مجله به‌نژادی نهال و بذر
جلد ۱-۳۱، شماره ۲، سال ۱۳۹۴

تاثیر محیط‌های رشد و منبع آهن در ریزازدیادی و ریشه‌زایی پایه‌های نیمه پاکوتاه‌کننده گلابی پیرودوارف و OH×F87

Effects of Growth Media and Fe Source on Micropropagation and Rooting of Semi-Dwarf Pear Rootstocks, Pyrodwarf and OH×F87

نفیسه نورمحمدی[۱]، حمید عبداللهی[۲]، آزاده معینی[۳] و اسماعیل روح‌الامین[۴]

۱، ۳ و ۴- کارشناس، پژوهشکده بیوتکنولوژی منطقه مرکزی، نجف‌آباد، اصفهان
۲- دانشیار، موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر، کرج

تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۴/۵ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۳/۱۰/۱۸

چکیده

نورمحمدی، ن.، عبداللهی، ح.، معینی، آ.، و روح‌الامین، ا. ۱۳۹۴. تاثیر محیط‌های رشد و منبع آهن در ریزازدیادی و ریشه‌زایی پایه‌های نیمه پاکوتاه‌کننده گلابی پیرودوارف و OH×F87. **مجله به‌نژادی نهال و بذر ۱-۳۱:** ۲۷۸ - ۲۶۵.

این تحقیق با هدف بهینه کردن شرایط ازدیاد درون شیشه‌ای دو پایه نیمه پا کوتاه‌کننده گلابی پیرودوراف (Pyrodwarf) و OH×F87 و بررسی اثر محیط‌های کشت و منبع آهن و روش ریشه‌زائی این پایه‌ها انجام شد. ارزیابی اثر پنج نوع محیط پایه شامل MS، MS تغییریافته، DKW، QL و QL تغییریافته، با نسبت‌های مختلف یون‌های نیترات به آمونیوم، کلسیم و کلر روی صفات رویشی میزان پرآوری به ازاء ریزنمونه، طول شاخه‌چه، شاخص توسعه سطح برگ و میزان نکروز انجام و بیش‌ترین میزان پرآوری برای پایه پیرودوارف ۳/۳ شاخه‌چه در محیط QL تغییر یافته و برای پایه OH×F87 ۵/۳ شاخه‌چه، در محیط QL مشاهده شد. مقایسه میزان نسبت یون‌های آمونیوم به نیترات (۱:۲ تا ۱:۳) و همچنین جایگزینی نمک کلرور کلسیم با نیترات کلسیم در محیط‌های QL و QL تغییر یافته حاکی از حساسیت پایه‌های گلابی به حضور غلظت‌های بالای آمونیوم و یون کلر در محیط بود،که به صورت کاهش نسبی میزان پرآوری تظاهر یافت. در آزمایش دوم اثر دو منبع آهن Fe-EDTA و Fe-EDDHA بررسی و نتایج بیانگر برتری منبع آهن Fe-EDDHA در کاهش نسبی میزان پرآوری و افزایش کیفیت و رشد طولی ریزشاخه‌های تولیدی هر دو پایه بود. در آزمایش ریشه‌زایی، از دو نوع محیط کشت پایه MS و QL با سه غلظت صفر (شاهد)، ۰/۵ و ۱ میلی‌گرم در لیتر تنظیم کننده رشد IBA استفاده شد. نتایج بیانگر ریشه‌زائی کامل در تمامی شاخه‌چه‌هابود، 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.

واژه‌های کلیدی: *Pyrus communis* L.، ریزازدیادی، پرآوری، ریشه‌زایی، پایه، آهن.

نویسنده مسئول: hamidabdollahi@spii.ir تلفن: ۰۲۶۳۶۷۰۲۵۴۱

مقدمه

گلابی پس از سیب مهم‌ترین میوه دانه‌دار محسوب می‌شود، لیکن برخلاف سیب، پایه‌های پاکوتاه‌کننده یا نیمه‌پاکوتاه‌کننده زیادی برای این درخت به صورت تجاری معرفی نشده است. پایه‌های مورد استفاده به منظور احداث باغ‌های گلابی همانند دیگر درختان میوه معتدله، به دو گروه پایه‌های بذری و رویشی طبقه‌بندی می‌شوند (Abdollahi, 2011). پایه‌های بذری گلابی به گونه‌های مختلفی از جنس Pyrus، نظیر گونه‌های *P. communis*، *P. betulifolia*، *P. calleryana* و *P. ussuriensis* تعلق دارند (Westwood, 1993). این پایه‌ها همگی سبب ایجاد درختان گلابی پابلند تا بسیار پابلند می‌شوند. علاوه بر این، شماری از دیگر گونه‌های متعلق به این جنس نظیر گونه *P. syriaca* به صورت محدود در کشورهای مختلف به عنوان پایه بذری مورد استفاده قرار می‌گیرند، که کارآئی تجاری آن‌ها مورد اثبات قرار نگرفته است. پیوند ارقام گلابی روی پایه‌های بذری ولیک (*Crategus* sp.) سبب پاکوتاهی شدید درخت می‌شود (Abdollahi *et al*., 2012). پایه‌های رویشی یا پایه‌های هم‌گروه گلابی به دو جنس Pyrus و Cydonia تعلق دارند. اولین گزینش‌های انجام شده در زمینه پایه‌های هم‌گروه گلابی متعلق به گونه به (*C. oblonga* Mill.) در فرانسه انجام شد، لیکن به دلیل تداخل آن‌ها در نهالستان‌های این کشور، آر. جی. هاتون (R. G. Hatton) و همکارانش در ایستگاه تحقیقاتی ایست مالینگ (East Malling) در سال ۱۹۱۴، این پایه‌ها را به پنج گروه اصلی شامل گروه‌های A، B، C، D و E طبقه‌بندی کردند. از بین این پایه‌ها، تنها سه پایه کوئینس A، B و C با ظرفیت کاربرد تجاری تشخیص داده شد. در حال حاضر این سه پایه، همراه با سه پایه رویشی دیگر شامل کوئینس BA29، آدامز (Adams) و سیدو (Sydo) مهم‌ترین پایه‌های هم‌گروه گلابی متعلق به گونه به را در بر می‌گیرند (Abdollahi, 2011).

