کننده رشد و شرایط نوری اتاق رشد منتقل شدندو به مدت دو ماه تحت نظر قرار گرفته شدند.

در پایان، تجزیه آماری داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار MSTATC و مقایسه میانگین‌ها بر اساس آزمون چند دامنه‌ای دانکن (DMRT) انجام شد.

نتایج و بحث

۱ـ استقرار کشت

در فاز استقرار کشت، رشد و پرآوری ریزنمونه‌های ارقام مورد آزمون، تنها در ۵ رقم 'KS_7'، 'KS_8'، 'KS_{12}'، 'KS_{13}' و 'KS_{14}'

www.SID.ir

Archive of SID

حاصل شد و ریزنمونه‌های ارقام 'KS$_6$'، 'KS$_9$'، 'KS$_{10}$' و 'KS$_{11}$' به طور موفقیت‌آمیزی رشد نکرده و پس از چند هفته از بین رفتند. عدم رشد و پرآوری ریزنمونه‌های ٤ رقم از ارقام مورد آزمون را در این مرحله شاید بتوان به عوامل ژنتیکی، ادامه ترشحات فنلی و یا عدم تناسب ترکیب محیط‌های کشت مورد استفاده با نیازهای آن ارقام نسبت داد. استقرار و رشد ناموفق ریزنمونه‌ها، در گونه‌های *Pyrus calleryana* Dcn. و *P.dimorphophylla* نیز قبلا گزارش شده است (Banno *et al.*, 1988).

بهترین ترکیب تیماری فاز استقرار برای مقابله با قهوه‌ای شدن ریزنمونه‌ها در دو هفته اول کشت آن‌ها، افزودن ۲/۵ g l^{-1} زغال فعال شده به محیط‌های کشت به همراه حذف مس از ترکیب آن‌ها بود. همچنین، افزودن زغال فعال شده یا مواد آنتی‌اکسیدانت به ترکیب محیط‌های کشت و حذف عنصر مس از ترکیب آن‌ها، هر یک به تنهایی نیز اثر مثبتی در میزان بقای ریزنمونه‌های اولیه در هفته اول کشت آن‌ها داشت. این نتیجه برخلاف گزارشی بود که افزودن زغال فعال شده را به تنهایی برای مقابله با ترشحات فنلی ریزنمونه‌های ارقام گلابی آسیایی مؤثر نمی‌دانست (Banno *et al.*, 1989).

۲ـ اثر محیط کشت بر رشد ریزنمونه‌ها

محیط‌های کشت پایه بر درصد ریزنمونه‌های ارقام مختلف گلابی آسیایی که در فاز استقرار تولید شاخساره نمودند، اثرات متفاوتی گذاشتند (جدول ۱). بدین ترتیب که محیط کشت WPM برای رشد ریزنمونه‌های استقرار یافته هر پنج رقم، بهترین نتایج را به همراه داشت. همچنین تولید شاخساره از ریزنمونه‌ها در محیط کشت MS $\frac{1}{2}$ نسبت به محیط MS کامل برتری داشت، اما این برتری معنی‌دار نبود.

جدول ۱ـ اثر محیط‌های کشت مختلف بر درصد ریزنمونه‌هایی که تولید شاخساره کردند (n = ۱٦۰)

Table 1. Effects of different culture media on percentages of explants produced shoots (n = 160)

	محیط کشت Culture medium		
	MS	$\frac{1}{2}$ MS	WPM
Shooted explants (%) ریزنمونه‌های رشد کرده (٪)	53.125 b	64.375 ab	73.125 a

رشد و تولید شاخساره در ریزنمونه‌های ارقام 'KS$_6$'، 'KS$_9$'، 'KS$_{10}$' و 'KS$_{11}$' حاصل نشد.

میانگین‌هایی که با حروف مختلف مشخص شده‌اند، اختلاف معنی‌داری با یکدیگر در سطح احتمال ۱٪ دارند (بر اساس آزمون دانکن)

Growth and shoot production failed in explants of cultivars 'KS$_6$', 'KS$_9$', 'KS$_{10}$' and 'KS$_{11}$'.

