



## بهینه سازی شرایط ازدیاد درون شیشه‌ای برای برخی از ژنوتیپ‌های گزینش شده درخت به (*Cydonia oblonga* Mill.) اصفهان

### Optimization of in Vitro Propagation Conditions for Some Selected Quince (*Cydonia oblonga* Mill.) Genotypes of Isfahan

محمد ترکاشوند<sup>۱</sup>، علی رضائی<sup>۲</sup>، علی وطن پور ازغندی<sup>۳\*</sup>، حمید عبداللهی<sup>۴\*</sup>،  
مهرشاد زین العابدینی<sup>۵</sup> و آسا ابراهیمی<sup>۶</sup>

- ۱- دانشجوی سابق کارشناسی ارشد، گروه بیوتکنولوژی، دانشکده علوم کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات، تهران، ایران.
- ۲- پژوهشگر، پژوهشکده میوه‌های معتدله و سردسیری، موسسه تحقیقات علوم باغبانی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران.
- ۳- استادیار، بخش تحقیقات کشت بافت و انتقال ژن، پژوهشگاه بیوتکنولوژی کشاورزی ایران، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران.
- ۴- دانشیار، پژوهشکده میوه‌های معتدله و سردسیری، موسسه تحقیقات علوم باغبانی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران.
- ۵- دانشیار، بخش تحقیقات ژنومیکس، پژوهشگاه بیوتکنولوژی کشاورزی ایران، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران.
- ۶- استادیار، گروه بیوتکنولوژی، دانشکده علوم کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات، تهران، ایران.

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۱۲/۰۹ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۴/۰۱/۱۶

#### چکیده

ترکاشوند، م.، رضائی، ع.، وطن پور ازغندی، ع.، عبداللهی، ح.، زین العابدینی، م. و ابراهیمی، آ. ۱۴۰۴. بهینه سازی شرایط ازدیاد درون شیشه‌ای برای برخی از ژنوتیپ‌های گزینش شده درخت به (*Cydonia oblonga* Mill.) اصفهان. نهال و بذر ۴۱: ۱-۲۲

تکثیر درون شیشه‌ای درخت به نسبت به دیگر درختان میوه دانه‌دار با دشواری بیشتری همراه است و در نتیجه، بهینه‌سازی روش‌های کشت بافت برای ارقام و ژنوتیپ‌های این درخت با اهداف مختلف نظیر تولید هسته‌های عاری از ویروس، ضرورت دارد. بر این اساس، پژوهش حاضر به منظور بهینه‌سازی شرایط رشد، پرآوری و ریشه‌زایی دو ژنوتیپ امیدبخش درخت به منطقه اصفهان با کدهای KVD4 و KM1 همراه با رقم جدید بهتا در شرایط درون شیشه‌ای انجام شد. پس از استقرار ژنوتیپ‌ها از طریق کشت مرستم، در آزمایش اول، اثر محیط‌های کشت پایه MS و QL مورد بررسی قرار گرفت که نتایج حاصل از ارزیابی صفات نشان داد استفاده از محیط پایه QL سبب بهبود رشد، پرآوری و کیفیت شاخه‌چه‌های درون شیشه‌ای مواد گیاهی مورد ارزیابی شد و محیط QL، به عنوان محیط کشت پایه برای آزمایشات بعدی انتخاب شد. در آزمایش دوم، اثر سیتوکینین‌های 2iP و BAP در غلظت‌های ۰/۵، ۱ و ۲ میلی‌گرم در لیتر و TDZ در دو غلظت ۰/۰۲۲ و ۰/۲۲ میلی‌گرم در لیتر بر پرآوری ریزنمونه‌ها بررسی شد. نتایج نشان داد که غلظت ۱ میلی‌گرم در لیتر 2iP و ۲ میلی‌گرم در لیتر BAP و غلظت ۰/۲۲ میلی‌گرم در لیتر TDZ بهترین کارایی را برای بهبود صفات مورد ارزیابی شاخه‌چه‌های درون شیشه‌ای داشتند. برای ریشه‌دار نمودن ریزقلمه ژنوتیپ‌های مورد ارزیابی، در آزمایش سوم از غلظت‌های مختلف دو اکسین IBA و NAA به صورت جداگانه و ترکیبی IBA + NAA استفاده شد. نتایج نشان داد که اثر IBA در مقایسه با NAA در ریشه‌زایی ریزقلمه‌های درخت به بیشتر بود، به طوری که بالاترین میزان ریشه‌زایی (۶۶ درصد) در تیمار یک میلی‌گرم در لیتر IBA به دست آمد.

واژه‌های کلیدی: به، اکسین، پرآوری، ریشه‌زایی، سیتوکینین، کشت مرستم.

تلفن: ۰۲۶۳۶۷۰۲۵۴۱

\*نگارنده مسئول: h.abdollahi@areeo.ac.ir و azghandi@abrii.ac.ir



2025© Seed and Plant. This is an open access article distributed under Creative Commons Attribution 4.0 International License (CC BY 4.0), which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source.

## مقدمه

و یا خوابانیدن انجام می شود که مستلزم صرف وقت زیاد و فصل خاصی از سال می باشد (Abdollahi, 2010). علاوه بر معضلات موجود برای تولید پایه های به، ارقام استفاده شده جهت احداث باغ نیز دارای مشکلاتی نظیر حساسیت به بیماری آتشک (Fire Blight)، حساسیت به پوسیدگی طوقه فیتوفترائی (*Phytophthora spp.*) و پائین بودن عملکرد میوه در باغ می باشند (Alipour et al., 2014). کلیه ارقام درخت به مورد استفاده در کشور بومی می باشند، و هسته های عاری از ویروس و سالم آنها تاکنون در سطح انبوه و تجاری تولید نشده است (Abdollahi, 2024; Mehrabi Pour et al., 2012).

با توجه به وجود مشکلات فوق، تولید ارقام مطلوب و یکنواخت در برنامه های به نژادی به که برای تولید ارقام مقاوم به بیماری و یا افزایش عملکرد میوه در کشور انجام می شود، از اهمیت ویژه ای در برخوردار است. از جمله پژوهش های انجام شده در کشور با هدف گزینش ارقام جدید درخت به، گزارش عبداللهی و همکاران (Abdollahi et al., 2008a) مبنی بر جمع آوری و احداث کلکسیون به کشور، ارزیابی ژرم پلاسما به اصفهان (Abdollahi et al., 2008b) و ژرم پلاسما به مناطق خراسان و گیلان و گزینش ژنوتیپ های برتر ژرم پلاسما جمع آوری شده (Alipour et al., 2014) قابل ذکر است. از این برنامه ها تاکنون سه رقم ویدوجا، بهتا و بهافرید معرفی شده اند و ژنوتیپ های امیدبخشی نظیر ژنوتیپ KVD4 از نظر صفات برتر پومولوژیک گزینش مقدماتی انجام

درخت به (*Cydonia oblonga* Mill.) متعلق به خانواده گلسرخیان (Rosaceae) و زیر خانواده دانه داران (Spirioidea) به عنوان درختی کم توقع و از جمله درختان میوه دانه دار مناطق معتدله محسوب می شود (Abdollahi, 2021). این درخت از گونه های بومی نواحی شمالی ایران و ترکمنستان محسوب شده و علاوه بر مصارف دارویی و بهداشتی، می توان از انواع گزینش شده و پاکوتاه آن شامل کوئینس A، کوئینس Adams و کوئینس C به عنوان پایه برای ارقام تجاری درخت به و برخی از ارقام گلایی که با پایه های متعلق به این گونه سازگار می باشند، استفاده کرد (Abdollahi, 2010). به گزارش سازمان غذا و کشاورزی ملل متحد (FAO)، کشور ایران در سال ۲۰۲۲ بعد از ترکیه، چین و ازبکستان، با تولید بیش از ۸۲ هزار تن میوه به در رتبه چهارم تولید این محصول، و با حدود هفت هزار هکتار، چهارمین کشور از نظر سطح زیر کشت این محصول در دنیا بوده است (FAO, 2022).

دسترسی به پایه و رقم مناسب دو مورد از مشکلات کشت و پرورش درخت به هستند. در درخت به، پایه های بذری متعلق به گونه *C. oblonga* برای اراضی حاصلخیز و پایه های متعلق به جنس ولیک یا زالزالک (*Crataegus spp.*) برای اراضی نامناسب و آهکی مورد استفاده قرار می گیرند (Manee, 1993). تکثیر و ازدیاد پایه های همگروه درخت به، از طریق پاجوش، قلمه

شده است.

اولین بررسی‌های انجام شده در زمینه کاربرد کشت بافت برای درخت به توسط نمت (Nemeth, 1979)، دروآرت (Druart, 1980) و ال‌ماری و همکاران (Al Maarri *et al.*, 1986) انجام شده است. ال‌ماری و همکاران (Al Maarri *et al.*, 1986) به تکثیر درون شیشه‌ای پرونس کوئینس پرداخته و اثر غلظت‌های مختلف BAP و NAA را بر پرآوری و ریشه‌زائی ریزقلمه‌های این پایه بررسی کردند. این پژوهشگران گزارش کردند که بیشترین میزان پرآوری در دو میلی گرم در لیتر BAP و بهترین ریشه‌زائی با استفاده از ۰/۱ میلی گرم در لیتر NAA به دست آمد.