پایه‌های هم‌گروه گلابی که به جنس Pyrus تعلق دارند دربردارنده چهار گروه پایه‌های رویشی ایالات متحده آمریکا (سری پایه‌های (OH×F)، پایه‌های رویشی آفریقای جنوبی (سری پایه‌های BP)، پایه‌های رویشی آلمان (سری پایه‌های BU) و پایه‌های رویشی ایتالیا (سری پایه‌های Fox) هستند (Campbell, 2002). مهم‌ترین پایه‌های هم‌گروه گلابی متعلق به این جنس، عمدتاً از برنامه به‌نژادی پایه در ایالات متحده آمریکا منشاء گرفته‌اند و پایه‌های این سری تحت نام دورگ‌های الدهم × فارمینگدال (OH × F) نامگذاری شده‌اند. این سری طیف گسترده‌ای از پایه را با قدرت رشد متفاوت و سازگاری با شرایط اقلیمی و خاکی گوناگون در بر می‌گیرد. تاکنون بیش از چهل عدد پایه از این سری معرفی شده‌اند که از این بین پایه‌های

OH×F40، OH×F69، OH×F87 و OH×F333 بیش از سایرین مورد توجه قرار گرفته‌اند (Campbell, 2002).

از بین پایه‌های هم‌گروه آلمان تنها پایه BU5-18 به صورت تجاری و انبوه مورد توجه بوده، که با نام تجارتی پیرودوارف (Pyrodwarf) و نام حق انحصاری رنوس-۱ (Rhenus 1) معرفی و ثبت شده است. این پایه از دورگ‌گیری بین رقم الدهم به عنوان والد مقاوم به بیماری آتشک و رقم لوئیزبون (Louise Bonne)، که در کشور ما به اشتباه با نام گلابی بیروتی تکثیر می‌شود، به عنوان والد دهنده صفت سهل ریشه‌زایی تولید شده است (Jacob, 1998). این پایه دارای مقاومت متوسط نسبت به آتشک بوده و سبب زودباردهی رقم می‌شود. از ویژگی‌های دیگر این پایه، راندمان بالا، اندازه میوه یکسان، استقرار مطلوب، سازگاری با سرماهای شدید، عدم تمایل به تولید پاجوش، عدم حساسیت به کلروز ناشی از کمبود آهن است و در خاک‌های قلیایی قابل کشت و گسترش است (Campbell, 2002؛ Jacob, 1998). هیچ‌یک از پایه‌های هم‌گروه گلابی آفریقای جنوبی و ایتالیا تاکنون به صورت انبوه مورد توجه قرار نگرفته است.

پایه‌های هم‌گروه گلابی به روش‌های مختلفی قابل تکثیر است، لیکن به طور معمول ریشه‌زایی پایه‌های هم‌گروهی که متعلق به جنس Pyrus هستند از طریق قلمه چوب نرم و سخت و حتی خوابانیدن با مشکلاتی همراه است (Hartman *et al*., 1997). با توجه به این مشکل، استفاده از روش کشت بافت به عنوان روشی معمول و اقتصادی برای ازدیاد این پایه‌ها مورد استفاده قرار گرفته است. در مطالعه‌ای به منظور ازدیاد درون شیشه‌ای پایه پابلند *P. calleryana* بهترین میزان پرآوری شاخساره در محیط کشت MS (Murashige and Skoog, 1962) حاوی ۱ میلی‌گرم در لیتر BAP گزارش شده است (Rossi *et al*., 1991). نصرتی و همکاران (Nosrati *et al*., 2003) محیط MS را در مقایسه با محیط QL (Quoirin and Lepoivre, 1977) به منظور ریز ازدیادی و توسعه ارقام گلابی ایرانی مناسب‌تر گزارش کردند. این در حالی است که در شمار دیگری از مطالعات انجام شده، محیط QL و QL تغییر یافته (Leblay *et al*., 1991) نسبت به محیط MS واجد برتری معرفی شده است (Abdollahi *et al*., 2005؛ DePaoli *et al*., 1994). به نظر می‌رسد در بین ترکیبات موثر در محیط‌های مورد استفاده، نسبت نمک‌های آمونیوم و نیترات نقش تعیین‌کننده‌ای در عکس‌العمل ارقام گلابی برعهده داشته باشد، چنانچه این تفاوت در باززائی این گونه نیز مهم و کلیدی گزارش شده است. در آزمایشی روی اثر محیط‌های کشت مختلف و نسبت یون‌های تشکیل‌دهنده نیتروژن بر میزان باززایی شاخساره‌ای نابجا از ریز نمونه‌های برگی ارقام گلابی، بهترین میزان

باززایی مربوط به محیط حاوی نسبت‌های حدود ۱:۳ تا ۱:۲ از یون‌های NH_4^+/No_3 حاصل شد (Abu-Qaoud *et al.*, 1991). علاوه بر این، غلظت سیتوکینین BA (Pasqual *et al.*, 2002)؛ نوع و غلظت آهن (Sotiropoulos *et al.*, 2013) و همچنین نمک‌های حاوی کلسیم، پتاسیم و منیزیوم (Wada *et al.*, 2013) از دیگر عوامل موثر در ریزازدیادی پایه‌های گلابی گزارش شده است.