Means followed by different letters are significantly different at the 1% level (DMRT).

www.SID.ir

Archive of SID

علت برتری محیط کشت WPM را در میزان ریزنمونه‌هایی که تولید شاخساره نمودند نسبت به محیط MS کامل، شاید بتوان در غلظت پایین‌تر نمک‌های ماکرو و سوکروز این محیط نسبت به محیط کشت MS کامل جستجو نمود. این موضوع به این شکل قابل تفسیر است که هرچه غلظت نمک‌ها در محیط کشت کمتر باشد، به علت کاهش فشار اسمزی محیط کشت، امکان جذب آب و مواد غذایی بیشتری برای ریزنمونه فراهم و بدین ترتیب حفظ حالت شادابی ریزنمونه ممکن می‌شود و از این طریق به رشد آن‌ها کمک می‌کند.

۳ـ پرآوری شاخساره

نتایج تجزیه واریانس میزان پرآوری شاخساره در ارقام مختلف گلابی آسیایی نشان داد که این صفت به طور بسیار معنی‌داری تحت تأثیر رقم، محیط کشت، غلظت BAP، بلوک (تعداد زیرکشت) و نیز اثرات متقابل رقم با محیط کشت و رقم با غلظت BAP قرار گرفته است.

الف‌ـ اثر رقم بر میزان پرآوری شاخساره

مقایسه میزان پرآوری شاخساره در ارقام گلابی آسیایی، نشان از تفاوت ظرفیت پرآوری شاخساره‌ها در بین ارقام مختلف دارد (جدول ۲). وجود تفاوت‌هایی در ظرفیت شاخه‌زایی ریزنمونه‌های ارقام مختلف یک گونه، امری طبیعی محسوب می‌شود به طوری که این صفت تا حدود زیادی به ژنوتیپ گیاه وابسته است. پیشتر نیز نتایج مشابهی در ریزازدیادی چند رقم گلابی آسیایی گزارش شده است (Bhojwani *et al.*, 1984; Banno *et al.*, 1989).

جدول ۲ـ اثر رقم بر میزان پرآوری شاخساره

Table 2. Effect of cultivar on the shoot proliferation rate

		Cultivar رقم				
		'KS$_7$'	'KS$_8$'	'KS$_{12}$'	'KS$_{13}$'	'KS$_{14}$'
Shoot proliferation rate	میزان پرآوری شاخساره	1.24 b	1.57 a	1.46 a	1.14 b	1.21 b

میانگین‌هایی که با حروف مختلف مشخص شده‌اند، اختلاف معنی‌داری با یکدیگر در سطح احتمال ۱٪ دارند (بر اساس آزمون دانکن)

Means followed by different letters are significantly different at the 1% level (DMRT).

ب‌ـ اثر محیط کشت بر میزان پرآوری شاخساره

محیط‌های کشت مختلف بر میزان پرآوری شاخساره ارقام گلابی آسیایی، اثرات متفاوتی گذاشتند. (جدول ۳). در رقم 'KS$_7$'، بالاترین میزان پرآوری شاخساره در محیط کشت WPM به دست آمد اما تفاوت معنی‌داری بین سه محیط کشت پایه در میزان پرآوری شاخساره‌های دیگر ارقام (به جز شاخساره‌های

www.SID.ir

Archive of SID

رقم 'KS$_{14}$' که در محیط کشت WPM نسبت به محیط $\frac{1}{2}$MS پرآورتر شدند)مشاهده نشد.

علت برتری محیط کشت WPM در میزان پرآوری رقم 'KS$_7$' را شاید بتوان در غلظت پایین ازت این محیط و نیاز پایین رقم مذکور به عنصر ازت جستجو نمود. برتری محیط کشت WPM در احراز بالاترین میزان پرآوری شاخساره در گلابی گونه *Pyrus betulaefolia* (Banno *et al.*, 1988) و ارقام آسیایی 'Nijisseiki' و 'Osa-nijisseiki' (Banno *et al.*, 1989) قبلا نیز گزارش شده است.