جیورگوتا و همکاران (Giorgota *et al.*, 2009) به بررسی اثر نمک‌های مختلف محیط‌های رشد (Lloyd and WPM) (Quoirin *et al.*, QL و McCown, 1980) بر رشد و پرآوری پایه‌ها و ارقام درخت به پرداختند و مشاهده کردند که علی‌رغم وجود مقداری شیشه‌ای شدن (Hyperhydration) در ریزشاخه‌های درون‌شیشه درخت به روی محیط QL، کارائی این محیط نسبت به محیط WPM بسیار بیشتر بود. در این بین، برتری نمک‌های پایه QL می‌تواند با منبع تامین کلسیم و یا عدم وجود کلر در این محیط مرتبط باشد (Wada, 2013). گولسن و همکاران (Gulsen *et al.*, 1999) به بررسی و مقایسه آگارهای مختلف بر پرآوری پایه درخت به کوئینس A پرداختند و آگار مرک (Merck) را به منظور پرآوری شاخساره‌های

درون شیشه‌ای، برتر از سایرین تشخیص دادند. در این بررسی ژلرایت (Gelrite) با توجه به سختی آن کمترین مطلوبیت را برای پرآوری پایه درخت به نشان داد.

میزان ریشه‌زائی قابل توجهی روی ریزقلمه‌های به، در نصف غلظت محیط Murashige MS (Murashige MS and Skoog, 1962) همراه با ویتامین‌های لی-فوسارد (Lee and Fossard, 1977)، یک میلی گرم در لیتر IBA و ۰/۱ میلی گرم در لیتر GA<sub>3</sub> همراه با میزان قند کاهش یافته به ۲۰ گرم در لیتر گزارش شد. بارتون و همکاران (Barton and Bhatia, 1993) استفاده از محیط MS به همراه ۱۰ میکرومول NAA را برای شروع ریشه‌زایی برخی ژنوتیپ‌های درخت به گزارش کردند. در بررسی چارتیر-هولیس (Chartier-Hollis, 1993) وجود اسید جیبرلیک برای تحریک رشد و نگهداری از کالوس درخت به ضروری تشخیص داده شد.

درخت به یکی از گیاهان بومی ایران و از ذخایر ارزشمند ژنتیکی کشور است. بنابراین تولید نهال‌های سالم و یکنواخت از ارقام مطلوب این درخت از جنبه تجاری حائز اهمیت است. در زمینه کشت‌بافت و ریزازدیادی، اثر ژنوتیپی به‌عنوان یکی از عوامل تعیین‌کننده شناخته می‌شوند و مطالعات متعدد نشان داده‌اند که واکنش ژنوتیپ‌های مختلف به ترکیب محیط کشت، نوع و غلظت تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی می‌تواند به‌طور معنی‌داری متفاوت باشد. بنابراین، کالیبراسیون دقیق محیط کشت و میزان مصرف هورمون‌ها برای هر ژنوتیپ تجاری امری ضروری است.

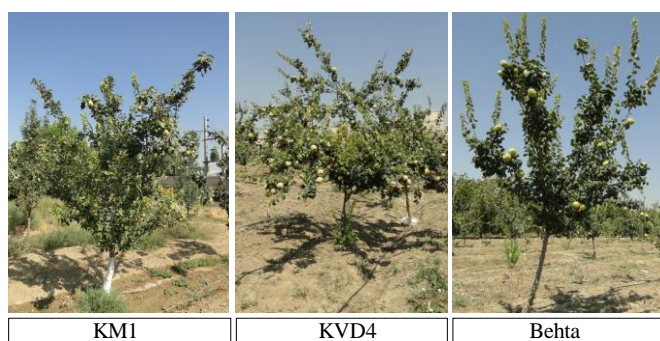
شامل دو ژنوتیپ امیدبخش KVD4 و KM1 و رقم بهتا بودند (شکل ۱). برای استقرار مواد گیاهی در شرایط درون شیشه‌ای، سرشاخه‌های ژنوتیپ‌های فوق از ایستگاه تحقیقات باغبانی کمالشهر کرج به آزمایشگاه بخش کشت بافت پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی ایران منتقل شد و پس از ضد عفونی سطحی با استفاده از جداسازی گنبد مریستمی و کشت مریستم مستقر شدند.

این پژوهش با هدف دستیابی به یک پروتکل بهینه‌سازی شده کشت درون شیشه‌ای برای شماری از ژنوتیپ‌های گزینش شده به اصفهان و با هدف استفاده از آن در تولید هسته‌های اولیه عاری از ویروس طراحی و اجرا شد.

## مواد و روش‌ها

### مواد گیاهی

مواد گیاهی مورد استفاده در این پژوهش



شکل ۱- شکل عمومی درخت، عادت رشد درخت و کیفیت رشد درختان به (*Cydonia oblonga* Mill.) مورد استفاده برای نمونه برداری جهت استقرار دو ژنوتیپ امید بخش KM1 و KVD4 و رقم بهتا در شرایط درون شیشه‌ای

Fig. 1. General tree form, tree growth habit and growth quality of quince (*Cydonia oblonga* Mill.) trees used for establishment of two promising genotype KM1 and KVD4 and cv. Behta, in *in vitro* conditions

استریل جدا شده و به پتری دیش‌های مربع ۲۵ خانه منتقل شدند و در شرایط فتوپریود ۱۶ ساعت نور، ایجاد شده توسط لامپ‌های فلورسنت سفید (Sylvania-Germany) با شدت نور ۴۰ میکرو مول بر متر مربع بر ثانیه و دمای شبانه روزی  $23 \pm 1$  درجه سانتی‌گراد، قرار

جهت ضد عفونی سطحی، از محلول حاوی ۱۲ درصد هیپوکلریت سدیم (۵ درصد کلر فعال) و ۰/۳۵ گرم بر لیتر کلرور جیوه تحت شرایط خلاء به مدت پنج دقیقه و سپس سه مرتبه شستشو با آب مقطر استریل استفاده شد. گنبد مریستمی جوانه‌های جانبی و انتهایی در شرایط

گرفتند. پس از ظهور اولین شاخه‌چه‌ها، تست عدم آلودگی باکتریایی ریز نمونه‌ها با استفاده از نمونه برداری و کشت نمونه‌ها در ۵۰ میلی‌لیتر محیط باکتریایی LB مایع و به مدت ۷۲ ساعت در دمای ۲۴ درجه سانتی‌گراد روی شیکر ۱۰۰ دور در دقیقه انجام و عدم آلودگی کشت‌ها با استفاده از اسپکتروفتومتر در طول موج ۶۰۰ نانومتر بررسی شد. شاخه‌چه‌های فاقد آلودگی برای انجام کشت‌های بعدی مورد استفاده قرار گرفته و سایرین حذف شدند. برای دستیابی به محیط مطلوب برای کشت درون شیشه‌ای سه آزمایش مستقل به صورت زیر انجام گرفت.

شاخساره‌های فاقد آلودگی داخلی، مطلوب به عنوان مواد گیاهی در آزمایشات پرآوری و ریشه‌زایی استفاده شدند.

**ارزیابی محیط‌های کشت**

با توجه به تاثیر به سزای نوع محیط کشت پایه مورد استفاده در ایجاد پروتکل رشد درون شیشه‌ای، در آزمایش اول به بررسی اثر دو نوع محیط کشت پایه (Murashige and MS (Quoirin and QL و Skoog, 1962) (Lepoivre, 1977) با یک تیمار تنظیم کننده رشد ثابت شامل یک میلی‌گرم برلیتر BAP و ۱ میلی‌گرم برلیتر 2iP پرداخته شد. علاوه بر تنظیم کننده‌های رشد، به هر یک از محیط‌ها، ۳۰ گرم برلیتر ساکارز و ۶/۸ گرم برلیتر آگار افزوده شد و pH محیط برابر ۵/۸ تنظیم شد. ضد عفونی محیط کشت با استفاده از دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد در فشار بخار ۱/۲ اتمسفر به مدت ۲۰ دقیقه انجام شد.

در هر شیشه که حاوی ۳۰ میلی‌لیتر از محیط کشت بود، پنج ریز نمونه تقریباً یکنواخت در زیر هود لامینار مستقر شد. شرایط رشد ریزنمونه‌ها در کلیه آزمایش‌ها همانند مرحله استقرار بود. کلیه آزمایش‌ها به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی در پنج تکرار و هر تکرار شامل پنج ریزنمونه انجام شد. عوامل مورد بررسی شامل محیط کشت پایه و ژنوتیپ بودند. ارزیابی تعداد شاخه‌چه‌ها و برگ تولیدی در هر ریزنمونه، طول شاخه‌چه و شاخص کیفیت ظاهری رشد (شاخص شادابی و سرسبزی شاخساره‌ها و برگ‌های ریزنمونه به صورت ۱: کیفیت بسیار ضعیف، ۲: کیفیت ضعیف، ۳: کیفیت متوسط، ۴: کیفیت خوب، ۵: کیفیت عالی)، در چهار هفته پس از کشت انجام شد.