با توجه به ورود پایه‌های جدید گلابی از جمله پایه پیرودوارف و شماری از پایه‌های سری OH×F و Fox به ایران در سال‌های اخیر، شماری از این پایه‌ها طی ارزیابی‌های سازگاری اولیه، بیش از سایرین مورد توجه قرار گرفته‌اند. در این بررسی‌های مقدماتی، پایه پیرودوارف دارای رفتار تکثیری نسبتاً ساده‌تری در محیط درون شیشه بوده و قدرت سازگاری مطلوبی از نظر ریشه‌دهی و استقرار در خاک از خود نشان داده است. با توجه به دشواری نسبی تکثیر این پایه‌ها با استفاده از روش‌های معمول تکثیر در نهالستان شامل قلمه و خوابانیدن، این تحقیق به منظور بهینه‌سازی شرایط تکثیر درون شیشه و ارائه یک دستورالعمل تولید نیمه انبوه تا انبوه دو پایه پیرودوارف و OH×F87 برنامه‌ریزی و انجام شد.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی مورد استفاده شامل دو پایه نیمه‌پاکوتاه کننده پیرودوارف (Rhenus 1®) و OH×F87 (Daytor®) بود. به منظور بررسی شرایط بهینه تکثیر درون شیشه این پایه‌ها، سه آزمایش مجزا انجام و به ترتیب اثر محیط‌های کشت، منبع تامین آهن و شرایط ریشه‌زائی روی پایه‌های گلابی مورد نظر مورد بررسی قرار گرفت. به منظور بررسی کارآئی استفاده از پروتکل نهائی به صورت نیمه انبوه، کلیه آزمایش‌ها در راستای تکثیر، سازگاری و ارائه حداقل ۲۵۰۰ اصله پایه از هر نوع طرح‌ریزی شد.

ارزیابی اثر محیط‌های کشت پایه

در این آزمایش اثر پنج نوع محیط کشت MS، MS تغییریافته (Al–Maarri *et al.*, 1994)، DKW (Driver and Kuniyuki, 1984)، QL و QL تغییر یافته (Leblay *et al.*, 1991) روی رشد و پرآوری پایه‌های گلابی مورد بررسی قرار گرفت. دو محیط کشت دیگر شامل QL تغییر یافته و محیط کشت MS تغییریافته بودند. کلیه محیط‌های مورد استفاده با ۱ میلی‌گرم بر لیتر سایتوکینین BAP و ۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر NAA همراه با ۳ درصد ساکاروز، ۵/۵ گرم بر لیتر آگار (Merck, Germany) و ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر میواینوزیتول غنی شده (Khodaee Chegenee *et al.*, 2011) و pH کلیه محیط‌ها قبل از افزودن آگار روی ۵/۷ تنظیم شده بود. هر شیشه کشت با حجم ۲۰۰ میلی‌لیتری، حاوی ۳۰ تا ۳۵ میلی‌لیتر محیط

کشت بود که به مدت ۲۰ دقیقه در فشار ۱/۲ اتمسفر و دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد استریل شدند.

مواد گیاهی مورد آزمایش در شرایط دوره نوری ۱۶ ساعت نور، ایجاد شده توسط لامپ‌های فلئورسنت سفید با شدت نور ۴۰ میکرو مول بر مترمربع بر ثانیه و دمای شبانه‌روزی ۱ ± ۲۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. زیرکشت‌ها در فواصل ۴۵ روز یک بار و قبل از ورود شاخه‌چه‌ها به مرحله پیری و زوال انجام شد. شاخص‌های مورد نظر در این آزمایش شامل، میزان پرآوری به ازاء ریزنمونه، طول شاخه‌چه، شاخص توسعه سطح برگ و میزان نکروز بخش‌های مریستمی بودند.

ارزیابی نوع منبع آهن

به منظور افزایش میزان پرآوری و کسب شرایط مطلوب‌تر جهت تکثیر ساقه‌چه‌های درون شیشه پایه‌های گلابی انجام شد. به این منظور دو منبع آهن Fe-EDTA و Fe-EDDHA (Dolcet-Sanjuan *et al*., 1990) مورد استفاده و مقایسه قرار گرفت. محیط کشت انتخابی QL تغییر یافته بود. همچنین سایر اجزاء تشکیل‌دهنده محیط غیر از منبع آهن همانند آزمایش اول بود. شاخص‌های مورد نظر در این آزمایش شامل دو صفت میزان پرآوری به ازاء ریزنمونه و طول شاخه‌چه‌ها در زمان‌های مختلف بود و با توجه به عدم مشاهده نکروز در آزمایش قبلی، این شاخص در این‌جا مد نظر واقع نشد.