جدول ۳ـ اثر محیط‌های کشت مختلف بر میزان پرآوری شاخساره پنج رقم گلابی آسیایی

Table 3. Effects of different culture media on the shoot proliferation rate of five Asian pear cultivars

محیط کشت Culture medium	میزان پرآوری شاخساره Shoot proliferation rate				
	'KS$_7$'	'KS$_8$'	'KS$_{12}$'	'KS$_{13}$'	'KS$_{14}$'
MS	1.11 cd	1.66 a	1.55 ab	1.14 cd	1.21 bcd
$\frac{1}{2}$MS	1.00 d	1.49 abc	1.46 abc	1.13 cd	1.00 d
WPM	1.62 a	1.57 ab	1.38 abcd	1.16 cd	1.40 abc

میانگین‌هایی که در هر ستون با حروف مختلف مشخص شده‌اند، اختلاف معنی‌داری با یکدیگر در سطح احتمال ۱٪ دارند (بر اساس آزمون دانکن)

Means followed by different letters in each column are significantly different at the 1% level (DMRT).

اثر محیط کشت بر میزان شیشه‌ای شدن شاخساره‌های پرآور شده (Vitrification)

محیط‌های کشت مورد آزمون، درصد شاخساره‌های تولیدی شیشه‌ای شده را تحت تأثیر خود قرار دادند به طوری که بیشترین درصد شیشه‌ای شدن شاخساره‌های پرآور شده، ابتدا در محیط کشت WPM و سپس در محیط کشت $\frac{1}{2}$MS یافت شد و کمترین میزان آن در محیط کشت MS کامل مشاهده شد. پیشتر هنگامی که از محیط کشت WPM برای پرآوری شاخساره‌های انگور موسکادین استفاده شده بود، علائم شیشه‌ای شدن در بسیاری از شاخساره‌های پرآور شده گزارش شد و این شاخساره‌ها به هنگام زیر کشت از شکنندگی برگ‌ها صدمه می‌دیدند. (Gray and Benton, 1991).

به نظر می‌رسد شیشه‌ای شدن درصد قابل توجهی از شاخساره‌ها در محیط‌های کشت WPM و $\frac{1}{2}$MS رابایستی به میزان بالاتر پتانسیل آب این دو محیط که از غلظت کمتر عناصر تشکیل‌دهنده آن‌ها ناشی می‌شود، نسبت داد. به طوری که در غلظت یکسان آگار، دو

www.SID.ir

Archive of SID

محیط مذکور آب بیشتری را نسبت به محیط کشت MS کامل در اختیار شاخساره‌های ظریف پرآور شده قرار می‌دهند و جذب بیش از حد آب باعث شیشه‌ای شدن آنها می‌شود. بنابراین قابل پیش‌بینی است که با افزایش غلظت آگار، که از طریق تقلیل پتانسیل ماتریک (Matric Potential) منجر به کاهش پتانسیل آب محیط کشت می‌شود وقوع این عارضه کاهش یابد. در همین خصوص پیشنهاد می‌شود در پژوهش‌های بعدی، افزودن ۱۰g سوکروز به ترکیب محیط کشت WPM برای مقابله با شیشه‌ای شدن شاخساره‌ها در این محیط مورد آزمون قرار گیرد.

ج- اثر غلظت BAP بر میزان پرآوری شاخساره

غلظت‌های مختلف BAP، میزان پرآوری شاخساره را به طور بسیار معنی‌داری تحت تأثیر خود قرار دادند (جدول ٤). در بین سه غلظت BAP مورد آزمون (صفر، ۱ و ۲ میلی‌گرم در لیتر)، غلظت ۲ mg l^{-1} BAP دارای بالاترین میزان پرآوری شاخساره در همه ارقام بود و پس از آن، بیشترین شاخه‌زایی در غلظت ۱ mg l^{-1} BAP حاصل شد. در محیط‌های کشت فاقد BAP، میزان پرآوری شاخساره در حد صفر باقی ماند. نتیجه مشابهی قبلا در گلابی رقم 'Bradford' گزارش شده بود (Stimart and Harbage, 1989). همچنین پرآوری شاخساره‌های رقم 'Hosui' در غلظت صفر بنزیل آدنین (BA) در حد صفر بود و میزان پرآوری آن، رابطه مستقیمی با غلظت BA داشت (Hirabayashi *et al.*, 1987) و در غیاب سایتوکینین، هیچ نوع شاخه‌زایی در گونه *Pyrus calleryana* Dcn. گزارش نشد. (Berardi *et al.*, 1993).