#### ارزیابی اثر سیتوکینین‌ها

محیط کشت پایه MS برای این آزمایش استفاده شد، به طوری که از سه سایتوکینین شامل BAP، 2iP و TDZ به صورت آزمایش‌های مستقل از یکدیگر استفاده شد. تنظیم کننده‌های رشد 2iP و BAP در غلظت‌های ۰/۵، ۱ و ۲ میلی‌گرم برلیتر استفاده شدند. همچنین با توجه به شدت تاثیر زیاد سایتوکینین TDZ در شرایط درون شیشه‌ای، این تنظیم کننده رشد در دو غلظت ۰/۲۲ و ۰/۰۲۲ میلی‌گرم برلیتر استفاده شد. در این آزمایش‌ها اثر سطوح مختلف تنظیم کننده رشد و اثر ژنوتیپ درخت به صورت

فاکتوریل و در قالب طرح کاملاً تصادفی مورد ارزیابی قرار گرفت و سایر شرایط رشد و ارزیابی شاخه‌چه‌های پرآوری شده همانند آزمایش اول لحاظ شد.

### ارزیابی ریشه‌زایی

به منظور ریشه‌دار کردن ریزقلمه‌های حاصل از پرآوری و با توجه به اثر اکسین‌ها بر تولید ریشه‌های نابجا، از دو نوع اکسین IBA و NAA به صورت جداگانه و ترکیبی استفاده شد. در کلیه آزمایشات انجام شده در مرحله ریشه‌زایی، محیط کشت پایه QL انتخاب و استفاده شد. در مرحله اول ریزقلمه‌های یکنواخت حاصل از پرآوری انتخاب و در شیشه‌های حاوی ۳۰ میلی‌لیتر محیط کشت در زیر هود لامینار کشت شدند. در این مرحله محیط حاوی ۳۰ گرم برلیتر ساکارز بود و پنج سطح اکسینی ۰/۲۵، ۰/۵، ۱، ۲ و ۴ میلی‌گرم برلیتر IBA و NAA به عنوان تیمار محرک ریشه‌زایی در دو آزمایش مستقل اعمال شد. تیمار دیگر ریشه‌زایی مربوط به استفاده همزمان از IBA و NAA در ۵ سطح شامل سه سطح ۰/۵، ۱ و ۲ میلی‌گرم برلیتر IBA به همراه سطح ثابت ۰/۵ میلی‌گرم برلیتر NAA و دو سطح ۱ و ۲ میلی‌گرم برلیتر NAA به همراه سطح ثابت ۰/۵ میلی‌گرم برلیتر IBA انجام شد.

کلیه شیشه‌ها به مدت هفت روز در تاریکی با شرایط دمایی  $23 \pm 1$  قرار گرفتند و سپس به شرایط نوری عادی در اتاقک‌های رشد با دوره نوری ۱۶ ساعت روشنایی و هشت ساعت تاریکی در شبانه روز منتقل شدند. در مرحله دوم به محض

ظهور اولین آغازه‌های ریشه، ریزقلمه‌ها به محیط حاوی نصف غلظت نمک‌های QL، بدون تنظیم‌کننده رشد و با ۱۵ گرم بر لیتر ساکارز منتقل و بعد از گذشت ۳ هفته، به محیط خارج از شیشه برده شدند. در این آزمایش‌ها نیز اثر سطوح مختلف تنظیم‌کننده‌های رشد محرک ریشه‌زایی و اثر ژنوتیپ به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی مورد ارزیابی قرار گرفت. ارزیابی درصد ریشه تولیدی به ازای ریز قلمه، تعداد ریشه‌های تولیدی در هر ریز قلمه، میانگین طول ریشه‌های تولیدی و شاخص کیفیت ظاهری رشد انجام شد.

داده‌های حاصل از اندازه‌گیری‌های انجام شده با استفاده از نرم افزار SAS آنالیز و مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون دانکن در سطح احتمال پنج درصد انجام شد.

### نتایج و بحث

#### اثر محیط کشت پایه

نتایج نشان داد که اثر ساده نوع محیط‌های مورد آزمایش بر صفات تعداد شاخه‌چه‌ها و برگ‌های تولیدی در هر ریزنمونه و کیفیت ظاهری رشد در سطح یک درصد معنی دار بود و بر طول شاخه‌چه‌های تولیدی اثر معنی‌داری نداشت (جدول تجزیه واریانس ارائه نشده است). اثر ژنوتیپ نیز بر کلیه صفات مورد بررسی معنی دار بود و اثر متقابل ژنوتیپ  $\times$  محیط‌های مورد ارزیابی بر صفت تعداد شاخه‌چه‌های تولیدی در سطح یک درصد

معنی‌داری بود. مقایسه میانگین صفات مورد ارزیابی بیانگر برتری محیط کشت پایه QL نسبت به محیط کشت پایه MS بود. این برتری در افزایش میزان شاخه‌چه‌های تولیدی، سرعت تکثیر را افزایش داده و راندمان استفاده از محیط را بالا برد (جدول ۱). مقایسه میانگین‌ها نشان داد که صفات تعداد شاخه‌چه و کیفیت ظاهری رشد در محیط پایه QL به صورت معنی‌داری نسبت به محیط کشت پایه MS برتری بود (جدول ۱). از طرفی محیط QL علاوه بر برتری نرخ پرآوری در ژنوتیپ‌های مورد ارزیابی به میزان ۲/۷۳ به ازای هر ریز نمونه در مقایسه با محیط MS به میزان ۱/۷۳ به ازای هر ریز نمونه، میانگین طول شاخه‌چه‌ها و میزان برگ‌های تولیدی در هر ریز نمونه را نیز به صورت غیرمعنی‌دار افزایش داد.

جدول ۱- مقایسه میانگین اثر محیط کشت و ژنوتیپ بر شاخص‌های رشد در ارزیابی تکثیر درون شیشه‌ای دو ژنوتیپ امید بخش و رقم بهتا

Table 1. Mean comparison of the effect of culture medium and genotype on growth indices in *in vitro* conditions of two quince promising genotypes and cv. Behta

	تعداد شاخه‌چه Shootlet number	طول شاخه‌چه (میلی‌متر) Shootlet length (mm)	تعداد برگ Leaf number	کیفیت ظاهری رشد Visual quality index
	Culture medium محیط کشت			
MS	1.73b	14.70a	4.18a	1.78b
QL	2.73a	16.80a	5.83a	2.25a
	Genotype ژنوتیپ			
KVD4	3.27a	20.15a	6.25a	2.40a
Behta	1.90b	14.65b	5.25b	1.97ab
KM1	1.52b	12.45b	3.52c	1.67b

میانگین‌هایی، در هر ستون و برای هر عامل، که دارای حرف مشابه می باشند، بر اساس آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال پنج درصد تفاوت معنی دار ندارند.

Means, in each column and for each factor, followed by similar letter are not significantly different at the 5% probability level-using Duncan's Multiple Range Test.

آمونیم تنها منبع نیتروژن محیط QL است که به میزان ۴۰۰ میلی گرم بر لیتر مورد استفاده قرار می گیرد. در مقابل مقدار بالای این عنصر در محیط MS به میزان ۱۶۵۰ میلی گرم بر لیتر می تواند اثر منفی بر رشد ریز نمونه‌های درخت به داشته و دلیلی برای برتری محیط QL نسبت به MS در این گیاه باشد.

نکته قابل ذکر حفظ کیفیت شاخه‌چه‌های تولیدی در محیط QL بود که علی‌رغم افزایش تولید شاخه‌چه‌های بیشتر و طویل‌تر، از کیفیت بالاتری نیز برخوردار بودند. این برتری می تواند به دلیل نوع منبع نیتروژن، عدم وجود کلر و نوع منبع کلسیم و افزایش سطح پتاسیم مونوفسفات به کار رفته در ترکیب محیط QL باشد. نیترات

شرایط درون شیشه‌ای از قدرت تکثیر بالاتری برخوردار بود (جدول ۱). این برتری در کلیه صفات مورد ارزیابی صادق بود، به طوری که این ژنوتیپ با میانگین ۳/۲۷ شاخه‌چه تولیدی بیشترین پرآوری را در بین سه ژنوتیپ مورد ارزیابی داشت و با میانگین ۲۰/۱۵ میلی‌متر بلندترین طول شاخه‌چه‌های تولیدی و با میانگین ۶/۲۵ برگ به ازای هر ریز نمونه بیشترین میزان برگ تولیدی را تولید کرد و کیفیت شاخه‌چه‌های تولیدی نیز در این ژنوتیپ نسبت به سایر ژنوتیپ‌ها دارای برتری معنی‌داری بود (جدول ۱). همچنین مقایسه میانگین‌ها نشان داد که کمترین تعداد شاخه‌چه (۱/۵۲)، طول شاخه‌چه (۱۲/۴۵ میلی‌متر)، تعداد برگ (۳/۵۲) و کیفیت ظاهری رشد (۱/۶۷) در ژنوتیپ KM1 وجود داشت که با ژنوتیپ KVD4 از لحاظ این صفات تفاوت معنی‌دار داشت (جدول ۱).