ارزیابی توان ریشه‌زایی

شاخه‌چه های ریزازدیادی شده روی محیط QL تغییر یافته همراه با منبع تامین آهن انتخاب شده در آزمایش دوم، به عنوان نمونه جهت آزمون ریشه‌زایی مورد استفاده قرار گرفتند. به این منظور شاخه‌چه‌های دوپایه گلابی به طول متوسط ۳ سانتی‌متر انتخاب و در تیمارهای آزمایشی شامل دو نوع محیط کشت پایه MS و QL با دو غلظت صفر (شاهد)، ۰/۵ و ۱ میلی‌گرم در لیتر تنظیم کننده رشد IBA مورد زیر کشت قرار گرفتند. هر دو نوع محیط ریشه‌زایی استفاده شده حاوی نمک‌های QL وMS با ۳۰ گرم بر لیتر ساکاروز و ۵/۵ گرم آگار بودند. اسیدیته کلیه محیط‌ها قبل از افزودن آگار در حد ۵/۵ تنظیم شد. کلیه شاخه چه های مورد استفاده برای ریشه‌زائی به مدت چهار هفته در محیط حاوی تنظیم‌کننده‌های رشد قرار گرفته و سپس بعد از گذشت این مدت، همزمان با آغازش کالوس‌های تازه و سفید رنگ در انتهای آن‌ها، به محیط عاری از تنظیم کننده‌های رشد منتقل شدند. شاخص‌های مورد نظر شامل تعداد ریشه به ازاء ریزشاخه و میانگین طول ریشه‌چه‌های هر ریزشاخه در محیط‌های مختلف بود.

طرح آزمایشی مورد نظر در کلیه بررسی‌ها به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با عامل اول پایه‌های گلابی در دو سطح و فاکتور دوم تیمارهای مختلف در نظر

گرفته شد. آزمایش اول در پنج تکرار و حداقل پنج شاخه‌چه در هر شیشه انجام شد، ولی به منظور دستیابی به تعداد شاخه چه مورد نظر در تکثیر نیمه‌انبوه، در آزمایش‌های بعدی تعداد تکرارها افزایش یافت. در آزمایش اول یادداشت برداری‌ها در هفته چهارم بعد از زیرکشت و در آزمایش دوم در سه دوره زمانی هفته چهارم، ششم و هشتم پس از زیرکشت انجام شد. در آزمون تیمارهای ریشه‌زائی یادداشت برداری‌ها بر اساس شروع آغازش و رشد ریشه‌ها پس از گذشت چهار و شش هفته پس از انتقال به محیط حاوی IBA انجام شد. تجزیه‌های آماری با استفاده نرم‌افزار SAS به اجرا درآمد.

به منظور بررسی موفقیت در استقرار مواد گیاهی در محیط خارج شیشه، شاخه‌چه‌های گیاهی ریشه‌دار شده حداقل به تعداد ۲۵۰۰ عدداز هر پایه، به محیط‌های خاکی حاوی نسبت‌های مساوی کوکوپیت و پرلیت منتقل و در شرایط گلخانه سازگاری با رطوبت بالای ۹۰ درصد و دمای متوسط ۲۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. گیاهچه‌های تولیدی تا آغاز رشد اولیه در زیر لیوان‌های پلاستیکی شفاف نگهداری و پس از آن در شرایط معمولی گلخانه سازگاری نگهداری شدند.

نتایج و بحث

نتایج حاصل از بررسی نشان داد که دو پایه گلابی پیرودوارف و OH×F87 در شرایط محیط کشت درون شیشه‌ای از نظر میزان رشد و شادابی تفاوت قابل توجهی داشتند. به طور کلی واکنش پایه پیرودوارف در اغلب شرایط همراه با تولید شاخه‌چه‌ها و برگ‌های توسعه یافته‌تر و شاداب‌تر در مقایسه با پایه OH×F87 بود. به نظر می‌رسد این رفتار پایه پیرودوارف با خصوصیات عمومی آن شامل بر استقرار مطلوب در خاک و عدم حساسیت زیاد به تنش‌های محیطی، پیوسته است (Jacob, 1998).

نقش محیط کشت پایه در پرآوری شاخه

نتایج حاصل از بررسی صفات در ریزنمونه‌هایی که چهار هفته از کشت آن‌ها در پنج نوع محیط پایه شامل MS، MS تغییریافته، DKW، QL و QL تغییریافته گذشته بود، حاکی از تفاوت معنی‌دار در مقایسات میانگین صفات میزان‌پرآوری، طول شاخه‌چه‌های درون شیشه و شاخص توسعه سطح برگ آن‌ها بود. میزان نکروز مشاهده شده بر خلاف ارقام گلابی که پس از چند هفته به تدریج دچار سوختگی بخش‌های مریستمی می‌شوند (Abdollahi *et al.*, 2005)، در رابطه با پایه‌های مورد آزمایش صفر بود.

بیش‌ترین میزان پرآوری برای پایه پیرودوارف در محیط QL تغییر یافته به میزان۳/۳ شاخه‌چه به ازاء ریزنمونه و برای پایه OH×F87 در محیط QL به میزان ۵/۳ شاخه‌چه به ازاء ریز نمونه مشاهده شد و پس از آن محیط‌های MS، DKW و MS تغییر یافته در

جدول ۱- مقایسه میانگین صفات مختلف رویشی دو پایه گلابی درکشت درون شیشه‌ای در محیط‌های کشت مختلف

Table1. Mean comparison of various vegetative characteristics of two *in vitro* pear rootstock on different culture media

	تعداد شاخه Proliferation		طول شاخه‌چه Shoot length (mm)		توسعه سطح برگ Leaf expansion (mm^2)		نکروز Necrosis (%)	
Media	Pyrodwarf	OH×F87	Pyrodwarf	OH×F87	Pyrodwarf	OH×F87	Pyrodwarf	OH×F87
MS	2.7ab	1.7c	35.3b	50.0a	52.2c	40.0c	0	0
mMS	1.5b	1.1c	48.2a	50.0a	71.3b	58.2b	0	0
QL	1.5b	5.3a	44.1ab	37.7b	80.5a	38.5c	0	0
mQL	3.3a	3.8b	50.3a	50.2a	78.6ab	68.7a	0	0
DKW	1.7b	1.7c	45.7ab	43.2ab	53.4c	45.3bc	0	0

میانگین‌هایی که در هر ستون با حروف مختلف مشخص شده‌اند، اختلاف معنی داری با یک‌دیگر در سطح احتمال ۵٪ دارند.