افزایش میزان پرآوری شاخساره به ازای هر واحد افزایش در غلظت BAP را می‌توان از طریق نقش سایتوکینین‌ها در تحریک تقسیم سلولی و رشد جوانه‌های جانبی تفسیر کرد. همچنین پرآوری شاخساره‌ها روی محیط کشت غنی از سایتوکینین، اغلب نتیجه آزاد شدن جوانه‌های جانبی از تأثیر غالبیت جوانه انتهایی است (Taji *et al.*, 1997)

جدول ٤- اثر غلظت‌های مختلف BAP بر میزان پرآوری شاخساره پنج رقم گلابی آسیایی

Table 4. Effect of different concentrations of BAP on the shoot proliferation rate of Asian pear cultivars

غلظت BAP BAP concentration	میزان پرآوری شاخساره Shoot proliferation rate				
	'KS$_7$'	'KS$_8$'	'KS$_{12}$'	'KS$_{13}$'	'KS$_{14}$'
1 mg l^{-1}	1.61 cd	2.07 b	1.90 bc	1.46 d	1.60 cd
2 mg l^{-1}	2.07 b	2.58 a	2.45 a	1.92 bc	1.95 b

میانگین‌هایی که در هر ستون با حروف مختلف مشخص شده‌اند، اختلاف معنی‌داری با یکدیگر در سطح احتمال ۱٪ دارند (بر اساس آزمون دانکن).

Means followed by different letters in each column are significantly different at the 1% level (DMRT).

www.SID.ir

Archive of SID

ـ اثر غلظت BAP بر طول شاخساره‌های پرآور شده

غلظت‌های مختلف BAP، طول شاخساره‌های پرآور شده را تحت تأثیر خود قرار دادند (جدول ۵). بدین معنی که با افزایش غلظت BAP در محیط کشت، با وجود افزایش میزان پرآوری، از طول شاخساره‌های پرآور شده کاسته شد. به عبارت دیگر، تعداد و طول شاخساره‌های پرآور شده با هم نسبت عکس داشتند. نتیجه مشابهی در ریزازدیادی گونه *Pyrus syrica* پیشتر گزارش شده بود (Shibli *et al.*, 1997). همچنین غلظت‌های بالای سایتوکینین از طول میان‌گره‌های شاخساره‌های پرآور شده گونه *Pyrus calleryana* Dcn. نیز کاسته بود (Berardi *et al.*, 1993) و افزایش غلظت سایتوکینین، باعث کاهش طول شاخساره‌ها در جنس Pyrus شده بود (Dolcet-Sanjuan *et al.*, 1990).

به نظر می‌رسد کاهش طول شاخساره‌ها به ازای هر واحد افزایش در غلظت BAP را بایستی در محدوده بودن ظرفیت غذاسازی گیاهچه‌های درون‌شیشه‌ای جستجو کرد به طوری که با افزایش تعداد شاخساره‌های پرآور شده، مقدار ماده غذایی که به هر شاخساره می‌رسد، کاهش می‌یابد.

جدول ۵ـ اثر غلظت‌های مختلف BAP بر طول شاخساره‌های پرآور شده پنج رقم گلابی آسیایی

Table 5. Effect of different concentrations of BAP on the proliferated shoots of five Asian pear cultivars

غلظت BAP[z] BAP concentration	توزیع فراوانی طول شاخساره‌ها در غلظت‌های مختلف BAP (٪) Frequency distribution for shoots length in different BAP conc. (%)		
	5-7 mm	7-10 mm	> 10 mm
1 mg l^{-1}	19	60	21
2 mg l^{-1}	73	22	5

z: در غلظت صفر BAP، هیچ شاخساره‌ای پرآور نشد.

z: No proliferation at 0 mg l^{-1} BAP.