#### اثر سیتوکنین‌ها

اثر سیتوکنین‌های مختلف بر بهینه‌سازی شرایط رشد و پرآوری ژنوتیپ‌های استقرار یافته در شرایط درون شیشه‌ای، مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد غلظت‌های مختلف 2iP این تنظیم‌کننده رشد بر روی کلیه صفات مورد ارزیابی معنی‌دار بود، به طوری که برای تعداد شاخه‌چه تولیدی در هر ریزنمونه و میانگین طول شاخه‌چه‌ها در سطح پنج درصد و برای صفات تعداد برگ تولیدی در هر ریزنمونه و شاخص کیفیت ظاهری رشد در سطح یک درصد معنی‌دار بود (جدول تجزیه واریانس ارائه نشده است).

دلیل دیگر برتری محیط QL به MS می‌تواند وجود کلر در ترکیب کلرورکلسیم باشد که علائم ناشی از نکروز و سوختگی برگ‌ها به دلیل حساسیت خانواده گلسرخیان را موجب می‌شود که با کاربرد محیط QL در هیچکدام از آزمایش‌ها انجام شده علائم فوق مشاهده نشد. نیتراکلسیم منبع کلسیم محیط QL بوده که به میزان ۸۳۲/۷۷ میلی‌گرم بر لیتر بکار رفته است و در محیط MS این عنصر وجود ندارد و منبع کلسیم از عنصر کلرورکلسیم تامین می‌گردد. البته مشاهدات حاکی از این است که افزایش سطح پتاسیم مونوفسفات می‌تواند به متعادل نمودن محیط در نوسانات pH کمک نموده و موجب افزایش جذب عناصر مغذی شود.

این یافته‌ها با نتایج عبداللهی و همکاران (Abdollahi *et al.*, 2005) بر روی پایه‌های گلابی مطابقت دارد و با نتایج سیکوتی و همکاران (Ciccotti *et al.*, 2008) که محیط MS را برای پرآوری سیب مطلوب دانستند مغایرت داشته که می‌تواند به دلیل نزدیکی بیشتر ژنوتیپ‌های درخت به با ژنوتیپ‌های گلابی باشد. رضوان‌جو و همکاران (Rezvanjoo *et al.*, 2020) در بررسی اثر نوع محیط کشت و غلظت‌های مختلف بنزیل آدنین بر پرآوری شاخساره‌های زغال اخته گزارش کردند که محیط کشت QL نتایج بهتری را از نظر صفات مختلف ارزیابی شده نشان داد. مقایسه میانگین‌ها نشان داد که ژنوتیپ KVD4 نسبت به دیگر ژنوتیپ‌ها نرخ رشد (مجموع صفات رویشی) بیشتری داشت و در

مقایسه میانگین‌ها نشان داد که غلظت یک میلی گرم بر لیتر 2iP این تنظیم کننده رشد در مقایسه با غلظت دو میلی گرم بر لیتر آن برتر بود (جدول ۲).

جدول ۲- مقایسه میانگین اثر غلظت 2iP و ژنوتیپ بر شاخص‌های رشد در ارزیابی تکثیر درون شیشه‌ای دو ژنوتیپ امید بخش و رقم بهتا

Table 2. Mean comparison of the effect of 2iP and genotype on growth indices in *in vitro* conditions of two quince promising genotypes and cv. Behta

	تعداد شاخه‌چه	طول شاخه‌چه (میلی متر)	تعداد برگ	کیفیت ظاهری رشد
	Shootlet number	Shootlet length (mm)	Leaf number	Visual quality index
	2iP concentration (mg l <sup>-1</sup> )		غلظت 2iP (میلی گرم بر لیتر)	
0.5	1.86ab	15.28	5.75a	2.51
1.0	2.00a	15.76	5.80a	2.56
2.0	1.58b	13.63	4.11b	2.08
	Genotype		ژنوتیپ	
KVD4	2.33a	15.38ab	7.13a	2.67a
Behta	1.81a	16.67a	5.03b	2.45ab
KM1	1.40b	12.63b	3.50b	2.05ab

میانگین‌هایی، در هر ستون و برای هر عامل، که دارای حداقل یک حرف مشترک می باشند، بر اساس آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال پنج درصد تفاوت معنی دار ندارند.

Means, in each column and for each factor, followed by at least one letter in common are not significantly different at the 5% probability level-using Duncan's Multiple Range Test.

بهینه‌سازی تکثیر پایه‌های گلابی توصیه نموده بودند مطابقت داشت.

نتایج همچنین نشان دهنده معنی دار بودن اثر ژنوتیپ بر روی کلیه صفات مورد ارزیابی در سطح احتمال یک درصد بود، ولی در بررسی اثر متقابل ژنوتیپ × غلظت‌های مختلف 2iP اثر معنی داری مشاهده نشد. در بین ژنوتیپ‌های به مورد آزمایش ژنوتیپ KVD4 نسبت به دو ژنوتیپ دیگر پتانسیل بالاتری برای رشد در شرایط درون شیشه‌ای از خود نشان داد (جدول ۲). برای صفات تعداد شاخه‌چه (۲/۳۳) و برگ (۷/۱۳) تولیدی در هر ریزنمونه و

در غلظت یک میلی گرم بر لیتر 2iP پرآوری بالاتری (دو شاخه‌چه در هر ریزنمونه) مشاهده شد که با دو غلظت دیگر دارای تفاوت معنی داری نبود. البته در میانگین طول شاخه‌چه‌ها و تعداد برگ تولیدی در هر ریزنمونه نیز غلظت یک میلی گرم بر لیتر 2iP نسبت به دو غلظت دیگر برتری داشت، در حالی که شاخه‌چه‌های تولیدی آن دارای کیفیت مطلوب‌تری نیز بودند. نتایج نشان داد که با افزایش غلظت 2iP از ۰/۵ به یک میلی گرم بر لیتر کلیه صفات بهبود یافت، که این نتیجه با نتایج خدایی و همکاران (Khodaei Chegenee *et al.*, 2011) غلظت ۰/۵ میلی گرم بر لیتر 2iP را برای

مختلف BAP بهترین عملکرد را از خود نشان دادند (جدول ۳). مقایسه میانگین‌ها نشان داد که بیشترین تعداد شاخه‌چه دو ژنوتیپ KVD4 و KM1 در غلظت دو میلی گرم بر لیتر BAP و رقم بهتا در غلظت ۰/۵ میلی گرم بر لیتر تولید شد (جدول ۳). پیش از این نیز گزارشی درخصوص تاثیر BAP بر روی تعداد شاخه‌چه‌های تولیدی از هر ریزنمونه گزارش شده است (George et al., 2008). یافته‌های پژوهش حاضر با نتایج الماری و همکاران (Al Maarri et al., 1986) بر روی برخی ژنوتیپ‌های به و کریم‌پور و همکاران (Karimpour et al., 2013) بر روی ارقام گلایی که غلظت دو میلی گرم بر لیتر BAP را پیشنهاد کرده اند، مطابقت دارد. ولی با نتایج خدایی چگنی و همکاران (Khodaei Chegenee et al., 2011) که بهترین غلظت برای پرآوری گلایی را غلظت یک میلی گرم بر لیتر BAP گزارش کردند، مغایرت داشت.

اثر دو غلظت هورمون TDZ، نشان دهنده تاثیر مثبت TDZ بر رشد و پرآوری درون شیشه‌ای ژنوتیپ‌های درخت به بود. تنظیم کننده رشد TDZ به عنوان یک سیتوکنین بسیار قوی، یکی از عوامل ایجاد شاخساره‌های جدید و بالا بردن ضریب پرآوری می‌باشد که نتایج حاصل از پژوهش حاضر نیز تأیید کننده این موضوع بود، به طوری که اثر غلظت‌های مختلف TDZ بر تعداد شاخه‌چه‌های تولیدی در هر ریزنمونه در سطح احتمال یک درصد و بر طول شاخه‌چه‌ها در سطح احتمال پنج درصد معنی دار بود.

شاخص کیفیت ظاهری رشد (۲/۶۷) برتری با ژنوتیپ KVD4 بود و برای صفت طول شاخه‌چه‌های تولیدی رقم بهتا با ۱۶/۶۷ میلی متر برترین رشد را داشت (جدول ۲).

تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد اثر غلظت‌های مختلف تنظیم کننده BAP بر تعداد شاخه‌چه‌های تولیدی در سطح احتمال پنج درصد معنی دار بود (جدول تجزیه واریانس ارائه نشده است). برهمکنش ژنوتیپ × غلظت‌های مختلف BAP نیز بر تعداد برگ تولیدی و کیفیت ظاهری رشد در سطح احتمال یک درصد و بر میانگین طول شاخساره‌ها در سطح احتمال پنج درصد درصدا معنی دار بود. از نظر تفاوت واکنش ژنوتیپ‌ها در غلظت‌های مختلف BAP دو ژنوتیپ KVD4 و KM1 برای صفت تعداد شاخه‌چه‌های تولیدی رفتار یکسانی را داشتند و بالاترین میزان پرآوری را در غلظت دو میلی گرم بر لیتر از خود نشان دادند، در حالی که رقم بهتا در ۰/۵ میلی گرم بر لیتر بالاترین میزان پرآوری را داشت و بالاترین میزان پرآوری مربوط به ژنوتیپ KVD4 به میزان ۲/۸۰ شاخه‌چه تولیدی در محیط حاوی ۰/۵ میلی گرم بر لیتر BAP بود (جدول ۳). در ژنوتیپ KVD4 بیشترین طول شاخه‌چه (۲۲/۸۵ میلی متر) و بالاترین شاخص کیفیت ظاهری رشد (۲/۶۰) در محیط حاوی ۰/۵ میلی گرم بر لیتر BAP به دست آمد.

بیشترین تعداد برگ (۶/۳۵) نیز برای همین ژنوتیپ در محیط یک میلی گرم بر لیتر BAP ثبت شد. بطور کلی ژنوتیپ‌های مورد ارزیابی رفتار مشابهی نداشته و در غلظت‌های

جدول ۳- برهمکنش ژنوتیپ × غلظت BAP بر شاخص‌های رشد در ارزیابی تکثیر درون شیشه‌ای دو ژنوتیپ امید بخش و رقم بهتا

Table 3. Genotypes × BAP concentration interaction effect on growth indices in *in vitro* conditions of two quince promising genotypes and cv. Behta

BAP (mg l <sup>-1</sup> )	طول شاخه‌چه (میلی‌متر)		تعداد برگ Leaf number	کیفیت ظاهری رشد Visual quality index
	تعداد شاخه‌چه Shootlet number	Shootlet length (mm)		
	KVD4 ژنوتیپ امید بخش			
0.5	2.55	22.75a	6.30a	2.60
1.0	2.55	17.15b	6.35a	2.50
2.0	2.80	15.55b	4.80b	2.30a
	cv. Behta رقم بهتا			
0.5	1.90ab	16.40b	4.25b	2.05ab
1.0	1.45b	12.00c	2.85c	1.65b
2.0	1.65ab	14.90b	3.95bc	1.85b
	KMI ژنوتیپ امید بخش			
0.5	1.10b	9.70d	1.95d	1.15c
1.0	1.20b	11.35c	2.55c	1.55b
2.0	1.95ab	13.85bc	4.25b	2.05ab

میانگین‌هایی، در هر ستون، که دارای حداقل یک حرف مشترک می باشند، بر اساس آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال پنج درصد تفاوت معنی دار ندارند.

Means, in each column, followed by at least one letter in common are not significantly different at the 5% probability level-using Duncan's Multiple Range Test.

برگ تولیدی در هر ریز نمونه و کیفیت ظاهری رشد نیز به صورت غیر معنی داری نیز مشاهده شد. بالاترین نرخ پرآوری به میزان ۴/۳۰ شاخه‌چه، بیشترین طول شاخه‌چه تولیدی با میانگین ۲۲/۳۰ میلی‌متر و بیشترین تعداد برگ تولیدی در هر ریزنمونه به میزان ۸/۷۵ مربوط به رقم بهتا در محیط حاوی ۰/۲۲ میلی گرم بر لیتر TDZ بود (جدول ۴). مقایسه میانگین‌های برهمکنش ژنوتیپ × سطوح TDZ نشان داد که کمترین تعداد شاخه‌چه (۱/۱۰)، طول شاخه‌چه (۱۰/۹۰ میلی‌متر)، تعداد برگ (۳/۴۰) و کیفیت ظاهری رشد (۱/۴۰) در ژنوتیپ KVD4 در غلظت ۰/۲۲ میلی گرم بر لیتر TDZ بود (جدول ۴).

از طرف دیگر اثر ژنوتیپ بر کلیه صفات در سطح یک درصد معنی دار بود (جدول تجزیه واریانس ارائه نشده است). معنی دار شدن برهمکنش ژنوتیپ × محیط کشت بیانگر نوعی ارجحیت ژنوتیپ‌ها برای انتخاب محیط مناسب برای رشد درون شیشه‌ای بود. مقایسه میانگین‌های برهمکنش ژنوتیپ × سطوح TDZ، می‌توان چنین بیان کرد که با افزایش میزان غلظت TDZ از ۰/۲۲ به ۰/۲۲ میلی گرم بر لیتر، در رقم بهتا و ژنوتیپ امید بخش KMI نرخ پرآوری و میانگین طول شاخه‌چه‌های تولیدی به صورت معنی داری افزایش یافت (جدول ۴). البته این افزایش در میزان

جدول ۴- برهمکنش ژنوتیپ × غلظت TDZ بر شاخص‌های رشد در ارزیابی تکثیر درون شیشه‌ای دو ژنوتیپ امید بخش و رقم بهتا

Table 4. Genotype × TDZ concentration interaction effect on growth indices in *in vitro* condition of two quince promising and cv. Behta

TDZ (mg l <sup>-1</sup> )	تعداد شاخه‌چه		کیفیت ظاهری رشد	
	Shootlet number	Shootlet length (mm)	Leaf number	Visual quality index
	KVD4			
0.022	1.15	14.10b	5.10b	1.75
0.220	1.10	10.90c	3.40c	1.40
	cv. Behta			
0.022	2.21b	12.10c	7.00ab	2.05b
0.220	4.30a	22.30a	8.75a	3.35a
	KM1			
0.022	1.85bc	13.95b	5.20	2.50ab
0.220	2.11b	14.50b	5.65	2.20ab

میانگین‌هایی، در هر ستون، که دارای حداقل یک حرف مشترک می باشند، بر اساس آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال پنج درصد تفاوت معنی دار ندارند.

Means, in each column, followed by at least one letter in common are not significantly different at the 5% probability level-using Duncan's Multiple Range Test.

IBA به میزان ۷۵ درصد داشت (جدول ۵).

بیشترین میانگین تعداد ریشه‌های تولیدی از هر ریزقلمه همانند درصد ریشه‌زایی القا شده برای رقم بهتا و ژنوتیپ امیدبخش KVD4 در محیط حاوی یک میلی گرم بر لیتر IBA و برای ژنوتیپ KM1 در غلظت دو میلی گرم بر لیتر IBA به دست آمد. همچنین در غلظت یک میلی گرم بر لیتر IBA در رقم بهتا طویل‌ترین ریشه‌ها با میانگین ۵۵/۳۱ میلی متر در بین سطوح مختلف IBA تولید شد. مقایسه میانگین‌ها نشان داد که بهترین کیفیت ریز قلمه‌ها برای ژنوتیپ امیدبخش KVD4 و رقم بهتا در غلظت یک میلی گرم بر لیتر IBA و برای ژنوتیپ KM1 در غلظت دو میلی گرم بر لیتر IBA بود (جدول ۵). نتایج پژوهش حاضر با نتایج خدایی چگنی و

## ریشه‌زایی

نتایج پژوهش حاضر نشان از برتری محیط‌های کشت حاوی IBA در قیاس با NAA و محیط‌های حاوی ترکیب هر دو هورمون بود. تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که اثر غلظت‌های IBA، ژنوتیپ و همچنین برهمکنش ژنوتیپ × محیط در سطح احتمال یک درصد برای کلیه صفات مورد ارزیابی معنی دار بود (جدول تجزیه واریانس ارائه نشده است). مقایسه میانگین‌های برهمکنش ژنوتیپ × غلظت‌های مختلف IBA نشان داد که در غلظت یک میلی گرم بر لیتر IBA بالاترین درصد ریشه‌زایی برای دو رقم بهتا با ۸۷/۵۰ درصد و ژنوتیپ امیدبخش KVD4 با ۸۱/۲۵ درصد القا شد، در حالی که ژنوتیپ امیدبخش KM1 بالاترین میزان ریشه‌زایی را در غلظت دو میلی گرم بر لیتر

جدول ۵- برهمکنش ژنوتیپ × غلظت IBA بر شاخص‌های ریشه‌زایی در ارزیابی تکثیر درون شیشه‌ای دو ژنوتیپ امید بخش و رقم بهتا

Table 5. Genotypes × IBA concentration interaction effect on rooting indices in *in vitro* condition of two quince promising genotypes and cv. Behta

IBA (mg l <sup>-1</sup> )	درصد ریشه‌زایی	تعداد ریشه	طول ریشه (میلی‌متر)	شاخص کیفیت ظاهری رشد
	Rooting (%)	Root number	Root length (mm)	Visual quality index
	ژنوتیپ امیدبخش KVD4			
0.25	12.50e	0.12d	0.81g	2.81ab
0.50	18.75d	0.75c	7.68f	2.75ab
1.00	81.25a	1.62ab	46.06b	3.62a
2.00	57.14b	1.71ab	14.85e	3.14a
4.00	57.14b	2.14a	29.14c	3.21a
	رقم بهتا cv. Behta			
0.25	42.85bc	0.14d	0.14g	3.07a
0.50	12.50e	0.25d	17.18de	2.81ab
1.00	87.50a	1.87ab	55.31a	3.37a
2.00	56.25b	1.18b	18.12de	2.87ab
4.00	43.75bc	0.81c	22.31d	2.87ab
	ژنوتیپ امیدبخش KM1			
0.25	6.25f	0.06e	2.50fg	2.06b
0.50	0.00i	0.00f	0.00h	2.18b
1.00	31.25c	0.56c	3.12fg	2.12b
2.00	75.00a	1.31b	12.25e	2.75ab
4.00	18.75d	0.43d	2.68fg	2.56ab

میانگین‌هایی، در هر ستون، که دارای حداقل یک حرف مشترک می باشند، بر اساس آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال پنج درصد تفاوت معنی دار ندارند.