Means followed by different letters in each column are significantly different at the 5% level of probability.

رتبه‌های بعدی قرار گرفتند (جدول۱). مقایسه میزان نسبت یون‌های آمونیوم به نیترات و همچنین جایگزینی نمک کلرور کلسیم با نیترات کلسیم در محیط‌های QL و QL تغییر یافته حاکی از این بود که پایه‌های گلابی به حضور غلظت‌های بالای آمونیوم و همچنین یون کلر در محیط حساسیت نشان داده و این حساسیت در درجه اول به صورت کاهش درصد میزان پرآوری آشکار می‌شود (جدول ۱). این نتایج با گزارش‌های قبلی بل و همکاران (Bell *et al.*, 2009)، دپائولی و همکاران (۱۹۹۴)، خدائی چگنی و همکاران (۲۰۱۱) و عبداللهی و همکاران (۲۰۰۵) که محیط‌های کشت مبتنی بر نمک‌های معدنی QL نتایج بهتری ازمحیط‌های حاوی نمک‌های MS گزارش کرده بودند منطبق است. این درحالی است که نصرتی (۲۰۰۳) محیط پایه MS را در مقایسه با محیط QL به منظور پرآوری و توسعه برگی ارقام گلابی ایرانی نظیر رقم درگزی، شاه میوه و نطنزی مناسب‌تر گزارش کرد. ظاهراً فاصله ژنتیکی زیاد ارقام گلابی ایرانی و اروپایی، خصوصاً سه رقم مورد استفاده در این تحقیق (Erfani *et al.*, 2012) عامل بروز چنین پاسخ‌های متفاوتی شده است.

مقایسه طول شاخه‌چه‌های درون شیشه دو پایه گلابی مورد مطالعه روی محیط‌های فوق بیانگر این بود که تقریباً در اغلب محیط‌های مورد استفاده، طول شاخه‌چه‌های تولیدی در حدود ۵۰ میلی‌متر بود که این طول بیانگر عکس‌العمل و رشد بسیار مطلوب پایه‌ها در شرایط آزمایش بوده است (جدول ۱). بیش‌ترین طول شاخه‌چه‌ها برای پایه پیرودوارف در محیط QL تغییر یافته و برای پایه OH×F87 در محیط‌های QL تغییر یافته، MS و MS تغییریافته مشاهده شد (جدول ۱). این داده در درجه اول بیانگر حساسیت کم‌تر پایه OH×F87 نسبت به پایه پیرودوارف نسبت به تغییرات میزان یون‌ها در محیط کشت بوده، ثانیاً افزایش میزان

پرآوری مشاهده شده در محیط QL تغییر یافته توام با افزایش کیفیت و طول شاخه‌چه‌ها انجام شده است. با توجه به این که در موارد متعددی افزایش زیاد نسبی و ظاهری پرآوری در محیط به بهای کاهش کیفیت شاخه‌چه‌های درون شیشه تمام می‌شود، در این‌جا محیط QL تغییر یافته سبب بهبود میزان پرآوری و کیفیت شاخه‌چه‌ها به صورت توام شده که حاکی از مطلوبیت این محیط برای رشد پایه‌های مورد آزمایش پیرودووارف و OH×F87 در شرایط درون شیشه است. این نتایج با گزارش‌های استیمارت و هاربگ (Stimart and Harbage, 1989) و بوجوانی و همکاران (Bhojwani *et al*., 1984) در انطباق است.

در ریز ازدیادی گونه‌های چوبی، قهوه‌ای شدن ریز نمونه‌ها و نکروز مریستمی یکی از مشکلات عمده کشت‌های درون شیشه‌ای است (Pierik, 1997). در گلابی نیز میزان قهوه‌ای شدن ریزنمونه‌ها نقش تعیین‌کننده‌ای در موفقیت یا عدم موفقیت ریزازدیادی آن دارد. علت اصلی نکروز جوانه‌های انتهایی در محیط درون شیشه‌ای به طور کامل مشخص نیست، ولی به نظر می‌رسد این عارضه در تکثیر درون شیشه‌شماری از گیاهان با کاهش کلسیم در محیط در ارتباط است (Ye *et al*., 2000). در این بررسی هیچ‌گونه نکروزی در سرشاخه‌ها در کلیه محیط‌ها مشاهده نشد که ظاهراً با سطح بالای نونهالی در پایه‌هائی که به صورت رویشی تکثیر می‌شوند همراه است.