ـ اثر غلظت BAP بر میزان شیشه‌ای شدن شاخساره‌های پرآور شده

غلظت‌های مختلف BAP نیز درصد شیشه‌ای شدن شاخساره‌های پرآور شده را تحت تأثیر خود قرار دادند. به طوری که به موازات افزایش غلظت BAP، به درصد شاخساره‌های تولیدی شیشه‌ای شده افزوده شد و این عارضه فیزیولوژیکی در بالاترین غلظت BAP ($2mgl^{-1}$)، به حداکثر میزان خود در حدود ۳۳٪ رسید.

www.SID.ir

Archive of SID

پیشتر نیز گزارش شده بود که افزایش غلظت BAP، به تعداد شاخساره‌های شیشه‌ای شده می‌افزاید. (Berardi *et al.*, 1993؛ Rossi *et al.*, 1991).

علت این پدیده را به اثر سایتوکینین‌ها که یکی از عوامل همراهی کننده عارضه شیشه‌ای شدن محسوب می‌شود، نسبت می‌دهند (Pierik, 1997) به نظر می‌رسد شیشه‌ای شدن شاخساره‌های پرآور شده در غلظت‌های بالای سایتوکینین، با تشدید سرعت رشد جوانه‌های جانبی و در نتیجه تولید بیشتر پارانشیم حفره‌ای نسبت به نردبانی در برگ‌ها مرتبط باشد که متعاقبا امکان جذب آب بیشتری را برای شاخساره فراهم می‌کند.

د- اثر تعداد زیرکشت بر میزان پرآوری شاخساره

میزان پرآوری شاخساره‌های ارقام گلابی آسیایی، تحت تأثیر تعداد زیرکشت قرار گرفت (جدول ٦). بدین معنی که با افزایش تعداد زیرکشت، به میزان پرآوری شاخساره نیز افزوده شد. پیشتر نیز گزارش شده بود که در کشت نوک شاخساره‌های (Shoot-tip) گلابی آسیایی، تغییرات سازشی قبل از آغاز پرآوری سریع شاخساره بایستی به وقوع می‌پیوست که مستلزم صرف مدت زمان مشخصی بود و تا آن زمان، تکثیر از آهنگ رو به افزایش نسبتا آرامی برخوردار بود (Bhojwani *et al.*, 1984). در مقابل، میزان پرآوری شاخساره در گونه *P. calleryana* Den. تحت تأثیر تعداد زیر کشت قرار نگرفت (Berardi *et al*, 1993).

چنین نتیجه‌ای را می‌توان به اثر زیرکشت بر پدیده بازجوان شدن (Rejuvenation) بافت شاخساره‌ها، که باعث افزایش قدرت باززایی و در نتیجه افزایش میزان پرآوری شاخساره‌ها در پاسخ به تیمارهای هورمونی می‌شود نسبت داد. بدیهی است افزایش میزان پرآوری شاخساره به موازات افزایش تعداد زیرکشت، تا حد معینی که به ظرفیت ژنتیکی پرآوری شاخساره در ازای تیمار هورمونی و محیط کشت به کار رفته بستگی دارد، ادامه می‌یابد و پس از آن به یک ثبات نسبی می‌رسد.

جدول ٦- اثر تعداد زیرکشت بر میزان پرآوری شاخساره پنج رقم گلابی آسیایی

Table 6. Effect of subculture number on the shoot proliferation rate of five Asian pear cultivars

میزان پرآوری شاخساره Shoot proliferation rate	تعداد زیرکشت Subculture No.			
	4	5	6	7
	0.94 c	1.28 b	1.42 b	1.66 a

میانگین‌هایی که با حروف مختلف مشخص شده‌اند، اختلاف معنی‌داری با یکدیگر در سطح احتمال ١٪ دارند (بر اساس آزمون دانکن)

Means followed by different letters are significantly different at the 1% level (DMRT).