Means, in each column, followed by at least one letter in common are not significantly different at the 5% probability level-using Duncan's Multiple Range Test.

مورد بررسی معنی دار نبود. اثر ژنوتیپ و همچنین برهمکنش ژنوتیپ × محیط کشت برای صفات درصد ریشه‌دهی، تعداد ریشه‌های تولیدی در هر ریزنمونه و کیفیت رشد ظاهری معنی دار بود (جدول تجزیه واریانس ارائه نشده است). ژنوتیپ KM1 بالاترین درصد ریشه‌زایی را در بین سه ژنوتیپ به در غلظت ۰/۲۵ میلی گرم بر لیتر به میزان ۵۶/۲۵ درصد داشت. طولی‌ترین ریشه نیز در ژنوتیپ KM1 و در غلظت یک میلی گرم بر لیتر به مقدار ۲۹/۸۷ میلی‌متر و بیشترین تعداد ریشه تولیدی نیز به

همکاران (Khodae Chegenee *et al.*, 2011) که غلظت یک میلی گرم بر لیتر را برای ارقام گلابی پیشنهاد کرده‌اند مطابقت داشت، در حالی که نظری مقدم آقایی و یدالهی (Nazary Moghaddam Aghaye and Yadollahi, 2012) میزان سه میلی گرم در لیتر IBA را برای ریشه‌زایی پایه GF677 هلو گزارش کردند. دیگر اکسین مورد بررسی NAA بود که اثر ضعیف‌تری، نسبت به IBA، بر ریشه‌زایی ریزقلمه‌های ژنوتیپ‌های درخت به از خود نشان داد. به‌طوریکه اثر آن برای هیچ کدام از صفات

میزان ۱/۱۸ در این غلظت بود (جدول ۶).  
 استفاده همزمان از IBA و NAA در پنج تیمار  
 به کار گرفته شده نیز نتایج مطلوبی را در بر نداشت  
 و اثر این تیمار هورمونی بر هیچ کدام از صفات  
 مورد بررسی معنی دار نبود. اثر ژنوتیپ نیز فقط برای  
 صفت میانگین طول ریشه‌های تولیدی در سطح  
 احتمال پنج درصد معنی دار بود، ولی برهمکنش  
 ژنوتیپ × محیط برای صفات ریشه‌زایی،  
 تعداد ریشه تولیدی در هر ریزنمونه و طول  
 ریشه‌های تولیدی معنی دار بود (جدول  
 تجزیه واریانس ارائه نشده است). ژنوتیپ امیدبخش  
 KVD4 بالاترین درصد ریشه‌زایی به میزان ۵۰  
 درصد، طویل‌ترین طول ریشه‌های تولیدی (۳۰  
 میلی‌متر) و بیشترین تعداد ریشه تولیدی (۰/۹۳) در  
 غلظت ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر IBA به همراه یک  
 میلی‌گرم بر لیتر NAA داشت (جدول ۷).

جدول ۶- برهمکنش ژنوتیپ × غلظت NAA بر شاخص‌های ریشه‌زایی در ارزیابی تکثیر درون شیشه‌ای  
 دو ژنوتیپ امید بخش و رقم بهتا

Table 6. Genotypes × NAA concentration interaction effect on rooting indices in *in vitro* condition of two quince promising genotypes and cv. Behta

NAA (mg l <sup>-1</sup> )	شاخص کیفیت ظاهری رشد			
	درصد ریشه‌زایی Rooting (%)	تعداد ریشه Root number	طول ریشه (میلی‌متر) Root length (mm)	Visual quality index
	KVD4 ژنوتیپ امیدبخش			
0.25	6.25f	0.06e	1.25f	2.56ab
0.50	18.75e	0.31c	10.00c	2.81a
1.00	25.00d	0.87b	12.18c	2.31ab
2.00	31.25c	0.75b	20.00ab	2.37ab
4.00	25.00d	0.81b	17.81b	2.31b
	cv. Behta رقم بهتا			
0.25	31.25c	0.68bc	26.25a	2.18b
0.50	0.00g	0.00f	0.00g	2.12b
1.00	0.00g	0.00f	0.00g	2.93a
2.00	18.75e	0.37c	16.87b	2.43ab
4.00	18.75e	0.18d	5.00d	2.43ab
	KM1 ژنوتیپ امیدبخش			
0.25	56.25a	0.93a	15.93b	2.43ab
0.50	18.75e	0.50c	17.50b	2.25b
1.00	50.00b	1.18a	29.87a	2.12b
2.00	18.75e	0.43c	6.56d	2.25b
4.00	18.75e	0.37c	2.81e	2.00c

میانگین‌هایی، در هر ستون، که دارای حداقل یک حرف مشترک می باشند، بر اساس آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال پنج درصد تفاوت معنی دار ندارند.

Means, in each column, followed by at least one letter in common are not significantly different at the 5% probability level-using Duncan's Multiple Range Test.

جدول ۷- برهمکنش ژنوتیپ × غلظت IBA + NAA بر شاخص‌های ریشه‌زایی در ارزیابی تکثیر درون شیشه‌ای دو ژنوتیپ امید بخش و رقم بهتا

Table 7. Genotypes × IBA + NAA concentration on rooting indices in *in vitro* condition of two quince promising and cv. Behta

شاخص کیفیت ظاهری رشد Visual quality index	طول ریشه (میلی‌متر) Root length (mm)	تعداد ریشه Root number	درصد ریشه‌زایی Rooting (%)	ژنوتیپ امیدبخش	
				KVD4	رقم بهتا
IBA+NAA (mg l <sup>-1</sup> )					
cv. Behta					
KM1					

میانگین‌هایی، در هر ستون، که دارای حداقل یک حرف مشترک می باشند، بر اساس آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال پنج درصد تفاوت معنی دار ندارند.

Means, in each column, followed by at least one letter in common are not significantly different at the 5% probability level-using Duncan's Multiple Range Test.

میلی گرم بر لیتر BAP به محیط QL منجر به تولید طویل‌ترین شاخه‌چه‌ها شد، در حالی که باکیفیت‌ترین شاخه‌چه‌های تولیدی در تیمار حاوی یک میلی گرم بر لیتر 2iP حاصل شدند. به منظور ریشه‌دارسازی ژنوتیپ‌های درخت به، استفاده از روش دومرحله‌ای و محیط کشت حاوی یک میلی گرم بر لیتر IBA، به دلیل ایجاد بالاترین درصد ریشه‌زایی و تولید طویل‌ترین ریشه‌ها، توصیه می‌شود.

نتایج پژوهش حاضر نشان داد که در میان محیط‌های پایه مورد بررسی، محیط QL به عنوان مناسب‌ترین محیط برای مرحله پرآوری ژنوتیپ‌های به مورد مطالعه قابل توصیه است. به کارگیری غلظت ۰/۲۲ میلی گرم بر لیتر TDZ بیشترین میزان پرآوری را در مقایسه با سایر تیمارها داشت و همچنین بالاترین تعداد برگ تولیدی در هر ریزنمونه در این تیمار مشاهده شد. در میان تنظیم‌کننده‌های رشد مورد استفاده، افزودن ۰/۵

## سپاسگزاری

## تعارض منافع

نگارندگان اعلام می کنند که هیچگونه تعارض منافی با دیگر افراد حقیقی/حقوقی ندارند.

نگارندگان بدین وسیله از کارکنان آزمایشگاه کشت بافت و انتقال ژن پژوهشگاه بیوتکنولوژی کشاورزی ایران که در اجرای این پژوهش همکاری کردند سپاسگزاری می کنند.