استفاده از نوع منبع آهن در محیط کشت

مقایسه تاثیر دو منبع آهن Fe-EDTA و Fe-EDDHA نشان داد در پایه پیرودوارف نوع منبع آهن تاثیر معنی‌داری بر تعداد و طول شاخه چه نداشت. در اصل این پایه روی محیط حاوی منبع آهن Fe-EDTA، میزان پرآوری نهائی را طی چهار هفته اول به تعداد۳/۵ انجام داده و پس از آن رشد شاخه‌چه‌های پرآوری شده صورت انجام شده است (جدول ۲)، ولی Fe-EDDHA سبب شده تا میزان پرآوری از هفته چهارم به بعد نیز امتداد داشته و به سطح بالاتری تا ۴/۲ در مقایسه با منبع آهن Fe-EDTA برسد (جدول ۲). به نظر می‌رسد Fe-EDDHA به صورت کندتر و مطلوب‌تری سبب تامین آهن مورد نیاز رشد شاخه‌چه‌های درون شیشه شده که از یک سو پرآوری کندتر و از سوی دیگر در انتها سطح بالاتری از پرآوری را به همراه داشته است. میزان پرآوری و رفتار پایهOH×F87 روی دو منبع آهن حاکی از کاهش پرآوری این پایه با استفاده از Fe-EDDHA بود (جدول ۲). برخلاف داده‌های میزان پرآوری، میزان رشد طولی شاخه‌چه‌ها روی محیط حاوی Fe-EDDHA به مراتب نسبت به محیط حاوی Fe-EDTA بهتر بود. ارتفاع نهائی شاخه‌چه‌های پایه پیرودوارف در هفته هشتم به ۸/۵ سانتی‌متر بالغ شد (جدول ۳). با توجه به این که در برخی

جدول ۲- مقایسه میانگین پرآوری دو پایه گلابی در شرایط درون شیشه‌ای تحت تاثیر منابع آهن
Table 2. Mean comparison of proliferation of two *in vitro* pear rootstocks on two Fe sources

	تعداد شاخه‌چه در هفته چهارم Shoot number in week 4		تعداد شاخه‌چه در هفته ششم Shoot number in week 6		تعداد شاخه‌چه در هفته هشتم Shoot number in week 8	
Source of Fe	Pyrodwarf	OH×F87	Pyrodwarf	OH×F87	Pyrodwarf	OH×F87
Fe-EDTA	3.5a	6.0a	3.5b	7.5a	3.5b	7.2a
Fe-EDDHA	2.3a	3.4b	4.2a	5.8b	4.2a	5.9b

میانگین‌هایی که در هر ستون با حروف مختلف مشخص شده‌اند، اختلاف معنی داری با یک‌دیگر در سطح احتمال ۵٪ دارند.
Means followed by different letters in each column are significantly different at the 5% level of probability.

جدول ۳- مقایسه میانگین طول شاخه دو پایه گلابی در شرایط درون شیشه تحت تاثیر منابع آهن
Table 3. Mean comparison of shoot length of two *in vitro* pear rootstocks on two Fe sources

	طول شاخه چه در هفته چهارم Shoot length in week 4 (cm)		طول شاخه چه در هفته ششم Shoot length in week 6 (cm)		طول شاخه چه در هفته هشتم Shoot length in week 8 (cm)	
Source of Fe	Pyrodwarf	OH×F87	Pyrodwarf	OH×F87	Pyrodwarf	OH×F87
Fe-EDTA	3.9a	2.27b	3.9b	2.5b	3.9b	2.6b
Fe-EDDHA	3.9a	3.35a	4.3a	4.7a	8.5a	4.9a

میانگین‌هایی که در هر ستون با حروف مختلف مشخص شده‌اند، اختلاف معنی داری با یک‌دیگر در سطح احتمال ۵٪ دارند.
Means followed by different letters in each column are significantly different at the 5% level of probability.

دستورالعمل‌های کشت بافتی استفاده از سه مرحله پرآوری، رشد طولی شاخه‌چه (Elongation) و سپس ریشه‌زائی به جای فرآیند دومرحله‌ای پرآوری و ریشه‌زائی مورد توصیه است (DePaoli *et al.*, 1994) و با توجه به نقش مفید Fe-EDDHA در رشد طولی شاخه‌چه ها باکیفیت برتر برای استفاده در مرحله ریشه‌زائی، استفاده از آن در دوره طویل شدن شاخه‌چه‌ها در کنار کاهش سطح ترکیبات سایتوکینینی می‌تواند در تولید انبوه پایه‌های گلابی بسیار مفید واقع شود. با توجه به نتایج مطلوب منبع آهن Fe-EDDHA روی افزایش طول شاخه‌چه‌ها، در آزمایش‌های ریشه‌زائی از شاخه‌چه‌های ازدیادی از این منبع آهن استفاده شد.

ریشه‌زایی در زیر شاخه‌چه‌های هیبریدهای پایه

با توجه به کیفیت مناسب شاخه‌چه‌های پرآوری شده در مراحل قبل، درصد بالای ریشه‌زائی در ریزقلمه‌های هر دو پایه مورد آزمایش مشاهده شد. ریشه‌زائی به جز در شاخه چه پایه پیرودوارف مستقر شده در محیط فاقدIBA، در سایر شاخه‌چه حتی روی محیط فاقد IBA تقریباً به صورت کامل دیده شد (جدول ۴). به نظر می‌رسد این میزان ریشه‌زائی بالا در مقایسه با دیگر گزارش‌های قبلی که حداکثر ۵۰ درصد در بررسی خدائی چگنی و

جدول ۴ – مقایسه میانگین تعداد و طول ریشه در هفته چهارم و ششم در ریزقلمه‌های گلابی تحت تاثیر تیمارهای مختلف ریشه‌زائی

Table 4. Mean comparison of root number and length in weeks 4 and 6 in pear micro-cuttings under various root induction treatments