www.SID.ir

Archive of SID

٤ـ ریشه‌زایی شاخساره‌ها

علی‌رغم اعمال تیمارهای مختلف ریشه‌زایی روی شاخساره‌های پرآور شده حاصل از زیر کشت هفتم، پس از دو ماه هیچ‌گونه ریشه‌ای در شاخساره‌های هیچ یک از ارقام تولید نشد هر چند که در تعداد معدودی از شاخساره‌ها، سرآغازه‌های ریشه (Root primordia) تشکیل شده بود. این نتیجه برخلاف گزارشی بود که ریشه‌زایی شاخساره‌های ارقامی از گلابی آسیایی را در هفتمین زیرکشت امکان‌پذیر گزارش کرده بود (Banno *et al.*, 1989). عدم ریشه‌زایی موفق شاخساره‌ها در ارقام گلابی آسیایی (Reed, 1995؛ Bhojwani *et al.*, 1984) و رقم 'Bradford' (Stimart and Harbage, 1989) پیشتر نیز گزارش شده بود.

در بسیاری از جنس‌های گیاهی، ریشه‌زایی شاخساره‌های ریزازدیاد شده می‌تواند با حذف سایتوکینین‌ها از ترکیب محیط کشت صورت گیرد. در گلابی و دیگر گونه‌های چوبی، بیشتر از این که این ره‌یافت مؤثر واقع شود، تیمار با اکسین‌ها موفقیت‌آمیز بوده است (Dolcet-Sanjuan et al., 1990) و در بین اکسین‌ها، IBA همواره یک تیمار مؤثر برای ریشه‌زایی شاخساره‌های درون شیشه‌ای گزارش شده است (Dolcet-Sanjuan *et al.*, 1990). به علت تنوع پاسخ ریشه‌زایی در ارقام و گونه‌های جنس Pyrus پیش‌بینی این مورد که کدام ژنوتیپ با کدام تیمار ریشه می‌دهد مشکل است. همچنین در بسیاری از گونه‌های خانواده رزاسه (Rosaceae)، ریشه‌زایی وابسته به ژنوتیپ گیاه است (Reed, 1995). بنابراین، به نظر می‌رسد توسعه پروتکل مناسبی برای ریشه‌زایی ارقام گلابی آسیایی، مستلزم انجام آزمون‌های بیشتری در این زمینه است.

سپاسگزاری

مواد گیاهی مورد استفاده در این پژوهش از طرح ملی به شماره ٤٢٢٥ تحت عنوان «مطالعه سازگاری چند رقم گلابی آسیائی با شرایط آب و هوائی ایران، مرحله ۱ وارد کردن ژرم‌پلاسم و تکثیر» که در دانشگاه تربیت مدرس در حال اجراست تأمین شده است که بدینوسیله تشکر می‌گردد. هم‌چنین از مدیران محترم گروه‌های باغبانی و اصلاح نباتات دانشگاه تربیت مدرس که زمینه انجام تحقیق حاضر را فراهم نمودند، تشکر و قدردانی می‌شود.

منابع مورد استفاده

References

ارزانی، ک. ۱۳۷۹. وارد نمودن مطالعات ازدیادی و قرنطینه‌ای بر روی برخی از ارقام گلابی آسیایی (*Pyrus serotina*) در ایران، چکیده مقالات دومین کنگره علوم باغبانی ایران، نشر آموزش کشاورزی، صفحه ٤٥.

www.SID.ir

Archive of SID

خوشخوی، م.، شیبانی، ب.، روحانی، ا.و.، تفضلی، ع. ۱۳۷۳. اصول باغبانی. چاپ دوم. انتشارات دانشگاه شیراز. ٥٦٦ صفحه.

Al-Maarri, K., Arnaud, Y., and Miginiac, E. 1994. Micropropagation of *Pyrus communis* cultivar 'Passe Crassane' seedlings and cultivar 'Williams': factors affecting root formation in vitro and ex vitro. Scientia Horticulturae 58: 207-214.