## References

- Abdollahi, H. 2010.** Pear: botany, cultivars and rootstocks. Iranian Agricultural Ministry Publications, Tehran, Iran. 210 pp. (in Persian).
- Abdollahi, H. 2021.** Quince. Pp. 183- 246. In: Mandal, D., Wermund, U., Phavaphutanon, L. and Cronje, R. (eds.). *Temperate Fruits: Production, Processing, and Marketing*. CRC Press, United States of America. DOI: 10.1201/9781003045861
- Abdollahi, H. 2024.** Quince cultivation; scientific and applied principles. Horticultural Sciences Research Institute Publication, Karaj, Iran. 423 pp. (in Persian).
- Abdollahi, H., Ghasemi A. and Adli, M. 2008a.** Collecting and collection establishment of *Cydonia oblonga* mill. germplasm from different regions of Iran. In: Proceedings of the 10<sup>th</sup> Iranian Congress of Genetic (Plant section), 21-23 May 2008, Tehran, Iran. (in Persian).
- Abdollahi, H., Ghasemi, A. and Mehrabi Pour, S. 2008b.** Evaluation of fire blight resistance in some quince (*Cydonia oblonga* Mill.) genotypes, II. Resistance of genotypes to the disease. *Seed and Plant Journal*, 24, pp.529-541 (in Persian). DOI: 10.22092/spij.2017.110836
- Abdollahi, H., Muleo, R. and Rugini, E. 2005.** Study of basal growth media, growth regulators and pectin effects on micropropagation of pear (*Pyrus communis* L.) cultivars. *Seed and Plant Journal*, 21, pp. 373-384 (in Persian).
- Al Maarri, K., Arnaud, K. and Miginiac, E. 1986.** *In vitro* micropropagation of quince (*Cydonia oblonga*). *Scientia Horticulturae*, 28, pp.315–321. DOI: 10.1016/0304-4238(86)90105-6
- Alipour, M., Abdollahi, H., Abdusi V., Ghasemi, A., Adli M. and Mohammadi, M. 2014.** Evaluation of vegetative and reproductive characterization and distinctness of some quince genotypes (*Cydonia oblonga* Mill.) from various regions of Iran. *Seed and Plant Journal*, 30-1, pp. 507-529 (in Persian). DOI: 10.22092/spij.2017.111226
- Barton, S. and Bhatia, S.K. 1993.** Factors effecting adventitious shoot regeneration from

- leaf explants of quince (*Cydonia oblonga*). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 35, pp.273-277. DOI: 10.1007/BF00037281
- Chartier-Hollis, J.M. 1993.** The induction and maintenance of caulogenesis from undifferentiated callus of quince (*Cydonia oblonga*). *Acta Horticulturae*, 336, pp.321-325. DOI: 10.17660/ActaHortic.1993.336.42
- Ciccotti A.M., Bisognin C., Battocletti I., Salvadori A., Herdemertens M., and Jarausch W. 2008.** Micropropagation of apple proliferation-resistant apomictic *Malus sieboldii* genotypes. *Agronomy Research*, 6, pp.445-458.
- Druart, P. 1980.** La micropropagation des nouveaux sujets portegreffe nanifiants chez le cerisier. Symposium International sur le cerisier. Pp.13–24 In: Centre de Recherches Agronomiques. Gembloux, Belgium, .25-27 Juin 1980.
- FAO. 2022.** Agricultural statistics, Food and Agriculture Organization of the United Nations. <http://www.faostat.fao.org> Accessed 23 Mar 2022.
- George, E.F., Hall, M.A. and Klerk, G.D. 2008.** Plant propagation by tissue culture. Volume 1: The background. Springer-Verlag GmbH.
- Giorgota A., Preda, S., Isac, M. and Tulvinschi, M. 2009.** Development of a micropropagation protocol for the Romanian quince (*Cydonia oblonga*) cultivar 'Aurii' and rootstocks 'Bn70' and 'A type'. *Acta Horticulturae*, 839, pp.105-110. DOI: 10.17660/ActaHortic.2009.839.11
- Gulsen Y., Sulusoglu, M. and Eroglu, B. 1999.** The effect of various agar types on shoot proliferation in micropropagation of Quince-A. Pp.218-222. In: Proceedings of Turkish National Horticultural Congress, 14-17 September 1999. Ankara, Turkey.
- Karimpour S., Davarynejad, G.H., Tehranifar, A. and Bagheri, A. 2013.** Comparative effects of Some PGRs combination on proliferation and hyperhydricity of Sebri pear cultivar. *International Journal of Farming and Allied Sciences*, 1, pp.202-205.
- Khodae Chegenee, F., Abdollahi, H., Ershadee, A. and Esna Ashari, M. 2011.** Determination of micropropagation protocol for OH×F333 and OH×F69 pear clonal rootstock. *Seed and Plant Journal*, 27-2, pp.297-312 (in Persian). DOI: 10.22092/sppj.2017.110439
- Lee E.C.M. and Fossard R.A. 1977.** Some factors affecting multiple bud formation of strawberry (*Fragaria×ananassa* Duch.) *in vitro*. *Acta Horticulturae*, 78, pp.187-196. DOI: 10.17660/ActaHortic.1977.78.24

- Lloyd G. and McCown, B. 1980.** Commercially-feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use shoot-tip culture. Proceedings of International Plant Propagation Society, 30, pp.421-427.
- Manee A. 1993.** Pear and quinces growing. Technical Publishing Corporation of Iran. 113 pp. (in Persian).
- Mehrabi Pour, S., Abdollahi H. and Adli, M. 2012.** Response of some quince (*Cydonia oblonga* Mill.) genotypes from Guilan and Khorasan provinces to fire blight disease. *Seed and Plant Journal*, 28-1, pp.67-84. (in Persian). DOI: 10.22092/spij.2017.111092
- Murashige, T. and Skoog, F. 1962.** A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15, pp.473-497. DOI: 10.1111/j.13993054.1962.tb08052.x
- Nazary Moghaddam Aghaye R. and Yadollahi, A. 2012.** Micropropagation of GF677 Rootstock. *Journal of Agricultural Science*, 5, pp.131-138. DOI:10.5539/jas.v4n5p131
- Nemeth, G. 1979.** Benzyladenine-stimulated rooting in fruit tree rootstocks cultured *in vitro*. *Z Pflanzenphysiol*, 95, pp.396-389. DOI: 10.1016/S0044-328X(79)80209-3
- Quoirin, M., and Lepoivre, P. 1977.** Improved medium for *in vitro* culture of *Prunus* sp. *Acta Horticulturae*, 78, pp.437-442. DOI:10.17660/ActaHortic.1977.78.54
- Rezvanjoo, N., Ghanbari, A., Mohiboldini, M., Torabi Gigloo, M., Heidari, H. and Haqjoian, R. 2019.** The effect of culture medium type and different concentrations of benzyladenine on the proliferation of blueberry (*Cornus mas* L.) shoots. *Fruit Research*, 4(2), pp.106-114.
- Wada, S., Niedz, R.P., DeNoma, J. and Reed, B.M. 2013.** Mesos components (CaCl<sub>2</sub>, MgSO<sub>4</sub>, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) are critical for improving pear micropropagation. *In Vitro Cell*, 49, pp.356-365. DOI: 10.1007/s11627-013-9508-x

## Optimization of *in Vitro* Propagation Conditions for Some Selected Quince (*Cydonia oblonga* Mill.) Genotypes of Isfahan

M. Torkashvand<sup>1</sup>, A. Rezaei<sup>2</sup>, A. Vatanpour Azghandi<sup>3\*</sup>, H. Abdollahi<sup>4\*</sup> ,  
M. Zeinolabedini<sup>5</sup> and A. Ebrahimi<sup>6</sup>

1. Former M. Sc. student, Biotechnology Department, Faculty of Agriculture and Natural Sciences, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.
2. Researcher, Temperate Fruits Research Center, Horticultural Sciences Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization, Karaj, Iran.
3. Assistant Professor, Tissue Culture and Gene Transformation Department, Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran, Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization, Karaj, Iran.
4. Associate Professor, Temperate Fruits Research Center, Horticultural Sciences Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization, Karaj, Iran.
5. Associate Professor, Genomics Department, Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran, Agricultural Research, Education and Extension Organization, Karaj, Iran.
6. Assistant Professor, Biotechnology Department, Faculty of Agriculture and Natural Sciences, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.

### ABSTRACT

Torkashvand, M., Rezaei, A., Vatanpour, Azghandi, A., Abdollahi, H., Zeinolabedini, M. and Ebrahimi A. 2025. Optimization of *in vitro* propagation conditions for some selected quince (*Cydonia oblonga* Mill.) genotypes of Isfahan. *Seed and Plant*, 41, pp.1-22 (in Persian).