	تعداد ریشه (هفته چهارم) Root number in week 4		تعداد ریشه (هفته ششم) Root number in week 6		طول ریشه (هفته چهارم) Root length in week 4 (cm)		طول ریشه (هفته ششم) Root length in week 6 (cm)	
	Pyrodwarf	OH×F87	Pyrodwarf	OH×F87	Pyrodwarf	OH×F87	Pyrodwarf	OH×F87
MS	9.5c	6.2c	9.1a	14.8b	1.7a	2.6a	5.1d	6.2c
MS+0.5 IBA	6.2d	8.1b	9.1a	10.5d	1.5b	1.7b	9.1a	8.1b
MS+1IBA	7.6c	11.5a	7.6c	15.1b	1.4b	1.5b	7.2c	11.5a
QL	0.0e	3.2e	0.0d	7.5d	0.0c	1.5b	0.0d	3.2e
QL+0.5 IBA	7.4b	5.2d	7.4c	15.2b	1.8a	1.0c	7.4c	5.2e
QL+1 IBA	7.8b	7.5c	8.8b	15.5a	1.7a	2.2a	8.4b	7.5c

میانگین‌هایی که در هر ستون با حروف مختلف مشخص شده‌اند، اختلاف معنی داری با یک‌دیگر در سطح احتمال ۵٪ دارند.

Means followed by different letters in each column are significantly different at the 5% level of probability.

همکاران (۲۰۱۱) مشاهده شده است به کیفیت بالای شاخه‌چه‌های تولیدی از نظر طول و قطر و شادابی در اثر استفاده از منبع آهن Fe-EDDHA و سایر اجزاء محیط کشت اعم از نمک‌های معدنی و آگار در ارتباط است. ریشه‌زائی کامل شاخه‌چه‌های ارقام گلابی همچنین در بررسی عبداللهی و همکاران (۲۰۰۵) مشاهده و گزارش شده است. بر این اساس، نتایج بیان می‌کنند که در صورت تولید ریزقلمه‌های مطلوب در شرایط غلظت‌های متناسب سایتوکینین، به ویژه سطوح نسبتاً پائین BAP که به عنوان یک ممانعت کننده ریشه‌زائی محسوب می‌شود (DePaoli *et al.*, 1994) دستیابی به ریشه‌دهی کامل در ریزقلمه‌های گلابی دور از انتظار نخواهد بود.

بالاترین تعداد ریشه نابجای تولیدی به ازاء شاخه چه در پایه پیرودوارف در چهار هفته روی محیط MS فاقد تنظیم کننده رشد و پس از شش هفته روی محیط حاوی ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر IBA مشاهده شد (جدول ۴). میزان افزایش تعداد ریشه به ازاء شاخه چه در پایه پیرودوارف بین چهار تا شش هفته چندان زیاد نبود، این درحالی است که در پایه OH×F87 در اغلب تیمارها جهش قابل توجهی در تعداد ریشه بین این دو زمان مشاهده شد (جدول ۴).خروج ریشه‌های نابجا در گونه گلابی پس از چهار هفته در دیگر تحقیقات روی این گیاه نیز دیده شده است (Dolcet-Sanjuan *et al.*, 1990؛ Banno *et al.*, 1988؛ Moretti *et al.*, 1992). بالاترین میزان تعداد ریشه به ازاء شاخه چه در پایه OH×F87 در تیمار محیط MS و QL حاوی ۱ میلی‌گرم بر لیتر IBA مشاهده شد که بیانگر حساسیت کم این پایه در مرحله ریشه‌زائی به نوع نمک‌ها و اهمیت بیش‌تر غلظت IBA در این مورد است. همچنین طول ریشه‌ها در مرحله چهار هفته

اغلب در محدوده ۱ تا ۲ سانتی‌متر در هر دو پایه پیرودوارف و OH×F87 بود که با گذشت دو هفته بعد به میزان قابل توجهی افزایش یافت. افزایش قابل توجه طول در این مرحله به انتقال شاخه چه در هفته چهارم از محیط واجد IBA به محیط عاری از تنظیم کننده رشد مربوط بوده و چنانچه مشهود است در تیمارهائی که در ابتدا تنظیم کننده رشد IBA دریافت کرده و سپس به محیط عاری از تنظیم کننده رشد منتقل شده‌اند اغلب رشد طولی ریشه‌ها محسوس‌تر است (جدول ۴). پس از مرحله ریشه‌زایی در هر دو پایه مورد آزمایش، گیاهچه‌های تولیدی به صورت موفقیت‌آمیزی به ترکیب خاکی کوکوپیت و پرلیت منتقل و پس از طی دوره مرحله سازگاری اولیه، پس از رشد به میزان ۱۵ تا ۲۰ سانتی‌متر در بهار سال ۱۳۹۲ جهت پیوند به نهالستان منتقل شدند.

اگرچه انتخاب محیط کشت پایه QL و QL تغییر یافته در دیگر تحقیقات انجام شده در داخل و خارج کشور برای استقرار و تکثیر درون شیشه ارقام و پایه‌های گلابی مورد تایید قرار گرفته است، لیکن این تحقیق ضمن تایید نتایج قبلی و استفاده از طیف گسترده‌تری از محیط‌ها نشان داد که کاهش غلظت کلر، بهبود وضعیت یون کلسیم در محیط کشت و تغییر مناسب نسبت‌های یون آمونیوم به نیترات می‌تواند در بهبود ازدیاد گلابی در محیط کشت موثر واقع شود. استفاده از این محیط بهینه شده در کنار منبع آهن Fe-EDDHA که کاهش نسبی پرآوری و افزایش کیفیت شاخه‌چه‌ها و در نتیجه بهبود وضعیت شاخه‌چه‌های مورد استفاده را به همراه خواهد داشت، سبب بهبود چشمگیر میزان ریشه‌زائی در ریزقلمه‌های پایه‌های گلابی پیرودوارف و OH×F87 شده و این بهبود کیفیت به نوبه خود در افزایش میزان سازگاری گیاهچه‌ها با شرایط خارج شیشه موثر واقع خواهد شد. بر اساس شرایط بهینه شده در این تحقیق، این روش می‌تواند به خوبی برای تکثیر انبوه یا نیمه انبوه این پایه‌ها مورد استفاده واقع شود.