Arzani, K. 2000. Study on the adaptation of some Asian pear cultivars (*Pyrus serotina*) in Iran. Abstracts of VIII Inrternational Symposium on Pear. 4-9 September, Bologna, Itanly, P.79.

Arzani, K. 2002a. The position of pear breeding and culture in Iran: Introduction of some Asian pear (*Pyrus serotina* Rehd.) cultivars. Acta Horticulturae 587: 167-173.

Arzani, K. 2002b. Introduction of some Asian pear cultivars (*Pyrus pyrifolia*) in Iran. Acta Horticulturae 596: 287-290.

Banno, K., Hayashi, S., Tanabe, K., and Tokuzumi, A. 1988. In vitro propagation of Japanese pear rootstocks. Plant Tissue Culture Letters 5: 87-89.

Banno, K., Yoshida, K., Hayashi, S., and Tanabe, K. 1989. In vitro propagation of Japanese pear cultivars. Journal of the Japanese Society for Horticultural Science 58: 37-42.

Berardi, G., Infante, R., and Neri, D. 1993. Micropropagation of Pyrus calleryana Dcn. From seedlings, Scientia Horticulturae 53: 157-165.

Bhojwani, S.S., Mullins, K., and Cohen, D. 1984. In vitro propagation of Pyrus pyrifolia. Scientia Horticulturae 23: 247-254.

Dolcet-Sanjuan, R., Mok, D.W.S., and Mok, M.C. 1990. Micropropagation of Pyrus and Cydonia and their responces to Fe-limiting conditions. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 21: 191-199.

Fadl, M.S., and Hartmann, T. 1967. Isolation, purification and characterization of an endogenous rootpromoting factor obtained from the basal sections of pear hardwood cutting. Plant physiology 42: 541-549.

Gray, D.J., and Benton, C.M. 1991. In vitro propagation and plant establishment of Muscadine grape cultivars (Vitis rotundifolia). Plant Cell, Tissue and Organ Culture 27: 7-14.

www.SID.ir

Archive of SID

Hartmann, H.T., Kester, D.E., and Davies, F.T. 1990. Plant propagation: Principles and Practices. 5th edn. Prentice-Hall International, Inc., USA.

Hirabayashi, T., Moriguchi, T., Kozaki, I., Yamamoto, Y., and Matsuzaki, S. 1987. In vitro propagation of Pyrus shoot tips. Bulletin of the Fruit Tree Research Station A 14: 9-16.

Lloyd, G.B., and McCown, B.H. 1980. Commercially feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot tip culture. Proceedings of the International Plant Propagators' Society 30: 421-427.

Murashige, T., and Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiologia Plantarum 15: 473-497.

Pierik, R.L.M. 1997. In vitro Culture of Higher Plants. Kluwer Academic Publishers, The Netherlands, 479p.

Reed, B.M. 1995. Screening Pyrus germplasm for in vitro rooting response. HortScience 30: 1292-1294.

Rossi, V., De Paoli, G., and Dal Pozzo, P. 1991. Propagation of *Pyrus calleryana* Sel. D6 by in vitro culture. Acta Horticulturae 300: 145-148.

Sansavini, S. 1994. Performance of micropropagated pear trees. Acta Horticulturae 367: 260-266.

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.

Stimart, D.P., and Harbage, J.F. 1989. In vitro shoot proliferation of *Pyrus calleryana* from vegetative buds. HortScience 24: 298-299.

Taji, A.M., Dodd, W.A. and Williams, R.R. 1997. Plant Tissue Culture Practice. Third edn. UNE Press, Australia, 171p.

Yeo, D.Y., and Reed, B.M. 1995. Micropropagation of three Pyrus rootstocks. HortScience 30: 620-623.

آدرس نگارندگان:

محمودرضا روزبان و کاظم ارزانی- گروه باغبانی، دانشکده کشاورزی دانشگاه تربیت مدرس، صندوق پستی ۴۸۳۸-۱۴۱۵۵، تهران.

احمد معینی- گروه اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی دانشگاه تربیت مدرس، صندوق پستی ۴۸۳۸-۱۴۱۵۵، تهران.

www.SID.ir