*In vitro* propagation of quince tree is more difficult than other pome fruit trees, and as a result, it is necessary to optimize tissue culture methods for cultivars and genotypes of this tree with various goals, such as producing virus-free mother stocks. The aim of this study was to optimize proliferation, *in vitro* growth and rooting conditions, for three selected quince genotypes of Isfahan region including KVD4, KM1 and cv. Behta. Effects of MS and QL culture media were evaluated on *in vitro* proliferation traits. The results showed that QL in comparison with compared with MS, significantly improved shoot proliferation and was selected for further experiments. In the second experiment, the effects of different concentrations of cytokinins including 2iP and BAP at the 0.5, 1.0 and 2.0 mg l<sup>-1</sup> and TDZ at the 0.22 and 0.022 mg l<sup>-1</sup> levels were examined on growth and proliferation. The results indicated that the best proliferation rate, shoot length, shootlet number, leaflet number shootlet<sup>-1</sup> and growth quality index were obtained in culture media containing 1.0 mg l<sup>-1</sup> 2iP, 2.0 mg l<sup>-1</sup> BAP and 0.22 mg l<sup>-1</sup> TDZ. The third experiment was conducted to study the effects of different concentrations of IBA, NAA and IBA+NAA on rooting of these genotypes. The highest rooting was observed using 1.0 mg l<sup>-1</sup> IBA. QL media containing 2.0 mg l<sup>-1</sup> BAP, 0.5 mg l<sup>-1</sup> 2iP and 0.22 mg l<sup>-1</sup> TDZ for shoot growth and proliferation, and the same media enriched by 1.0 mg l<sup>-1</sup> IBA for rooting of quince genotypes can be recommended.

**Keywords:** Quince, auxin, proliferation, rooting, cytokinin, meristem culture.

## Introduction

The quince tree (*Cydonia oblonga* Mill.) is a pome fruit tree native to temperate regions. Despite all progresses in quince cultivation and growth, the large-scale commercial propagation of virus-free and healthy rootstocks of this tree has not been materialized yet (Abdollahi *et al.*, 2005). Early investigations into the application of tissue culture for quince trees included those by Al Maarri *et al.* (1986). Al Maarri *et al.* (1986) focused on *in vitro* propagation of quince rootstocks, examining the effects of different BAP and NAA concentrations on micro-cutting proliferation and rooting.

Considering the quince tree as an indigenous plant in Iran and an invaluable genetic resources for the country, the production of virus-free and uniform seedlings from newly released cultivars is important in the nurseries and mother orchards. Furthermore, the development of biotechnology-based breeding programs for applied research can be accelerated through tissue culture methods.

Therefore, this study aimed to develop an optimized *in vitro* culture protocol for three selected quince genotypes from Isfahan region of Iran, with the ultimate goal of using this protocol for subsequent production of virus-free primary quince rootstocks.

## Materials and Methods

The plant materials used in this study included two promising genotypes; KVD4, KM1, and cv. Behta. *In vitro* establishment of plant materials was achieved by shoot tip culture after surface sterilization. Meristems were transferred to square 25-well Petri dishes under a photoperiod of 16 hours light provided by white fluorescent lamps (Sylvania, Germany) at an intensity of  $40 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  and a constant temperature of  $23 \pm 1^\circ\text{C}$ .

Evaluation of cytokinin effects was performed by using three cytokinins, 2iP, BAP, and TDZ in separate experiment. The plant growth regulators 2iP and BAP were applied at the concentrations of 0.5, 1.0, and 2.0  $\text{mg l}^{-1}$ , while due strong effects of TDZ this cytokinin was used at 0.022 and 0.22  $\text{mg l}^{-1}$  concentrations.

Similarly, the optimization of rooting conditions was established by two types of auxins, IBA and NAA, IBA+NAA in separate experiments. All rooting experiments were conducted using QL basal medium supplemented with 30  $\text{g l}^{-1}$  sucrose as the carbon source. Five auxin concentrations, including 0.25, 0.5, 1.0, 2.0, and 4.0  $\text{mg l}^{-1}$  were applied in two separate experiments for both IBA and NAA. In IBA+NAA treatments, three concentrations of IBA (0.5, 1, and 2  $\text{mg l}^{-1}$ ) were applied along with a constant concentration of 0.5  $\text{mg l}^{-1}$  NAA, and two concentrations of NAA (1.0 and 2.0  $\text{mg l}^{-1}$ ) were used with a constant 0.5  $\text{mg l}^{-1}$  IBA.

The effects of different levels of growth regulators  $\times$  genotype interactions were assessed in a factorial arrangements in completely randomized design. Traits measured included the number of roots explant<sup>-1</sup>, root length, root number explant<sup>-1</sup>, and visual quality index of

growth. The collected data were analyzed using SAS software, and mean comparisons were performed using Duncan's Multiple Range Test.

## Results and Discussion

The results indicated that the main effect of culture media was significant ( $p \leq 0.01$ ) on the shoot number, leaflets number explant<sup>-1</sup>, and visual growth quality, but not on shoot length. Genotype had significant effect on all evaluated traits. Genotype  $\times$  culture media interaction was not significant for the number of shootlets explant<sup>-1</sup>. Mean comparisons showed that use of QL basal medium led to better results in all traits on *in vitro* quince shootlets.

The QL medium not only exhibited a higher proliferation rate as 2.73 shoots explant<sup>-1</sup>, compared to 1.73 shoots explant<sup>-1</sup> in the MS medium, but also enhanced the mean shoot length and of leaflet number explant<sup>-1</sup>. These results of the present study is in accordance with those reported by Abdollahi *et al.* (2005) on pear rootstocks. However, it contradicts the findings of Ciccotti *et al.* (2008), who recommended MS medium for apple proliferation.

Mean comparisons of different concentrations of 2iP showed that 1.0 mg l<sup>-1</sup> was the most effective, and yielded significantly higher proliferation than 2.0 mg l<sup>-1</sup>. At 1.0 mg l<sup>-1</sup> of 2iP, higher proliferation rates (2 shoots explant<sup>-1</sup>) was observed, which was significantly different from the other concentrations. This concentration also produced longer shootlets and higher leaflet number explant<sup>-1</sup>, as well as better overall shoot quality.

Although increasing 2iP concentration from 0.5 to 1.0 mg l<sup>-1</sup> improved all traits, this improvement was remarkably more substantial than the differences between 1.0 and 2.0 mg l<sup>-1</sup>. Khodae Chegenee *et al.* (2011) reported concentration of 0.5 mg l<sup>-1</sup> 2iP for pear rootstocks. The genotype effect was significant for all traits at the 1% probability level. Among the evaluated quince genotypes, the promising genotype KVD4 demonstrated superior results in comparison with others in *in vitro* conditions.

The rooting experiments showed that media supplemented with IBA were more effective than those with NAA or IBA+NAA. The effect of IBA concentration, genotype, and their interaction were all significant ( $p \leq 0.01$ ) for all evaluated root traits. Genotypes responded differently to the various IBA concentrations. At the 1.0 mg l<sup>-1</sup> IBA, the highest rooting rates were obtained for cv. Behta (87.50%) and promising genotype KVD4 (81.25%), while promising genotype KM1 showed the highest rooting rate (75%) at the 2.0 mg l<sup>-1</sup> IBA. Similarly, the highest mean root number micro-cutting<sup>-1</sup> was observed under the same conditions. Cv. Behta produced the longest roots (mean of 55.31 mm) at the 1.0 mg l<sup>-1</sup> IBA. The best quality of micro-cuttings was recorded for the promising genotype KVD4 and cv. Behta at the 1.0 mg l<sup>-1</sup> IBA and for promising genotype KM1 at the 2.0 mg l<sup>-1</sup> IBA. These findings are in agreement with those of Khodae Chegenee *et al.* (2011), who also reported the 1.0 mg l<sup>-1</sup> IBA for pear cultivars.

## References

- Abdollahi H., Muleo, R. and Rugini, E. 2005.** Study of basal growth media, growth regulators and pectin effects on micropropagation of pear (*Pyrus communis* L.) cultivars. *Seed and Plant Journal*, 21, pp.373-384 (in Persian).
- Al Maarri, K., Arnaud, K. and Miginiac, E. 1986.** *In vitro* micropropagation of quince (*Cydonia oblonga*). *Scientia Horticulturae*, 28, pp.315–321. DOI: 10.1016/0304-4238(86)90105-6
- Ciccotti, A.M., Bisognin, C., Battocletti, I., Salvadori, A., Herdemertens, M. and Jarausch, W. 2008.** Micropropagation of apple proliferation-resistant apomictic *Malus sieboldii* genotypes. *Agronomy Research*, 6, pp.445-458.
- Khodae Chegenee F., Abdollahi H., Ershadee A. and Esna Ashari M. 2011.** Determination of micropropagation protocol for OH×F333 and OH×F69 pear clonal rootstock. *Seed and Plant Journal*, 27-2, pp.297-312 (in Persian). DOI: 10.22092/sppj.2017.110439

---

\*Corresponding author: h.abdollahi@areo.ac.ir and azghandi@abrii.ac.ir Tel.: +982636702541

Received: 27 February 2025

Accepted: 05 April 2025



2025© Seed and Plant. This is an open access article distributed under Creative Commons Attribution 4.0 International License (CC BY 4.0), which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source.