References

Abdollahi, H. 2011. Pear: Botany, Cultivars and Rootstocks. Agricultural Education Publications, Ministry of Jihad-e-Agriculture, Tehran, Iran. 210pp. (in Persian).

Abdollahi, H., Atashkar, D., and Alizadeh, A. 2012. Comparison of dwarfing effects of two hawthorn and quince rootstocks on several commercial pear cultivars. Iranian Journal of Horticultural Science 43: 53-63 (in Persian).

Abdollahi, H., Muleo, R., and Ruggini, E. 2005. Evaluation of different basic salts, growth regulators and pectin effects on micropropagation of pear (*Pyrus communis*

L.) genotypes. Seed and Plant 21: 373-384 (in Persian).

Abu-Qaoud, H., Skirvin, R. M., and Betow, F. E. 1991. Influence of nitrogen form and NH_4^+-N/:NO_3^-N ratios on adventitious shoot formation from Pear (*Pyrus communis*) leaf explants *in vitro*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 27: 315- 319.

Al–Maarri, K., Arnaud, Y., and Misipiac, E. 1994. Micropropagation of *Pyrus communis* cultivar "Passe Crassan" seedling and cultivar "Williams": Factors affecting root formation *in vitro* and *ex vitro.* Scientia Horticulturae 58: 207-214.

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

Bell, R. L., Quamme, H. A., layne., R., E., C., and Skirvin, R., M. 2009. Pears. pp. 444-514. In:. Janick, J., and Moore, J. W. (eds.) Fruit Beeding, Vol. 1. John Wiley and Sons Inc., New York, USA.

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

Campbell, J. 2003. Pear Rootstocks. AGFACTS, the State of New South Wales Agriculture, Australia. 13pp.

DePaoli, G., Rossi, V., and Scozzoli, A. 1994. Micropropagazione delle Piante Ortoflorofrutticole. Edagricole, Bologna, Italy, 450pp.

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

Driver, J. A., and Kuniyuki, A. H. 1984. *In vitro* propagation of Paradox walnut rootstock. HortScience 19: 507-509.

Erfani, J., Ebadi, A., Abdollahi, H., and Fatahi Moghadam, M. R. 2012. Genetic diversity of some pear cultivars and genotypes using simple sequence repeat (SSR) markers. Plant Molecular Biology Reporter 30: 1065-1072.

Hartmann, H. T., Kester, D. E., Davies, F. T. J., and Geneve, R. G. 1997. Plant Propagation: Principles and Practices. Prentice Hall Publication, New Jersey, USA. 770pp.

Jacob, H. B. 1998. Pyrodwarf, a new clonal rootstock for high density pear orchards. Acta Horticulturae 475: 169-178.

Khodaee Chegenee, F., Abdollahi, H., Ershadee, A., and Esna Ashari, M. 2011.

Determination of micro-propagation protocol for OH×F333 and OH×F69 pear clonal rootstocks. Seed and Plant Production Journal 27-2: 297-312 (in Persian).

Leblay, C., Chevreau, E., and Robin, L. M. 1991. Adventitious shoot regeneration from *in vitro* leaves of several pear cultivar (*Pyrus communis* L.). Plant Cell, Tissue and Organ Culture 25: 99-105.

Moretti, C., Scozoli, A., Pasini, D., and Paganelli, F. 1992. *In vitro* propagation of pear cultivars. Acta Horticulturae 300: 115-118.

Murashige, T., and Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture. Physiolgia Plantarum 15: 473-497.

Nosrati, S. Z. 2003. *In vitro* propagation of some pear (*Pyrus communis*) cultivars. M.Sc. Thesis, College of Agriculture, University of Karaj, Tehran, Iran.109pp. (in Persian)

Pasqual, M., Cavalcante-Alves, J. M., Chalfun, N. N. J., Silva, A. B., Dutra, L. F., and Bianchi, J. V. 2002. *In vitro* rooting and shoot growth of *Pyrus betulaefolia* rootstock. Acta Horticulturae 596: 447-450.

Pierik, R. L. M. 1997. *In vitro* Culture of Higher Plants. Kluwer Academic Publishers, The Netherlands. 348pp.

Quoirin, M., and Lepoivre, P. 1977. Etude de milieux adaptes aux cultures *in vitro* de. Acta Horticulturae 78: 437-442.

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

Sotiropoulos, T. E., Almaliotis, D., Papadakis, I., Dimassi, K. N., and Therios, I. N. 2013. Effects of different iron sources and concentrations on *in vitro* multiplication, rooting and nutritional status of the pear rootstock OHF 333. European Journal of Horticultural Science 71: 222-226.

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

Tukey, H. B. 1964. Dwarfed Fruit Trees. Cornell University Press, Ithaca, USA. 562pp.

Wada, S., Niedz, R. P., DeNoma, J., and Reed, B. M. 2013. Mesos components ($CaCl_2$, $MgSO_4$, KH_2PO_4) are critical for improving pear micropropagation. *In vitro* Cellular and Developmental Biology-Plant 49: 356-365.

Westwood, M. N. 1993. Temperate Zone Pomology. Timber Press, Portland, Oregon,

USA. 523pp.

Ye, G., Mcneil, D. L., Conner, A. J., and Hill, G. D. 2000. Multiple shoot formation in lentil (*Lens culinaris*) seeds. New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science 30: 1-8.